

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LUCAS CUTRI

**ESTUDO DA FUNÇÃO DO GENE *LEAFY* (LFY) EM
DUAS ESPÉCIES DE *Passiflora*.**

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lucas Cutri
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Mestre em
Biologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C979e	<p>Cutri, Lucas Estudo da função do gene LEAFY (LFY) em duas espécies de <i>Passiflora</i> / Lucas Cutri. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Marcelo Carnier Dornelas. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Passiflora</i>. 2. LEAFY. 3. Desenvolvimento reprodutivo. 4. Desenvolvimento vegetativo. I. Dornelas, Marcelo Carnier. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(pbg/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Role of the LEAFY (LFY) gene in two species of *Passiflora*.

Palavras-chave em inglês: *Passiflora*; LEAFY; Reproductive development; Vegetative development.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marcelo Carnier Dornelas, Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Tâmara Canto Fonseca.

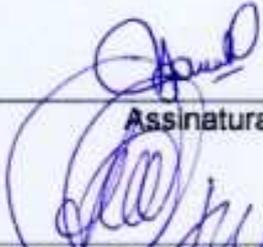
Data da defesa: 09/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 09 de Fevereiro de 2009

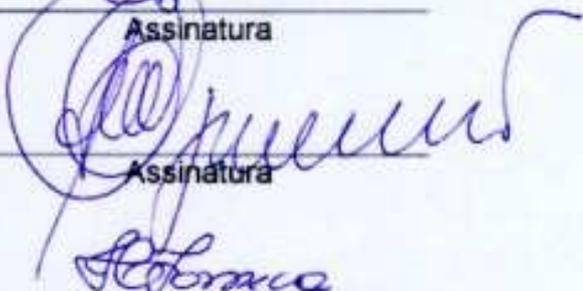
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (Orientador)



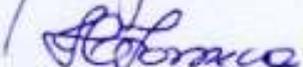
Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro



Assinatura

Dra. Tamara Canto Fonseca



Assinatura

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Assinatura

Dra. Ilene Ribeiro da Silva Passos

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Dornelas, que tornou possível a concretização deste trabalho graças a sua integral dedicação e seu total comprometimento, estando sempre disponível para a solução de todos os problemas e dúvidas que surgiram ao longo do percurso.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Tamara Canto Fonseca pelo apoio ao trabalho como um todo, e em especial pela ajuda com as secções para a Microscopia Óptica.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima por disponibilizar o uso do Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO) do NAP/MEPA- ESALQ (USP).

À Prof^a Dr^a Siu Mui Tsai do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelo seqüenciamento dos clones.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Unicamp.

Aos colegas, funcionários e professores do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp.

Aos amigos que presenciaram e compartilharam todos os momentos, felizes e tristes ao longo deste trabalho, sempre me apoiando e fazendo com que eu continuasse até o final.

Aos meus pais e minha irmã, nos quais eu me espelho, e os quais são os pilares onde encaixo os meus passos.

ÍNDICE

RESUMO	vi
SUMMARY.....	vii
I INTRODUÇÃO	1
1.1 O gene LEAFY (LFY).....	1
1.2 A clonagem e caracterização de LFY/FLO em outras angiospermas sugerem divergência de função.	5
1.3 Qual o papel ancestral e o verdadeiro papel biológico atual do gene LFY?	8
1.4 Gavinhas, flores e inflorescências: Espécies de Passiflora como um modelo para o estudo da evolução da função do gene LFY.	11
II OBJETIVOS	13
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material Vegetal.....	14
3.2. Microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	14
3.3. Clonagem e análise de fragmentos de seqüência dos homólogos do gene LFY em Passiflora.....	15
3.4 Obtenção de plantas transgênicas de <i>P. edulis</i> e <i>P. suberosa</i> via <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	17
3.4.1 Seleção de transformantes.....	19
3.5 Análise da expressão de PeLFY e PsLFY via RT-PCR e hibridização in situ. .	20
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Descrição do desenvolvimento reprodutivo de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> Deg e <i>P.</i> <i>suberosa</i> L.....	22
4.2 Clonagem de fragmentos dos homólogos do gene LFY em Passiflora	30
4.3 Expressão de homólogos do gene LFY em duas espécies de Passiflora.	33
4.3.1. RT-PCR.....	33
4.3.2 Hibridizações in situ.....	38
4.4 Obtenção de plantas transgênicas de Passiflora suberosa e Passiflora edulis via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
V. CONCLUSÕES.....	47
VI LITERATURA CITADA	49

RESUMO

O gene *LEAFY* (*LFY*) específico de plantas, além de atuar na transição do meristema vegetativo para o reprodutivo, parece regular também a transição do desenvolvimento de produtos do meristema apical tão diversos quanto: folhas-gavinhas; flores-gavinhas e inflorescências-flores solitárias, além de diminuir drasticamente o tempo necessário para que a planta passe da fase vegetativa para a fase reprodutiva. O gênero *Passiflora* é um candidato em potencial para o estudo da evolução da função biológica do gene *LFY*, por conter todas as estruturas morfológicas em que o referido gene atua. Neste estudo, foram analisadas duas espécies divergentes de *Passiflora*: *Passiflora edulis* var *flavicarpa* e *Passiflora suberosa*. O desenvolvimento reprodutivo de ambas foi caracterizado com o uso de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura. Análises moleculares da função do gene *LFY* também foram executadas nestas duas espécies. Isolou-se, via PCR, fragmentos potencialmente correspondentes a homólogos do referido gene em *P. edulis* e em *P. suberosa*. Estas seqüências gênicas, denominadas respectivamente *PeLFY* e *PsLFY* foram utilizadas em análises filogenéticas. O padrão de expressão de ambos os genes foi investigado em experimentos de RT-PCR e hibridização *in situ* em diferentes tecidos durante o desenvolvimento das espécies de *Passiflora* estudadas. Adicionalmente, foram obtidas plantas transgênicas de *P. suberosa*, contendo uma construção de superexpressão do gene *LFY* de *Arabidopsis*.

SUMMARY

The *LEAFY* (*LFY*) gene is plant-specific, and besides playing a role in the transition of the vegetative to the reproductive meristems, it seems to regulate the development of different products of the shoot apical meristem (SAM) as leaves-tendrils, flowers-tendrils, solitary flowers-inflorescences. It is also responsible for decreasing substantially the time needed for the transition from the vegetative to the reproductive phase. The genus *Passiflora* is a good model for the study of the evolution of the biologic function of the *LFY* gene, because it has all morphological structures in which this gene acts. In this study, two distinct species: *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* and *Passiflora suberosa* had their reproductive development analyzed by optical microscopy and scanning electron microscopy. Molecular analyzes of *LFY* functions were also performed in both species. Fragments corresponding to homologs of the *LFY* gene were cloned from *P. edulis* and *P. suberosa* by PCR. These fragments were named *PeLFY* and *PsLFY*, respectively and were used in filogenetic analyzes. The expression patterns of these genes were investigated by RT-PCR and *in situ* hybridization in different tissues of the studied *Passiflora* species. Additionally, transgenic lines of *P. suberosa* were obtained that contained a construction that promoted the overexpression of the *Arabidopsis LFY* gene.

I INTRODUÇÃO

1.1 O gene *LEAFY* (*LFY*)

Os meristemas apicais de plantas-modelo com *Antirrhinum majus* e *Arabidopsis thaliana* possuem uma região de diferenciação que origina primórdios foliares e, em um determinado momento da vida da planta, converte-se em meristema da inflorescência para a formação das flores.

O desenvolvimento de meristemas florais a partir dos meristemas de inflorescência é mediado pela ação de genes de identidade de meristemas florais. Entre eles está o gene *LEAFY* (*LFY*) em *Arabidopsis*, cujo homólogo em *Antirrhinum* é o gene *FLORICAULA* (*FLO*; Weigel et al., 1992).

Mutações no gene *FLO* causam a formação de brotações indeterminadas no lugar de flores em *Antirrhinum* (Coen, 1991) e em mutantes *lfy* de *Arabidopsis*, o florescimento é retardado e as estruturas que normalmente se desenvolveriam em flores se desenvolvem em inflorescências secundárias e flores anormais precedidas por brácteas (Weigel et al., 1992).

FLO e *LFY* compartilham 70% da identidade de seqüência dos aminoácidos, e um domínio ácido indicando a possibilidade de codificarem um fator de transcrição (Coen, 1991). Em *Arabidopsis*, o papel do *LFY* tem sido estabelecido como ativador de genes homeóticos que regulam a organogênese floral (Weigel et al., 1992) e também parece atuar na supressão da formação de brácteas florais no tipo selvagem, uma vez que mutantes *lfy* apresentam a formação de brácteas ectópicas.

Ambos *LFY* e *FLO* se expressam nos últimos primórdios foliares antes da transição floral e nos meristemas florais, principalmente durante as fases iniciais da formação dos órgãos florais (Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel et al., 1992). Em *Antirrhinum*, a expressão de *FLO* é também observada nas brácteas.

APETALA 1 (AP1) é um outro gene de identidade do meristema floral em *Arabidopsis*, que atua conjuntamente com o gene *LFY*. Quando *LFY* e *AP1* não são funcionais, não há a conversão dos meristemas de inflorescência em meristemas florais (Irish & Sussex, 1990).

Um grande número de genes que controlam o tempo da transição para o florescimento foi identificado em *Arabidopsis* pela análise de mutantes. Muitos destes mutantes apresentam alterações pleiotrópicas como mudanças na forma das folhas e na densidade de tricomas. Estas observações sugerem que poucos dos genes reguladores da transição para o florescimento controlam unicamente esta característica (Telfer et al., 1997).

A expressão constitutiva de *LFY (35S::LFY)* promove o florescimento precoce em *Arabidopsis* e em outras espécies, indicando a grande importância da transcrição de *LFY* na transição para o florescimento (Weigel & Nilsson 1995; Blázquez et al., 1997; Nilsson et al., 1998; Peña et al., 2001). Entretanto, estudos com duplos mutantes de *Arabidopsis*, juntamente com observações da atenuação do fenótipo de *35S::LFY* em dias curtos, indicam que existe um outro mecanismo que atua paralelamente ou antagonicamente à transcrição de *LFY* (Weigel & Nilsson 1995, Ruiz-Garcia et. al 1997). Para compreender como genes do tempo de florescimento estão envolvidos neste mecanismo paralelo à atuação do gene *LFY*, Nilsson et al. (1998) investigaram como mutações em 11 *loci* diferentes, promovendo o

florescimento tardio, afetam a resposta da expressão constitutiva de *LFY*, bem como a atividade do promotor do gene *LFY*. Chegou-se a um modelo onde genes controladores do tempo de florescimento, juntamente com genes envolvidos na síntese de GAs, atuam sinergicamente com *LFY*, que por sua vez atua na iniciação floral, induzindo a expressão de *AP1*, que por sua vez também é controlada por genes relacionados ao fotoperíodo, levando à iniciação da formação dos órgãos florais. Mais recentemente foram descobertos dois genes com funções redundantes, os homeobox *PENNYWISE (PNY)* e *POUND-FOOLISH (PNF)*, que se expressam no meristema vegetativo e da inflorescência e promovem a expressão de *LFY*, uma vez que mutantes *pny* e *pnf* voltam a florescer com a expressão ectópica de *LFY*. Mutações nos genes *pny* e *pnf* combinadas com *lfy*, levam a um fenótipo onde a especificação floral é bastante reduzida e o padrão de formação da inflorescência é bastante alterado, denotando a participação destes genes na transição do meristema da inflorescência para o meristema floral (Kanrar et al., 2008).

Atualmente sabe-se que o produto do gene *LFY* não atua sozinho. Um gene que codifica uma proteína F-Box, denominado *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*, atua sinergicamente com *LFY* para a ativação de *APETALA3 (AP3)* que é responsável pela determinação da identidade das pétalas e estames (Jack et al., 1992; Ingram et al., 1995; Levin & Meyerowitz, 1995; Wilkinson & Haughn, 1995; Lee et al., 1997). Chae et al. (2008), com ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que *UFO* interage fisicamente com *LFY* e esta interação é necessária para a ativação do promotor de *AP3*. Em petúnia, o gene homólogo ao *UFO*, *DOUBLE TOP (DOT)* parece regular a atividade transcricional de *LFY*, uma vez que *DOT* é essencial para que haja a expressão dos genes de identidade do meristema floral. Nas petúnias em

mutantes para este gene não houve transição do meristema da inflorescência para o floral e sua superexpressão causou florescimento precoce (Souer et al., 2008). Estas interações gênicas entre o *LFY* e outros genes são representadas na Figura 1.

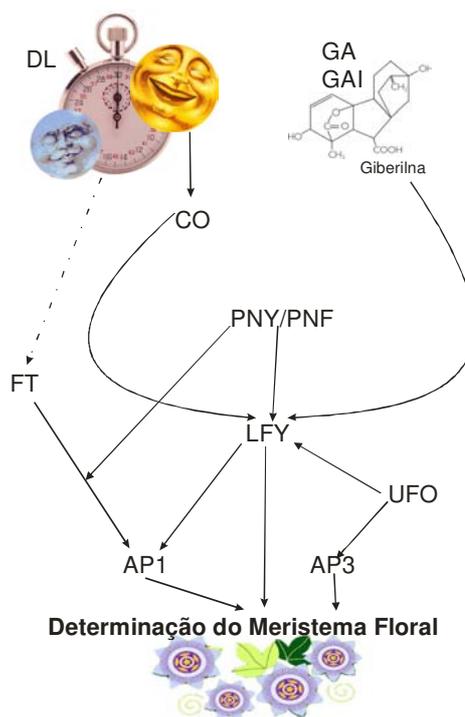


Figura 1: Modelo que resume a relação de outros genes (*PNY/PNF*, *UFO*, *CO*, *FT*) e fatores endógenos, como as giberilinas (GA) que levam à iniciação floral e à determinação dos órgãos no meristema floral. *PENNYWISE* (*PNY*), *POUND-FOOLISH* (*PNF*), *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*), *CONSTANS* (*CO*), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*).

Recentemente, a proteína codificada pelo gene *LFY* teve a estrutura de seu domínio de ligação com o DNA revelada por cristalografia. Basicamente, *LFY* apresenta um vinco formado por um novelo com 7 hélices que se liga ao DNA como um dímero cooperativo, formando contatos específicos com os nucleotídeos. Esta

estrutura se assemelha com proteínas tipo "helix-turn-helix", que incluem as proteínas do tipo "homodomíneos", presentes na regulação da morfogênese em eucariotos superiores (Hamès et al.,2008).

1.2 A clonagem e caracterização de *LFY/FLO* em outras angiospermas sugerem divergência de função.

Apesar da conservação da seqüência de *LFY* entre espécies distantes, diferenças significativas estão emergindo em relação ao seu padrão de expressão, o que pode indicar a existência de uma divergência funcional. Adicionalmente à sua expressão nos meristemas florais, a análise da expressão de homólogos do gene *LFY* em outras angiospermas como agrião, tabaco, tomate, videira, batata e crisântemo revelou a presença de transcritos destes genes no meristema vegetativo, brácteas, primórdios foliares e folhas (Pouteau et al., 1997; Shu et al., 2000; Kelly et al., 1995; Molinero-Rosales et al., 1999; Ma et al., 2008; Guo & Yang, 2008).

Em alguns casos, a função de alguns destes homólogos de *LFY* em tecidos não-florais foi estudada, como no caso do gene *UNIFOLIATA (UNI)*. O gene *UNI* é um homólogo de *FLO* e *LFY* em ervilha (*Pisum sativum*; Hofer et al., 1997). Os mutantes *uni*, além de alterações na estrutura da flor, também apresentam alterações no corpo vegetativo, as folhas compostas são substituídas por folhas simples com pecíolo curto e sem a presença de gavinhas. Experimentos de hibridização *in situ*, mostraram que *UNI* se expressa fortemente em primórdios foliares, inflorescências e nos primórdios dos órgãos florais. O papel funcional de *UNI* na regulação da morfogênese da folha é suportado pela presença de transcritos de

UNI nos primórdios foliares durante os 4 primeiros plastocrons do desenvolvimento dos mesmos (Hofer et al., 1997). A análise da expressão de *UNI* em outros mutantes envolvidos na formação do complexo folha-gavinha, permitiu determinar a ação antagônica de *UNI* em uma série de genes envolvidos na formação de padrão da estrutura das folhas (Gourlay et al., 2000).

A função de homólogos de *LFY* na regulação da diferenciação de folhas compostas parece ser conservada em leguminosas. Sabe-se que nas plantas vasculares o gene envolvido na formação de folhas compostas é o *KNOTTED1-like* (*KNOX1*; Champagne et al., 2007). Porém, em um clado da família Fabaceae da qual a ervilha faz parte, a expressão deste gene não está relacionada com a construção das folhas compostas, sendo *LFY* o gene responsável por este processo. Experimentos de silenciamento gênico do *LFY* em outras espécies de leguminosas, como a soja (*Glicine max*), mostraram inibição na formação de folhas compostas nestas plantas, denotando a participação deste gene no processo de construção da arquitetura foliar (Champagne et al., 2007; Wang et al., 2008).

A regulação do florescimento em espécies lenhosas perenes é bastante diferente da observada em espécies herbáceas. Ortólogos do gene *FLO/LFY* já foram clonados em várias espécies lenhosas (Southerton et al., 1998; Rottman et al., 2000; Peña et al., 2001; Carmona et al., 2002; Dornelas et al., 2004; Dornelas & Rodriguez, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b)

Em *Eucalyptus spp.*, foram clonados dois homólogos funcionais do gene *LFY* de duas espécies diferentes: *ELF1* (*E. globulus*) e *EgLFY* (*E. grandis*). Tanto *ELF1* como *EgLFY* são homólogos ao gene *LFY*, baseando-se em seus padrões de expressão nos meristemas florais de *Eucalyptus spp.* e de experimentos com plantas

transgênicas superexpressando os genes de *Eucalyptus* em mutantes *lfy* ou plantas selvagens de *Arabidopsis*. (Southerton et al. , 1998; Dornelas et al., 2004).

As plantas do gênero *Citrus* também são perenes, lenhosas e possuem uma fase juvenil longa, com duração de 6 a 20 anos, dependendo da espécie. Com o objetivo de acelerar seu tempo de florescimento, Peña et al. (2001) transformaram plantas de *Citrus* para expressarem constitutivamente os genes *LFY* e *AP1* de *Arabidopsis*. Ambos os transgenes induziram a produção de flores e frutos férteis nas plantas transformadas já no seu primeiro ano de desenvolvimento, incluindo uma grande diminuição de sua fase juvenil.

Em *Populus trichocarpa*, Rottmann et. al (2000) isolaram um homólogo do gene *LFY* nomeado *PTLF*. Sondas antisense deste gene hibridizaram fortemente o meristema floral em desenvolvimento, tanto de plantas com flores masculinas como de plantas com flores femininas. Também se observou hibridização nas gemas vegetativas de ramificações maduras. Os resultados de hibridização indicaram a presença de transcritos nos meristemas laterais e nas axilas de folhas jovens, mas não no meristema apical vegetativo.

Em lianas perenes como a videira, o florescimento requer duas fases de crescimento: o florescimento é induzido em meristemas latentes durante o verão, mas a iniciação e o desenvolvimento floral acontecem durante a primavera (Carmona et al., 2002). O ortólogo do gene *LFY* em videira é o *VFL* e, como em outras angiospermas, *VFL* é expresso em meristemas laterais, independentemente do destino final destes (Carmona et al., 2002). Isto sugere que *VFL* deve estar envolvido não somente na iniciação do florescimento, mas também no desenvolvimento das inflorescências, folhas e gavinhas. Transcritos de *VFL* acumulam-se nas margens

dos primórdios foliares e Carmona et al. (2002) sugeriram que nestas regiões *VFL* podem estar envolvidos na manutenção da proliferação celular, auxiliando a gerar a forma palmada das folhas de videira.

Outro papel sugerido ao gene *LFY* é sua participação na construção arquetípica do ramo floral, que pode formar uma única flor ou uma inflorescência contendo inúmeras flores por eixo. Shu et al. (2000) sugeriram o envolvimento de *LFY* na definição destas características em um estudo comparativo entre *Arabidopsis*, que produz uma inflorescência contendo flores não precedidas por brácteas, e uma espécie aparentada, *Jonopsidium acaule*, que produz flores solitárias protegidas por brácteas. Foram isolados de *J. acaule* dois homólogos do gene *LFY*: *vcLFY1* e *vcLFY2*, que devido à relativa diferença das seqüências de seus introns e à notável semelhança de seus exons, denotam uma recente duplicação paráloga do gene *LFY* nesta espécie (Shu et al., 2000). A análise da expressão de *vcLEAFY1* em *J. acaule* evidenciou a presença de transcritos nas brácteas e no meristema apical vegetativo, bem como nos meristemas florais. Os autores atribuíram esta diferença temporal e espacial da expressão dos homólogos de *LFY* nesta espécie à produção de flores solitárias.

1.3 Qual o papel ancestral e o verdadeiro papel biológico atual do gene *LFY*?

A clonagem de homólogos do gene *LFY* em espécies não-angiospermas o torna um candidato ideal para estudos sobre a evolução e o surgimento das flores. Partindo-se inicialmente das gimnospermas, o isolamento e caracterização da expressão de homólogos de *LFY* em *Pinus radiata* (Mellerowicz et al., 1998;

Mouradov et al., 1998) demonstrou a presença de um parálogo ao gene *LFY*, nomeado de *NEEDLY (NLY)* cuja expressão é mais evidente nos cones femininos, enquanto o ortólogo ao *LFY (PRFLL)* teve alta expressão detectada nos cones masculinos. Estes resultados permitiram o desenvolvimento de uma teoria para o surgimento das flores que postula que uma vez que as angiospermas perderam o parálogo *NEEDLY* e mantiveram *LFY* e, se em gimnospermas esses dois genes parecem discriminar cones femininos de cones masculinos, respectivamente, sugere-se que as flores hermafroditas típicas de angiospermas se originaram a partir das estruturas masculinas de gimnospermas. Assim, pela origem essencialmente “masculina” das flores hermafroditas, esta teoria foi denominada “*The Mostly Male Theory*” (Frohlic & Parker, 2000)

Ao caracterizar os homólogos de *LFY* em *Gnetum parvifolium*, Shindo et al. (2001), demonstraram com hibridizações *in situ* a expressão do homólogo *GpLFY* nos primórdios dos estróbilos femininos desta espécie. Uma vez que *GpLFY* é um ortólogo de *LFY*, assim como *PRFLL*, seu padrão de expressão contradiz a teoria “*Mostly Male*”. Da mesma maneira, em Pinaceae (*Picea*, *Podocarpus* e *Taxus*), a presença de transcritos de homólogos de *LFY* e *NLY* foi observada nas estruturas reprodutivas femininas dos 3 gêneros estudados. Igualmente, foi detectada a presença de *NLY* nos primórdios de cones masculinos (Vázquez-Lobo et al., 2007).

Alternativamente à teoria “*Mostly Male*” existem outras duas teorias. A teoria de Albert parte do pressuposto que as proteínas *NLY* e *LFY* possuem funções idênticas nas Gimnospermas. As diferenças encontradas no padrão de expressão destas proteínas são devido às diferenças significativas encontradas entre os promotores dos dois genes (Albert et al., 2002).

A segunda teoria, “*Out of Male*”, (Theißen & Becker, 2004) parte do pressuposto que mutações homeóticas, principalmente devido a mudanças na expressão do fator B, foram responsáveis pelo surgimento de estruturas hermafroditas em gimnospermas, que por sua vez deram origem às flores.

Ceratopteris richardii, uma pteridófita, possui duas cópias de *LFY*, nomeadas de *CrLFY1* e *2*, cujo padrão de expressão analisado por Northern Blot demonstrou que transcritos de ambos os genes foram encontrados tanto no ápice do meristema vegetativo como no ápice do meristema reprodutivo e nas folhas reprodutivas. Uma expressão mais reduzida de *CrLFY1* e *2* também foi detectada em outros tecidos incluindo os brotos vegetativos, raízes e gametófitos (Himi et al., 2001). Porém, estes dados comparados com o padrão de expressão de genes MADS nesta mesma espécie (Haseb et al., 1998) são incongruentes, sugerindo que *CrLFY1* e *2* não induzem diretamente os genes MADS-box de *Ceratopteris* (Himi et al., 2001) .

Em plantas mais basais, Tanahashi et al. (2005) analisou a presença de duas cópias de *LFY* no musgo *Physcomitrella patens*. Com uma construção contendo o gene GUS (β - glucosidase) inserido logo após o códon STOP de uma das cópias de *LFY* (*PpLFY1*) e em frame no segundo éxon do parálogo (*PpLFY2*), foi possível observar a expressão destes genes ao longo do ciclo de vida desta briófita. Concluiu-se que ambos apresentam um padrão de expressão muito parecido, fazendo-se presente no desenvolvimento do arquegônio, mas não no do anterídeo e em todo o esporófito depois da fecundação. Em linhagens onde ambos os genes foram alterados, produziram-se esporófitos com más formações, o que indica o papel destes homólogos no desenvolvimento do zigoto, sugerindo uma divergência de função de *LFY* em briófitas.

Desta forma, quando Maizel et al. (2005) tentou transformar mutantes *lfy* de *Arabidopsis* com o gene *PpLFY1*, as plantas mutantes permaneceram inalteradas. Da mesma maneira, em experimentos de microarranjo comparando o padrão de expressão entre plantas selvagens de *Arabidopsis* e mutantes *lfy* complementados com *PpLFY* sobre o controle do promotor do *LFY* nativo de *Arabidopsis*, demonstrou-se que *PpLFY* não foi capaz de ativar nenhum dos genes que são normalmente ativados por *LFY*. Ainda, em ensaios com leveduras, foi possível concluir que a proteína *PpLFY* é incapaz de se ligar aos promotores de *AP1* ou *AG*. Neste mesmo trabalho, Maizel analisou ainda homólogos de *LFY* de pteridófitas, gimnospermas e de duas angiospermas, ervilha e petúnia. Com os experimentos de complementação de mutantes *lfy* de *Arabidopsis*, microarranjos e ensaios com leveduras, o que se observou foi uma perda gradativa de conservação das funções dos homólogos de *LFY*, à medida em que os homólogos testados são oriundos de clados cada vez mais distantes filogeneticamente de *Arabidopsis*. Os autores sugeriram que estas modificações gradativas na capacidade de ativação gênica conservada são devido a mutações no domínio de ligação com o DNA dos homólogos de *LFY* nas espécies estudadas.

1.4 Gavinhas, flores e inflorescências: Espécies de *Passiflora* como um modelo para o estudo da evolução da função do gene *LFY*.

Há mais de 600 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*, a maioria originária de regiões neo-tropicais (Kugler & Kind, 2004; Ulmer & MacDougal, 2004). Este gênero apresenta características morfológicas que o torna interessante para o

estudo da evolução da função do gene *LFY*, pois possui estruturas como inflorescências ou flores solitárias, gavinhas, folhas trilobadas, nas quais o desenvolvimento está provavelmente relacionado com a atuação deste gene. Assim, enquanto algumas espécies de *Passiflora* possuem várias flores organizadas em inflorescências, outras produzem flores solitárias (Figura 2), outras ainda possuem inflorescências contendo uma mistura de flores e gavinhas, de onde surgiu a sugestão de que as gavinhas em *Passiflora* poderiam ser oriundas de uma variação morfológica de estruturas florais (Krosnick & Freudenstein, 2005). Para este trabalho, foram escolhidas duas espécies divergentes, pertencentes ao gênero *Passiflora* e que apresentam uma associação diferente das características potencialmente controladas pelo gene *LFY*. Uma delas é *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg., que pertence ao subgênero *Passiflora* e apresenta diferenciação morfológica vegetativa com a passagem gradual do estado juvenil para o adulto (substituição de folhas simples por folhas trilobadas e produção de gavinhas nas plantas maduras) e possui flores solitárias. A outra espécie estudada, *P. suberosa* L., pertencente ao subgênero *Decaloba*, superseção *Cieca* e possui suas flores arranjadas em uma inflorescência e não apresentam variações notáveis na transição para a vida adulta (cerca de 2 a 3 flores por inflorescência; (Ulmer & MacDougal, 2004).

Além da oportunidade única de se estudar estas características presentes nestas espécies de *Passiflora*, o que não seria possível em espécies-modelo como *Arabidopsis*, já foram relatados protocolos otimizados de organogênese direta *in vitro* para ambas as espécies (Scorza & Janick, 1980; Dornelas e Vieira 1994) e protocolos eficientes de transformação genética mediada por *Agrobacterium* também estão disponíveis (Manders et al., 1994).

Portanto, torna-se possível a aplicação de técnicas de transformação genética visando à manipulação da expressão dos homólogos de *LFY* em *Passiflora* para estudos do seu papel biológico.

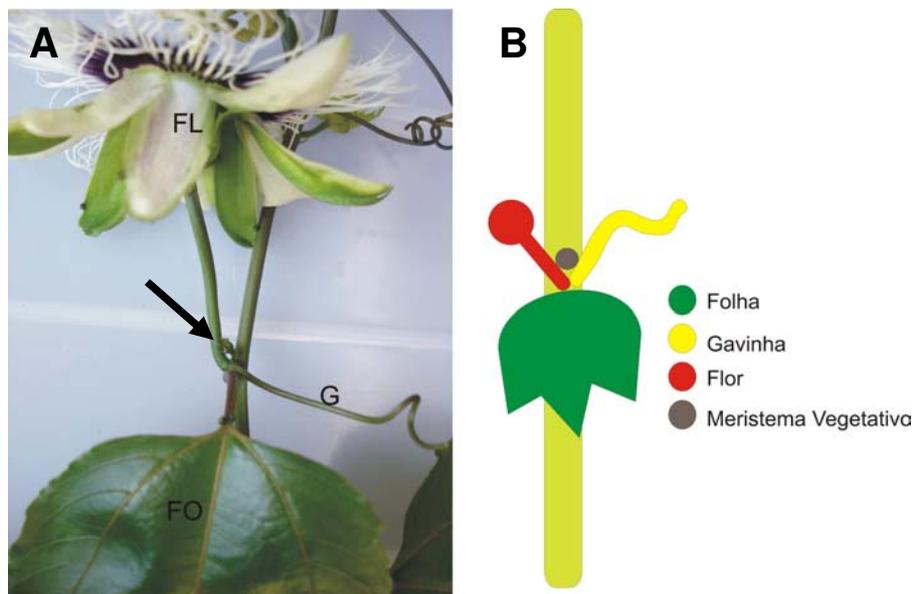


Figura 2: A- Nó de um ramo de *P.edulis*. B- Esquema representativo deste nó. FL:Flor, Fo: Folha; G:Gavinha; a seta mostra a gema vegetativa.

II OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a análise morfoanatômica do desenvolvimento reprodutivo e o estudo da função de homólogos do gene *LFY* na morfogênese de gavinhas, inflorescências e flores solitárias em *Passiflora*. Os objetivos específicos, foram: a clonagem, de fragmentos de homólogos do gene *LFY* de duas espécies divergentes de *Passiflora*: *P. edulis* e *P. suberosa*; o estudo do padrão de expressão destes homólogos em *Passiflora*. Adicionalmente, pretendeu-se a manipulação dos padrões de expressão destes homólogos de *LFY* nas espécies de *Passiflora* mencionadas com a obtenção de plantas transgênicas contendo uma construção de superexpressão do gene *LFY* de *Arabidopsis*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Ápices contendo meristemas vegetativos de plantas juvenis e adultas bem como ápices contendo meristemas reprodutivos em estágio inicial de desenvolvimento foram coletados de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg. e *P. suberosa* L., cultivadas em casa de vegetação e nos campos experimentais do Departamento de Fisiologia Vegetal, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, SP.

3.2. Microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material foi fixado a vácuo, em 4% paraformaldeído (p/v), por 24h a 4°C. A seguir foi desidratado em série etílica, posteriormente foi emblocado em resina plástica (Historesin, Leica), segundo as instruções do fabricante e secções de 3-5 µm foram obtidas com o uso de micrótomo rotativo, fixadas em lâminas e corados com azul de toluidina a 0,05% (p/v), em tampão de tetraborato de sódio, e observadas em microscópio ZEISS modelo AXIOSKOPE. O material a ser submetido à MEV, após fixação e desidratação foi seco ao ponto crítico, dissecado sob lupa binocular com auxílio de pinças e agulhas; montado em suportes metálicos com fita adesiva dupla-face e metalizado com ouro coloidal (Balzers Sputter; camada de 30nm). A observação foi feita em microscópio de varredura LEO 435 VP no NAP/MEPA (ESALQ/USP, Piracicaba, SP).

3.3. Clonagem e análise de fragmentos de seqüência dos homólogos do gene *LFY* em *Passiflora*

As duas espécies estudadas tiveram seu DNA genômico extraído pela técnica do CTAB (2% CTAB; 1,4M NaCl; 100mM Tris-HCL pH 8,0; 20mM EDTA pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona MW 10.000), segundo a literatura (Doyle & Doyle, 1990). Amostras de DNA genômico foram utilizadas como molde na reação cíclica da polimerase (PCR), com utilização dos Primers LA: 5'-CGGAYATIAAYAARCCI AARATGMGICAYTA-3' e LB: 5'-CGGATCC GTGICKIARIYKIGTIGGIACRTA-3' (Frohlich e Meyerowitz 1997), sob as seguintes condições: extensão inicial por 3min a 94°C, 35 ciclos de 45seg a 94°C; 1min a 50°C e 1min a 72°C. Estes primers já foram testados para a clonagem de homólogos de *LFY* em um grande número de espécies de plantas, com resultados positivos em todos os casos (Dornelas e Rodriguez, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e os resultados obtidos foram documentados fotograficamente e analisados.

Os produtos de PCR que apresentaram entre 250-240pb, foram clonados no vetor pGem[®]T-easy (Promega[®]), de acordo com as especificações do fabricante. Células quimiocompetentes de *Escherichia coli* On Shot[®] Top10 (Invitrogen[®]) foram transformadas com os plasmídeos resultantes por choque térmico a 42°C por 1 min e colocadas em gelo logo em seguida. 250 ml de meio SOC líquido (2% Triptona, 05% Extrato de Levedura; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; 20mM glucose) foram adicionados à suspensão de bactérias e as mesmas foram mantidas a 37°C por 1h. Em seguida, os possíveis transformantes foram espalhados em placas contendo meio LB (Peptona 10g/l; Extrato de Levedura 5g/l; NaCl 5g/l; Agar

15g/l) suplementado com ampicilina (100mg/l), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside 3%) e IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside 100mM). Colônias brancas foram individualizadas e sub-cultivadas no mesmo meio e sob as mesmas condições. O isolamento de DNA plasmidial foi realizado com o PureLink Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Clones individuais foram seqüenciados com utilização do kit DYENAMIC (GE), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos das reações de seqüenciamento foram precipitados com etanol 95%, acetato de sódio 3M e glicogênio (1g.L^{-1}). Os precipitados foram lavados em etanol 75%, secos a vácuo e analisados em um seqüenciador 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), no Laboratório de Genômica do CENA/USP, em Piracicaba, SP.

Para investigar se as seqüências clonadas correspondiam a possíveis homólogos do gene *LFY* em *Passiflora*, buscas de similaridade de seqüência entre os clones obtidos e as seqüências dos bancos de dados públicos foram realizadas com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul et al.,1997). Para a construção da árvore filogenética, as seqüências de aminoácidos de homólogos de *LFY* de angiospermas e gimnospermas foram obtidas dos bancos de dados públicos (NCBI; www.ncbi.gov) e foram alinhadas com as seqüências de *Passiflora* com a utilização do 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 3.0 (Kumar et al., 2000). A solidez das árvores obtidas foi testada com cálculos de Bootstrap, em 1000 repetições.

3.4 Obtenção de plantas transgênicas de *P. edulis* e *P. suberosa* via *A. tumefaciens*

Inicialmente, germinaram-se sementes de *P. edulis* e *P. suberosa* previamente esterilizadas por 20 minutos em solução saturada de hipoclorito de cálcio e lavadas três vezes em água destilada autoclavada, em Meio de Germinação (MG; meio MS de Murashige & Skoog (1962), com metade da concentração de sais e vitaminas e solidificado com 2,5 g/l de Phytigel, Sigma) autoclavado. Estas sementes foram mantidas a 25°C, no escuro. Para a obtenção de explantes, os hipocótilos estiolados resultantes desta germinação (após cerca de 15 dias em cultura) foram seccionados em fragmentos de 0,5cm. Estes explantes foram inoculados em uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3850, contendo o plasmídeo pBIN 19 35S::GUS (McCabe et al., 1988) ou, alternativamente, pDW151 35S::LFY (Figura 3), plasmídeo que inclui a construção 35S::LFY (Weigel et al., 1992) em Meio de Indução (MI; meio MS de Murashige & Skoog, 1962, líquido, suplementado com 1µM 3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone [acetosseringona]). Para a obtenção do inóculo de *A. tumefaciens*, colônias bacterianas isoladas, crescidas em meio YEP sólido (10g/l de extrato de levedura, 10g/l de peptona, 5g/l de NaCl e 3g/l de ágar) e suplementado com os antibióticos kanamicina (25mg/l) e rifampicina (50mg/l), foram inoculadas no mesmo meio líquido, contendo a mesma concentração de antibióticos e mantidas no escuro a 28° sob agitação de 160rpm até uma OD^{600nm} de 0,5 a 1,0. Após atingirem este estágio de crescimento, este inóculo foi centrifugado a 5000rpm por 10 minutos, e o precipitado obtido foi ressuscitado em um volume de MI suficiente para uma OD^{600nm} final de 0,8.

Skoog, 1962, suplementado com 2 mg/l BAP; 10% água de coco; 200mg/l kanamicina; 300mg/l cefatoxima sódica [Timentin] e solidificado com 2,5 g/l de Phytigel, Sigma) renovado periodicamente a cada 15 dias, até a regeneração das plantas. As condições de regeneração de plantas inteiras de *Passiflora spp.*, via organogênese, foram descritas anteriormente (Dornelas & Vieira, 1994).

3.4.1 Seleção de transformantes

Para verificação da eficiência de transformação dos explantes com a construção contendo o gene GUS, utilizou-se o teste histoquímico da beta-glucuronidase (McCabe et al., 1988). Os materiais potencialmente transformados foram imersos em solução 1mM de 5-bromo-4chloro-3-indoyl β -d-glucuronic acid (X-Gluc) em tampão (100mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 10mM de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% Triton X-100) e mantidos a 37°C, durante 16 horas. Para a melhor visualização dos pontos azuis as amostras foram imersas em etanol 70% para remoção da clorofila.

As plântulas obtidas nos experimentos de transformação com o plasmídeo pDW151 (com a construção de superexpressão do gene *LFY* de *Arabidopsis*) tiveram seu DNA genômico extraído pela técnica do CTAB (2% CTAB; 1,4M NaCl; 100mM Tris-HCL pH 8,0; 20mM EDTA pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona MW 10.000) segundo a literatura (Doyle & Doyle, 1990). Amostras de DNA genômico, diluídas em uma concentração ótima de 200ng por reação, foram utilizadas como molde na reação cíclica da polimerase (PCR) com utilização dos primers 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' e 5'-ATCGGGAGG GGCGAT ACCGTA-3', sob

as seguintes condições: desnaturação inicial da fita a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de: 1min a 94°C; 1 min a 58°C; 1 min a 72°C e um período adicional de 10 min de extensão a 72°C. Esta reação visa a amplificação de um fragmento de 0,8 Kpb do gene *NPT-II* contido no plasmídeo pDW151 (Venkatachalam et al., 2000).

3.5 Análise da expressão de *PeLFY* e *PsLFY* via RT-PCR e hibridização *in situ*.

Para a realização da RT-PCR, RNAs totais dos tecidos das duas espécies foram isolados pelo método do Trizol (Invitrogen), com posterior tratamento com DNase turbo® e síntese do cDNA utilizando-se o kit “Super Script First Strand Synthase” (Invitrogen). Estas fitas de cDNA foram utilizadas como molde nas reações de PCR. Como controle da qualidade dos cDNAs sintetizados foram utilizados os primers 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' e 5'-ATCGGGAGGGGCGATACCGTA-3' que amplificam um fragmento de aproximadamente 750pb do gene constitutivo *ACTINA* em espécies de *Passiflora* sob as seguintes condições: desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C, seguida de 34 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 55°C e 1min a 72°C. Para a análise da expressão dos homólogos de *LFY* em *Passiflora*, foram utilizados os cDNAs obtidos em reações com os mesmos primers e condições descritas no item 3.3. Optou-se por uma reação saturada (35 ciclos) uma vez que esta análise é somente qualitativa.

As hibridizações *in situ* foram realizadas utilizando-se sondas não-radioativas, segundo as técnicas já descritas na literatura (Dornelas et al., 1999; 2000). As sondas foram obtidas a partir dos fragmentos de *PeLFY* e *PsLFY* obtidos como descrito no item 3.3. Para tal, os plasmídeos contendo os fragmentos foram

linearizados com a enzima PSTI (a 37°C por 1h). Sondas sense e antisense foram obtidas por transcrição *in vitro* pela enzima T7, em reação contendo uracila marcada com digoxigenina (DIG-UTP), segundo as instruções do fabricante do kit de marcação (Roche).

O material foi fixado a vácuo, em 4% paraformaldeído (p/v), por 24h a 4 °C. A seguir foi desidratado em série etílica, posteriormente foi emblocado em parafina, seccionados seriadamente (8 µm) e montados em lâminas de vidro cilanadas. Alternativamente, ápices meristemáticos de plantas na fase reprodutiva devidamente fixados e desidratados foram utilizados inteiros e diretamente na hibridização, de acordo com a técnica denominada hibridização tipo "whole mount".

A hibridização foi conduzida sob condições de estringência apropriadas. Os cortes de material emblocado foram desparafinados em baterias de xilol:álcool (3:1, 1:1, 1:3, álcool absoluto) e submetidos ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K [1µg/ml em 0,05M Tris HCl pH:7,5]. No caso dos tecidos hibridizados inteiros, estes foram re-hidratados em série etílica reversa e posteriormente submetidos ao tratamento de proteinase-K de maneira semelhante ao que se procedeu para os cortes histológicos. A visualização do sinal de hibridização foi obtida através de reação colorimétrica, utilizando-se anticorpos anti-DIG (1:1000) em tampão contendo 1M Tris-HCl; 5M NaCl; 1% Blocking agent (Roche) conjugados à fosfatase alcalina empregando um solução comercial de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) /BCIP(5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine) mais supressor (Levamisole 1mM) como substrato (Pierce). O material hibridizado foi observado em microscópio ZEISS modelo AXIOSKOPE ou lupa binocular Leica MDG30 e fotografado para documentação e posterior análise.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Descrição do desenvolvimento reprodutivo de *P. edulis* var. *flavicarpa* Deg e *P. suberosa* L.

A análise do desenvolvimento reprodutivo de *P. edulis* e *P. suberosa* observado em microscopia óptica e em microscopia eletrônica de varredura (Figura 4, 5, 6 e 7) permitiu a determinação da origem e a descrição das características das estruturas passíveis de terem seu desenvolvimento controlado por homólogos do gene *LFY* em *Passiflora*. Esta auxilia a interpretação dos resultados oriundos dos experimentos de expressão gênica por hibridização *in situ*.

Passiflora edulis

Os produtos do meristema apical foram originados de maneira espiralada (Figura 5). A Figura 4 mostra a orientação, posicionamento e identidade das estruturas documentadas na Figura 5A para uma melhor compreensão. Na fase reprodutiva, o meristema apical caulinar produziu primórdios de folha (P), que, por sua vez, originam os primórdios das estípulas (ES) e da folha propriamente dita (FO). Na região adaxial, na axila do primórdio foliar, observou-se um conjunto de células que compuseram um meristema axilar alongado, no sentido da largura do primórdio foliar. Este meristema axilar dividiu-se para formar, do lado direito (observando-se a partir do meristema apical), o meristema floral, cujo primeiro primórdio formado, foi o da bráctea abaxial. No lado esquerdo, formou-se o primórdio de gavinha.

Em *P. edulis*, observou-se a produção de apenas um meristema floral pelo meristema axilar. Notou-se claramente que a gavinha e o meristema floral possuem uma origem comum. Tal observação pode sugerir a participação do homólogo do

gene *LFY* de *P. edulis* no desenvolvimento das gavinhas, uma vez que em videira, o homólogo de *LFY*, *VFL*, é expresso em meristemas axilares, independentemente do destino final destes (Carmona et al., 2002). Segundo estes autores, isto sugere que *VFL* está envolvido não somente na iniciação do florescimento, mas também no desenvolvimento das inflorescências, folhas e gavinhas (Carmona et al., 2002).

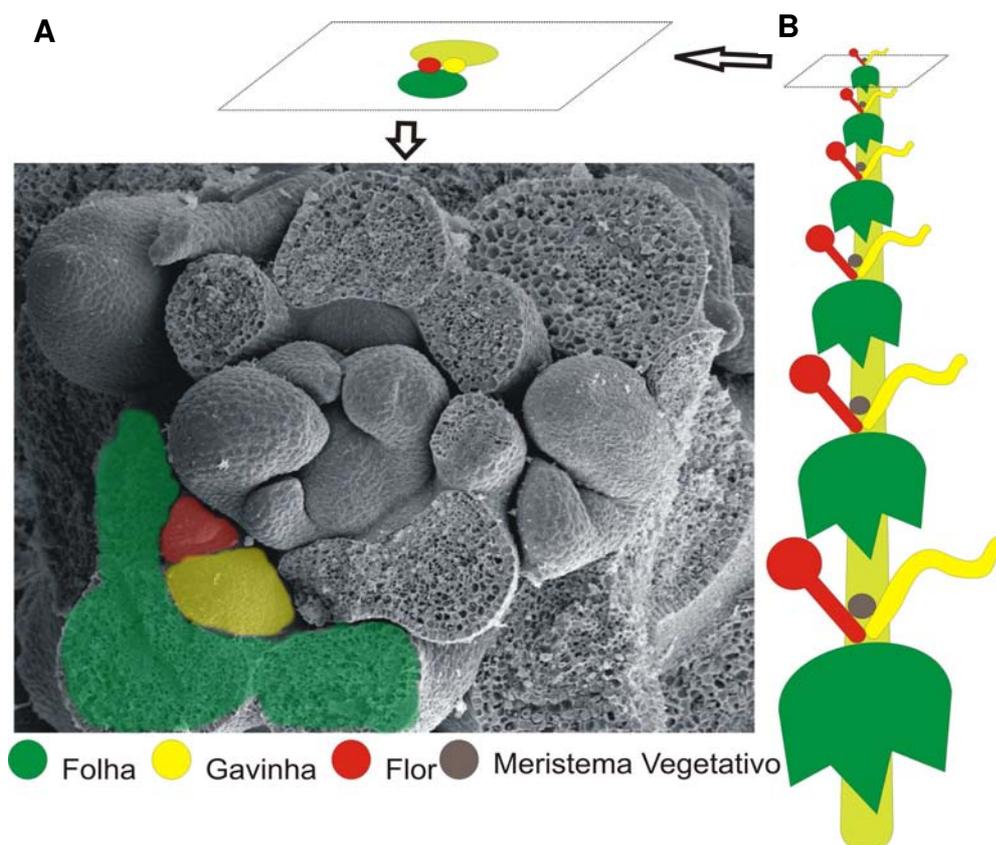


Figura 4: A-MEV do ápice caulinar em estágio reprodutivo de *P. edulis*. B- Esquema demonstrativo do ápice caulinar de *P. edulis* na fase reprodutiva.

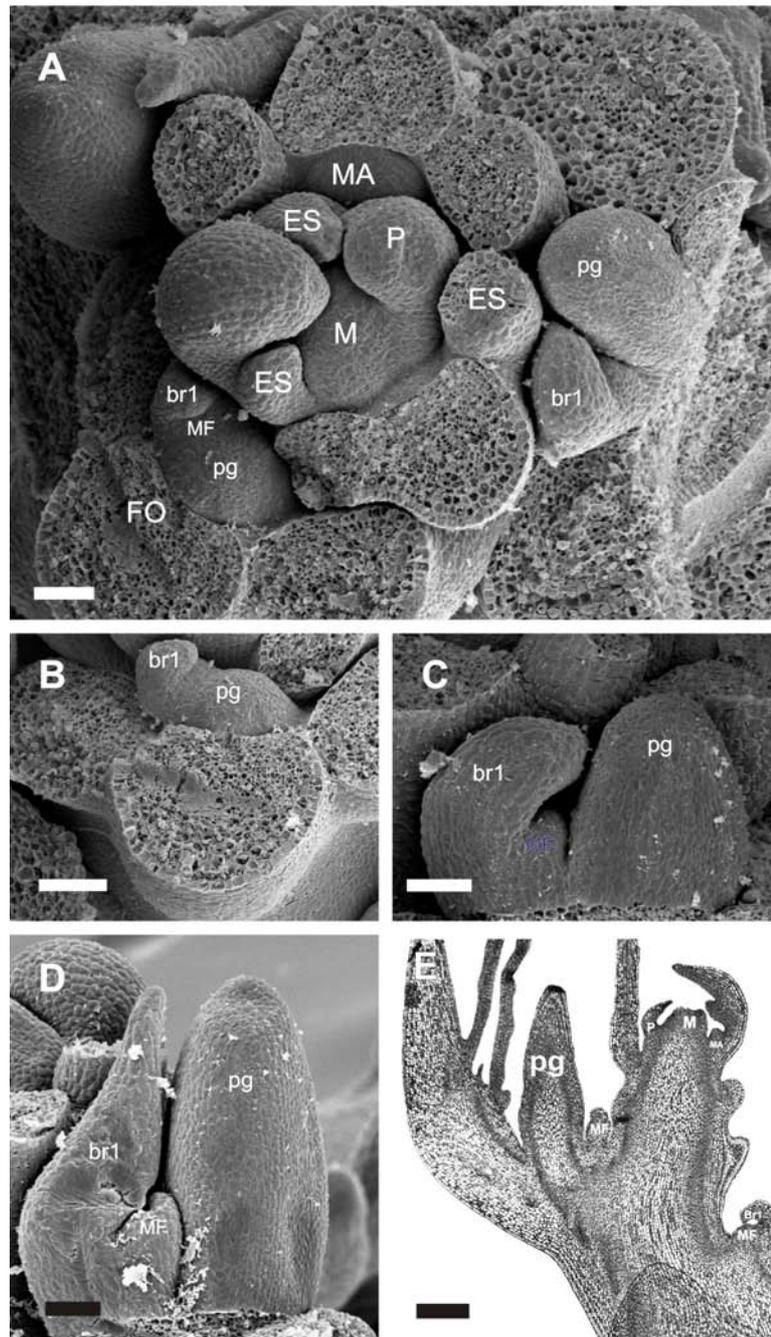


Figura 5: A- MEV do meristema apical de *P. edulis* na fase reprodutiva. B, C e D- mostram fases consecutivas da formação dos produtos oriundos do meristema axilar, com o desenvolvimento do meristema floral (protegido por brácteas) e do primórdio da gavinha. E- secção longitudinal mediano do meristema apical de *P. edulis* na fase reprodutiva. P: primórdio de folha e estípula, br1: primórdio da primeira bráctea; ES: primórdio de estípula; FO: primórdio de folha; M: meristema apical; MA: meristema lateral axilar; MF: meristema floral; pg: primórdio de gavinha, Barra=50µm.

Passiflora suberosa

Os produtos do meristema apical também são originados de maneira espiralada em *P. suberosa* (Figura 7). A Figura 6 mostra a orientação, posicionamento e identidade das estruturas documentadas na Figura 7A, para uma melhor compreensão. O primórdio da folha (P) se dividiu para formar os primórdios das estípulas (ES) e da folha propriamente dita (FO), assim como em *P. edulis*. Adicionalmente, também de maneira similar ao observado para *P. edulis*, na região adaxial do primórdio foliar de *P. suberosa*, observou-se a formação de um meristema axilar alongado. No entanto, diferentemente de *P. edulis*, este meristema axilar dividiu-se em três regiões distintas para formar, do lado direito (observando-se a partir do meristema apical), um meristema floral, na região central, um primórdio de gavinha e, do lado esquerdo, um segundo meristema floral. O segundo meristema floral possui desenvolvimento atrasado em relação ao primeiro, sugerindo a diferenciação seqüencial destas estruturas a partir do meristema lateral axilar. O primeiro primórdio formado pelos meristemas florais foi o de uma bráctea. Enquanto em *P. edulis* três brácteas protegem a flor, em *P. suberosa* apenas uma bráctea é formada. Eventualmente, meristemas florais adicionais foram observados na axila da bráctea em *P. suberosa*, enquanto em *P. edulis* as flores foram sempre solitárias.

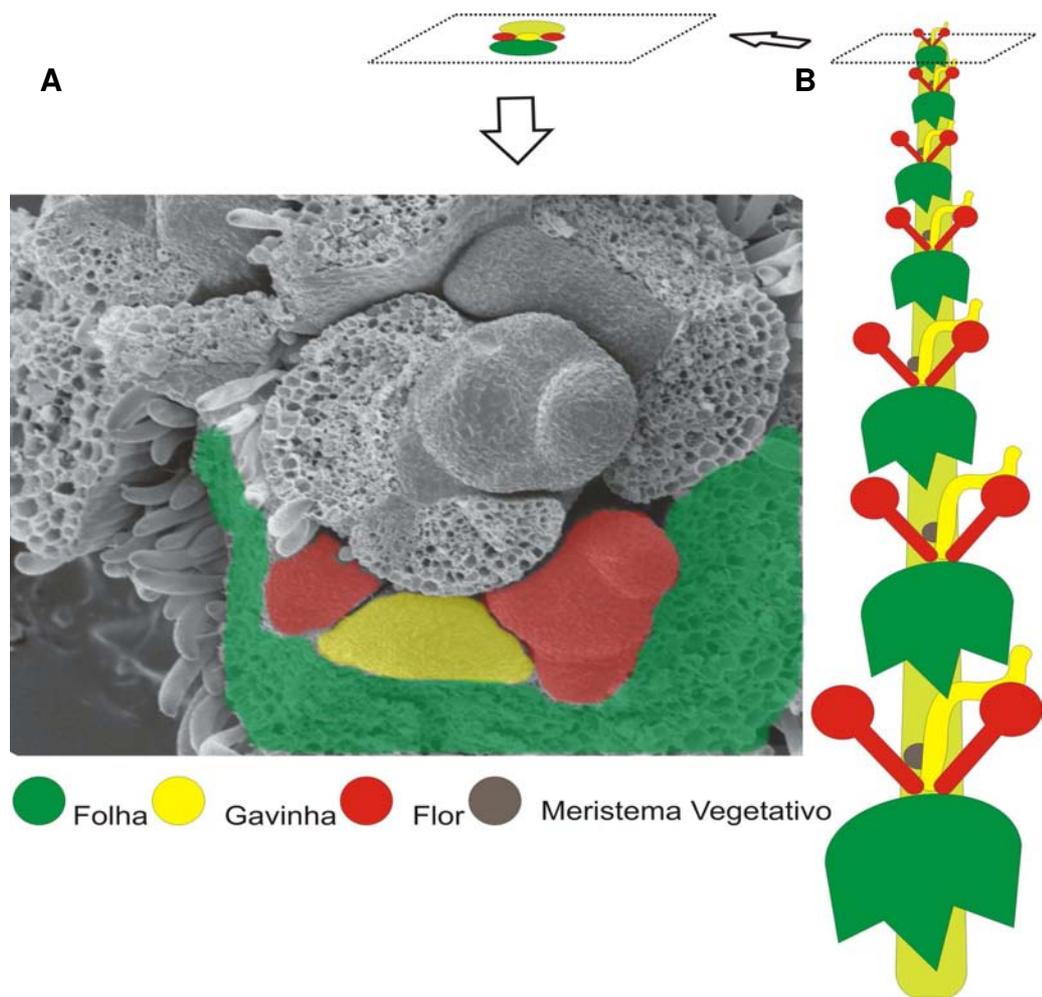


Figura 6: A- MEV do ápice caulinar em estágio reprodutivo de *P. suberosa*. B- Esquema demonstrativo do ápice caulinar de *P. suberosa* na fase reprodutiva.

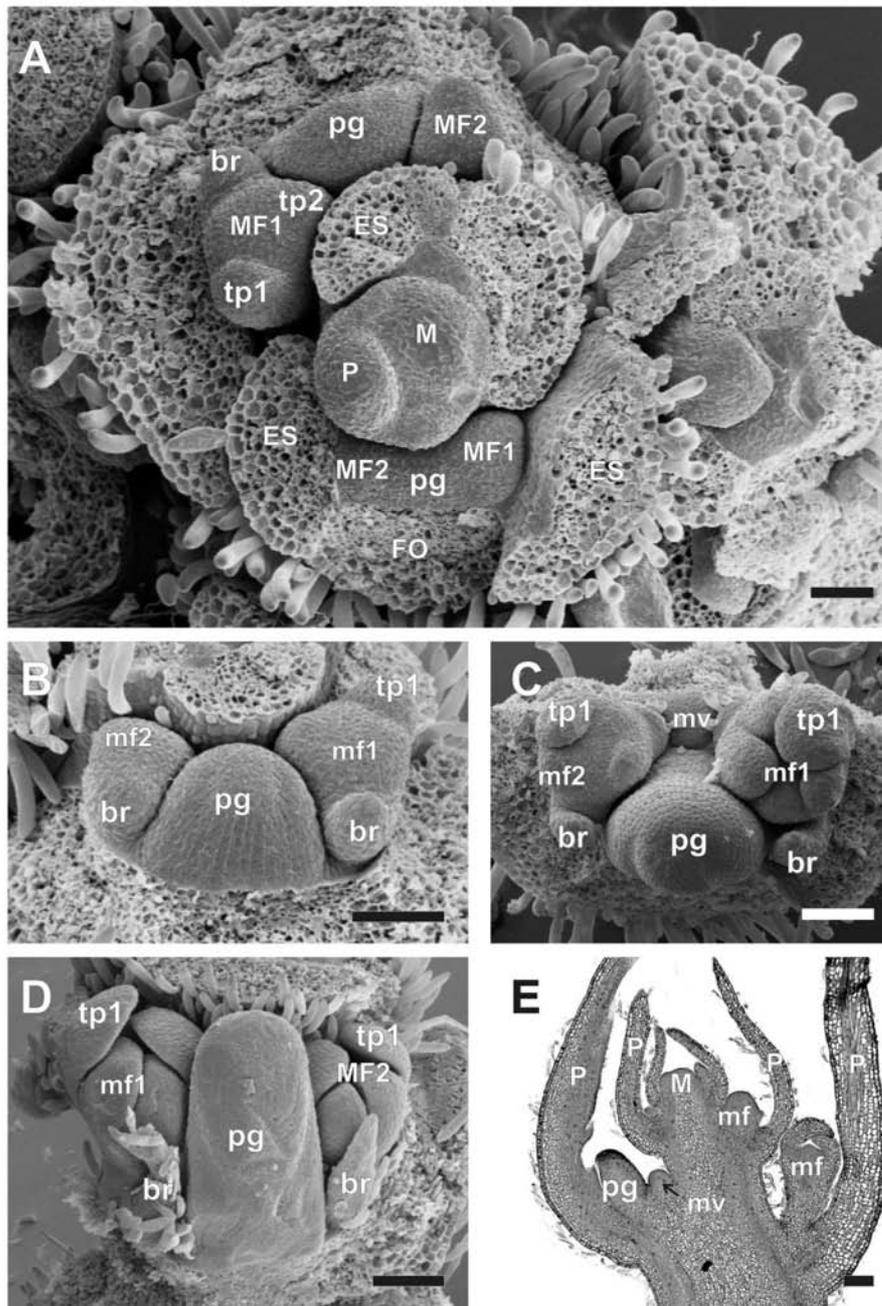


Figura 7: A- MEV do meristema apical de *P. suberosa* na fase reprodutiva. B, C e D- mostram fases consecutivas da formação dos produtos oriundos do meristema axilar, com o desenvolvimento de meristemas florais (protegidos por uma única bráctea) e do primórdio da gavinha. E- corte longitudinal mediano do meristema apical de *P. suberosa* na fase reprodutiva. P: primórdio de folha e estípula br: primórdio da bráctea; ES: primórdio de estípula; FO: primórdio da folha propriamente dita; M: meristema apical; MF1: primeiro meristema floral; MF2: segundo meristema floral; pg: primórdio de gavinha; mv: meristema lateral vegetativo; P: primórdio da folha; tp1: primórdio da primeira tépala, Barra=50µm.

Um resultado intrigante obtido da caracterização do desenvolvimento reprodutivo em *P. edulis* e *P. suberosa* foi a observação da origem compartilhada entre os meristemas florais e o primórdio da gavinha (Figuras 5A e 7A). Esta origem comum dos meristemas florais e dos primórdios de gavinha também foi observada em videira (*Vitis vinifera*), onde o desenvolvimento reprodutivo é bem caracterizado, inclusive do ponto de vista molecular (Calonje et al., 2004; Carmona et al., 2002; 2008). Em videira, sugere-se que as gavinhas sejam flores modificadas e que as mesmas sejam componentes estruturais da inflorescência, recrutados durante a evolução das espécies de *Vitis* (Carmona et al., 2002). Desta forma, é plausível sugerir a ocorrência de evolução convergente das gavinhas, em famílias tão divergentes como Passifloraceae e Vitaceae, possivelmente fundada nos mesmos processos moleculares. Estes processos provavelmente baseiam-se no recrutamento de estruturas florais modificadas pela expressão diferencial de genes-chave do desenvolvimento floral, como os homólogos do gene *LFY* (veja os resultados do padrão de expressão dos homólogos de *LFY* em *Passiflora* nesta tese e também os resultados de Calonje et al., 2004; Carmona et al., 2002; 2008).

Ao contrário do observado para Vitaceae, a estrutura da inflorescência é muito pouco compreendida em Passifloraceae. As espécies com importância econômica, como *P. edulis*, *P. alata* e *P. quadrangularis*, pertencem ao subgênero *Passiflora*. Neste subgênero a maioria das espécies possui inflorescências reduzidas, geralmente produzindo apenas uma flor solitária. Esta característica é considerada derivada em relação ao observado para outras espécies do gênero (Ulmer & McDougal, 2004). *P. suberosa* pertence ao subgênero *Decaloba* e neste subgênero

a maioria das espécies possui inflorescências reduzidas contendo 2 a 3 flores (Ulmer & McDougal, 2004). A análise da estrutura das inflorescências de espécies de gêneros considerados basais na família, como *Adenia*, *Paropsia* e *Mitostemma* levou Krosnick & Freudenstein (2005) a sugerirem um modelo básico de inflorescência para Passifloraceae com duas características principais: a presença de um eixo alongado de primeira ordem, que freqüentemente termina em uma gavinha, e ramificações laterais de ordens superiores que resultam em um cimo composto.

Modelos moleculares que tentam explicar os mecanismos que originam modificações das estruturas das inflorescências em plantas têm sido investigados (Prusinkiewicz et al., 2007). O modelo mais recente inclui um papel fundamental para homólogos do gene *LFY* na determinação do que os autores chamaram de "vegetativeness" que é a capacidade de proliferação celular característica do desenvolvimento indeterminado dos meristemas da inflorescência (Prusinkiewicz et al., 2007). A investigação do padrão de expressão do gene *LFY* em espécies divergentes de *Passiflora* poderá corroborar este modelo e sugerir mecanismos moleculares para a regulação das transições evolutivas entre inflorescências contendo muitas flores (e.g. como em *P. racemosa*, subgênero *Passiflora*), inflorescências contendo 2 flores (como na maioria das espécies do subgênero *Decaloba*) e inflorescências reduzidas a flores solitárias (como na maioria das espécies do subgênero *Passiflora*).

4.2 Clonagem de fragmentos dos homólogos do gene *LFY* em *Passiflora*

Com a utilização dos primers LA e LB nas condições de PCR descritas no item 3.3., foram obtidos, a partir do DNA genômico de *P. edulis* e *P. suberosa*, fragmentos de cerca de 250pb (Figura 8).

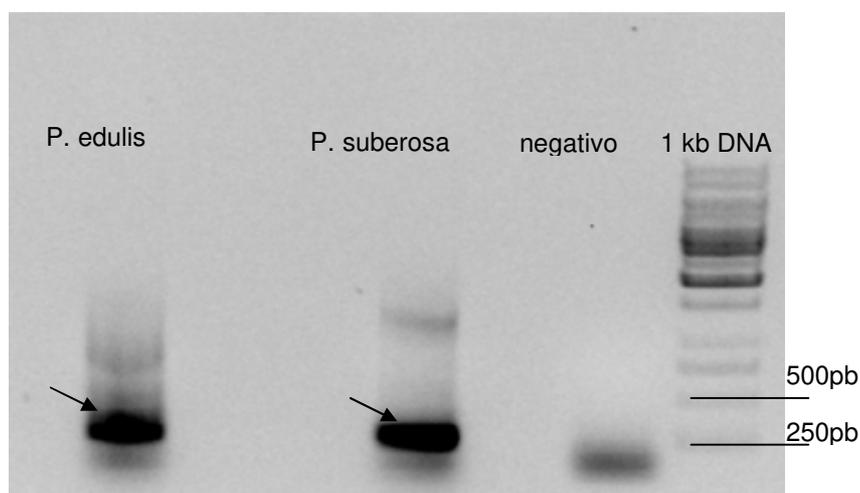


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1%) das reações de PCR contendo DNA genômico de *P. edulis* e *P. suberosa* como molde e os primers LA e LB. As setas indicam as bandas de ± 250 pb referentes à amplificação esperada com a utilização destes primers. O controle negativo corresponde a uma reação na qual não se adicionou DNA genômico.

Após a clonagem e seqüenciamento destes fragmentos, verificou-se que o fragmento obtido com os primers LA e LB para *P. suberosa* e *P. edulis* continham 235 nucleotídeos. O alinhamento destas seqüências mostrou uma diferença de 14 nucleotídeos que corresponde a uma diferença de 6% entre elas. Ambas apresentaram, uma similaridade média de 90% com a região do segundo exon do gene *LFY* de *A. thaliana*. Esta região codifica 74 aminoácidos. Ao se comparar a seqüência de aminoácidos entre as duas espécies estudadas notou-se que as

mesmas diferem em apenas 3 aminoácidos. A comparação com a seqüência protéica de LFY de *Arabidopsis* revelou uma diferença de 10 aminoácidos entre *Arabidopsis* e *P. edulis* e de 9 aminoácidos entre *Arabidopsis* e *P. suberosa* (Figura 9).

A seqüência de aminoácidos obtida para as duas espécies de *Passiflora* faz parte de uma região conservada e muito importante da região C-terminal da proteína LFY. Esta região é a responsável pela dimerização do fator de transcrição e pelo reconhecimento de seqüências específicas dos promotores dos genes nos quais LFY atua como regulador da expressão (Hamès et al.,2008).

As observações descritas acima sugerem que os fragmentos clonados representam fragmentos de ortólogos do gene *LFY* em *P. edulis* e *P. suberosa*. Assim, estes fragmentos foram denominados *PeLFY* e *PsLFY*, respectivamente.

CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\proteinseqs2.ps
Page 1 of 1

Date: Thu Jun 05 10:29:29 2008

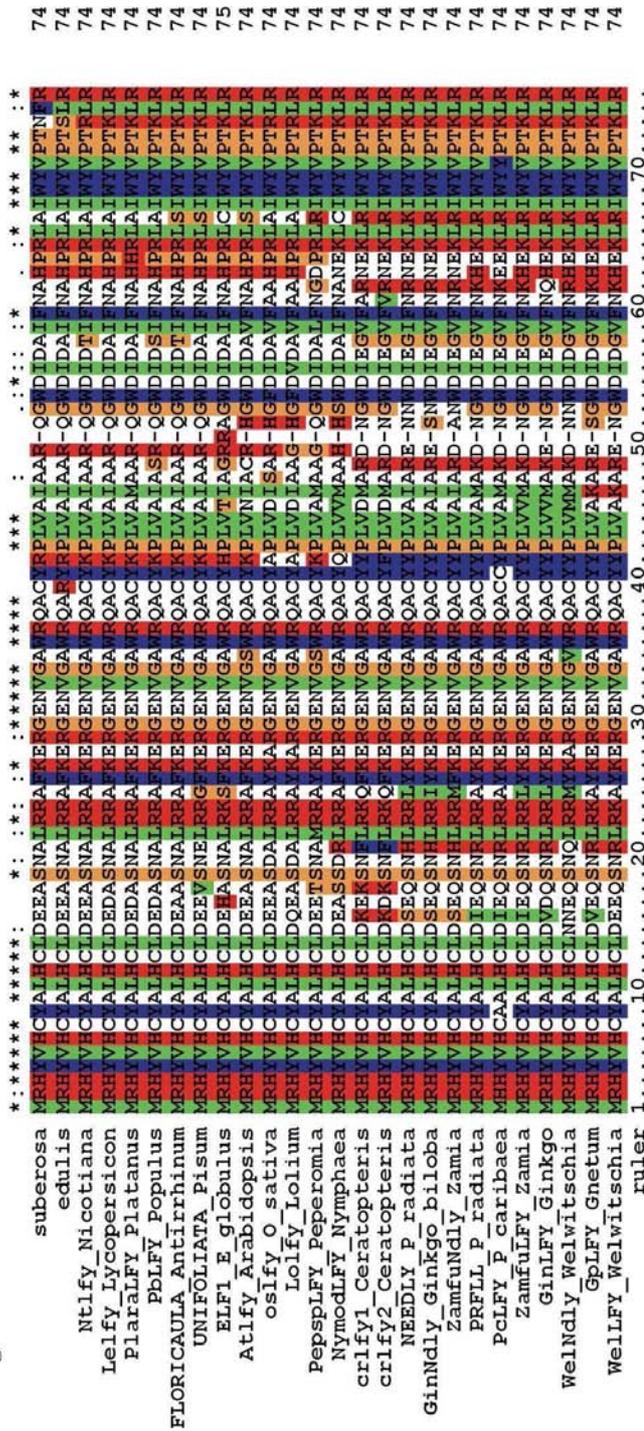


Figura 9: Alinhamento das seqüências de aminoácidos codificados pela região clonada dos genes *PeLFY* de *P. edulis* e *PsLFY* de *P. suberosa* com seqüências homólogas de espécies vegetais divergentes representativas de angiospermas e gimnospermas.

Uma análise filogenética comparativa entre as seqüências de aminoácidos codificadas por *PeLFY* e *PsLFY*, com seqüências de outras espécies (Figura 10), revelou as relações de similaridade entre elas. As seqüências de gimnospermas foram reunidas em um clado suportado por um valor de Bootstrap de 97%. Dentre as seqüências de angiospermas, as de monocotiledôneas gramíneas (*Lolium* e *arroz*) são mantidas num mesmo clado fortemente suportado (Bootstrap de 99%). Estas observações concordam com outras filogenias do gene *LFY* presentes na literatura (Frohlich & Meyerowitz, 1997; Dornelas & Rodriguez, 2005a; Maizel et al., 2005) e suportam a conservação de função do produto deste gene em angiospermas (Maizel et al., 2005). As seqüências dos homólogos de *LFY* de *P. edulis* e *P. suberosa* encontram-se num mesmo clado (Bootstrap de 96%), entre as seqüências de dicotiledôneas, concordando com suas posições filogenéticas relativas.

4.3 Expressão de homólogos do gene LFY em duas espécies de Passiflora.

4.3.1. RT-PCR

cDNAs foram sintetizados a partir de amostras de RNA total de folhas (F), raízes (R), caule (C), ápices contendo meristemas vegetativos de plantas juvenis, que produzem apenas primórdios foliares (MJ) e ápices contendo meristemas na fase reprodutiva, que produz primórdios de folhas trilobadas, primórdios de gavinhas e meristemas florais em diferentes fases de desenvolvimento (MR), das duas espécies de *Passiflora* estudadas. Estes cDNAs foram utilizados em reações de RT-PCR com os primers LA e LB, para determinar o padrão de expressão de *PeLFY* e *PsLFY* nestes tecidos. Como mostrado nas Figuras 11 e 12, apenas as amostras de cDNA de ápices de ramos reprodutivos apresentaram amplificação para os

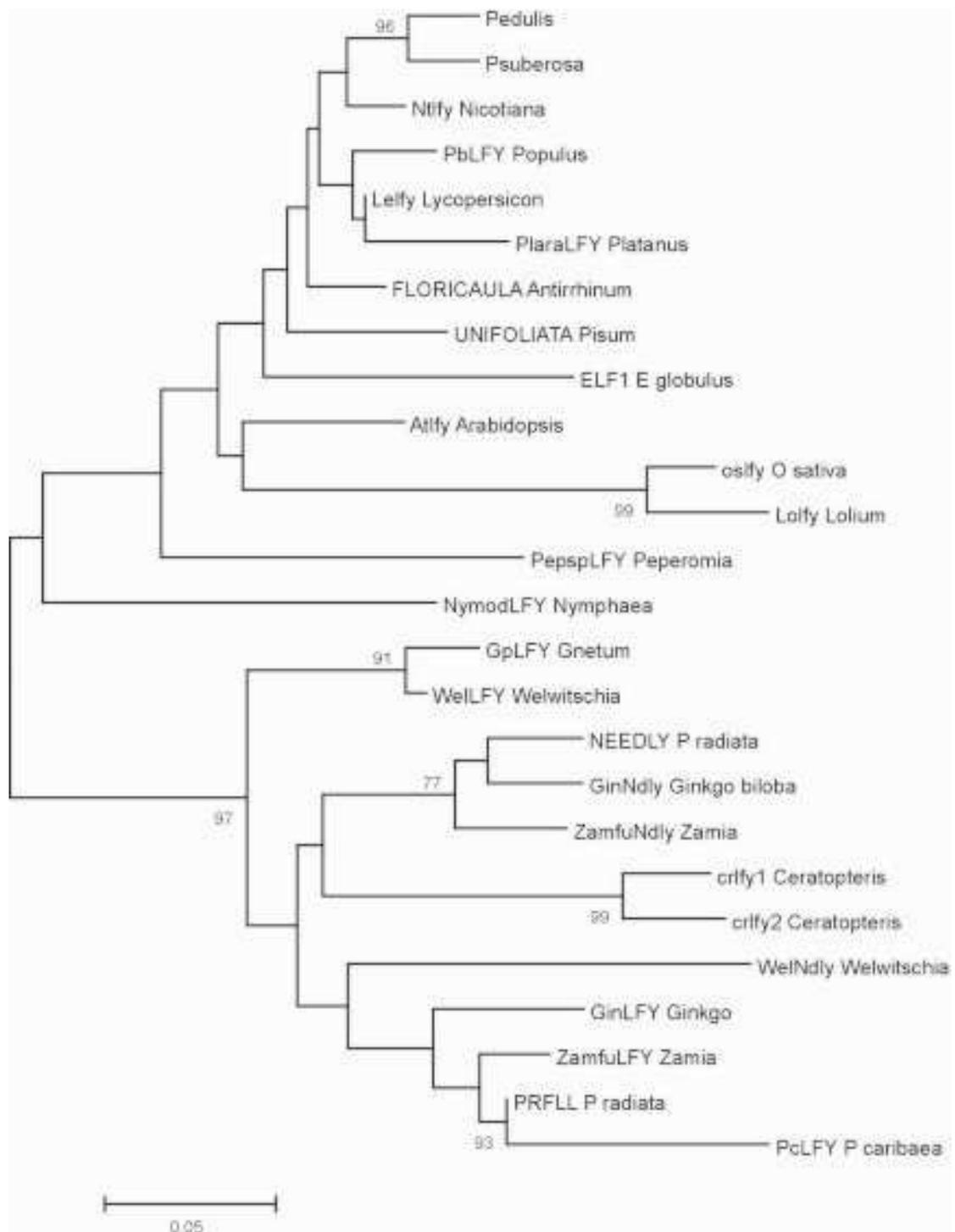


Figura 10: Análise filogenética oriunda das matrizes de distância calculadas a partir do alinhamento mostrado na Figura 9, compreendendo as seqüências deduzidas de aminoácidos da região C-terminal de homólogos de LFY de várias espécies, incluindo PeLFY de *P. edulis* e PsLFY de *P. suberosa*. Os valores mostrados são referentes aos cálculos de Bootstrap de 1000 repetições. Apenas valores de Bootstrap maiores que 70% são mostrados.

fragmentos de *PeLFY* (Figura 11) e *PsLFY* (Figura 12). Estes resultados indicam que os homólogos de *LFY* de *Passiflora* são expressos apenas em tecidos reprodutivos e não são expressos em tecidos vegetativos isolados (caule e folhas) de plantas maduras. Este resultado concorda com o observado para outras espécies vegetais para as quais o padrão de expressão de homólogos de *LFY* foram determinados, uma vez que a principal função relatada para o referido gene é sua participação na regulação da diferenciação do meristema floral (Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel et al., 1992; Weigel e Nilsson, 1995; Blázquez et al., 1997; Dornelas & Rodriguez, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b).

Ao contrário de *P. suberosa* que produz folhas trilobadas mesmo durante a fase juvenil, *P. edulis*, após a transição da fase juvenil para a fase adulta, deixa de produzir folhas simples e passa a produzir folhas trilobadas e gavinhas (Ulmer e MacDougal, 2004). Os resultados obtidos com os experimentos de RT-PCR descritos acima não permitem concluir se a expressão de *PeLFY* nos ápices reprodutivos está relacionada apenas com produção de tecidos reprodutivos, ou também na transição da fase vegetativa juvenil para a fase vegetativa adulta. Portanto um experimento adicional de RT-PCR foi realizado para a verificação da presença de transcritos de *PeLFY* com cDNA oriundo de tecidos de ápices contendo meristemas vegetativos adultos (MA), que produzem os primórdios das folhas trilobadas e primórdio de gavinha, em contraste com o meristema vegetativo juvenil (MJ) que produz primórdios de folhas simples e não produz gavinha.

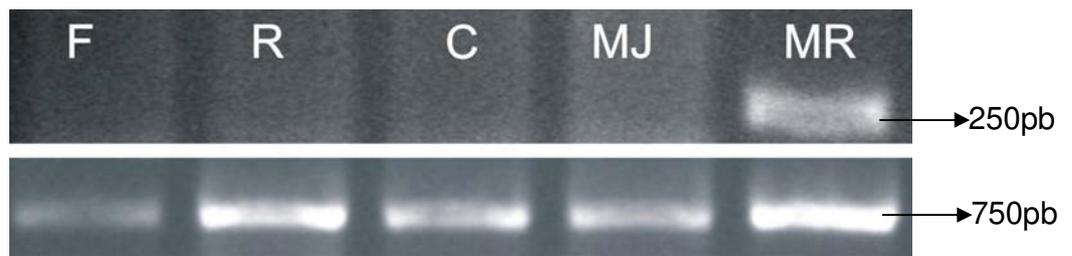


Figura 11: RT-PCR de diferentes tecidos de *Passiflora edulis*, no painel superior, a banda corresponde à amplificação do fragmento de *PeLFY*. No painel inferior, as bandas indicam amplificação do gene constitutivo *ACTINA*. F:folha, R:raiz, C: caule, MJ:ápices de plantas juvenis, MR:ápices de plantas na fase reprodutiva.

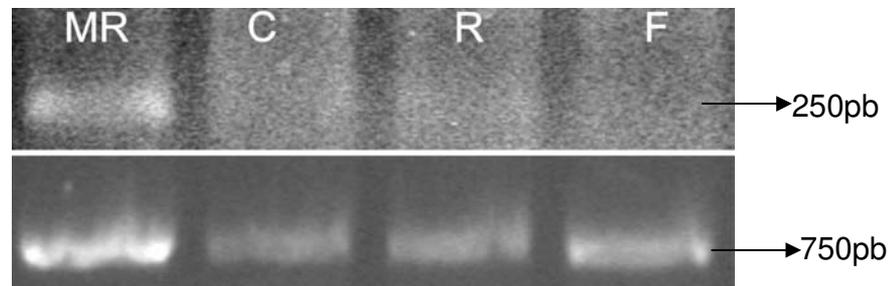


Figura 12: RT-PCR de diferentes tecidos de *Passiflora suberosa*, no painel superior, a banda corresponde à amplificação do fragmento de *PsLFY*. No painel inferior, as bandas indicam amplificação do gene constitutivo *ACTINA*. F:folha, R:raiz, C: caule, MR:ápices de plantas na fase reprodutiva.

Os resultados deste experimento complementar revelaram a amplificação de fragmentos do gene *PeLFY* nas amostras de ápices vegetativos maduros (Figura 13). Estes resultados indicam a expressão de *PeLFY* nestes tecidos, sugerindo a participação da proteína *PeLFY* no controle do desenvolvimento das estruturas não produzidas pelos meristemas vegetativos juvenis, como as folhas trilobadas e as gavinhas. A expressão de homólogos de *LFY* em tecidos vegetativos já foi relatada na literatura (Kelly et al., 1995; Pouteau et al., 1997; Molinero-Rosales et al., 1999; Shu et al., 2000; Ma et al., 2008; Guo & Yang, 2008). Em leguminosas, há evidências

da participação direta dos homólogos de *LFY* no desenvolvimento de estruturas vegetativas na diferenciação das folhas compostas e na formação de gavinhas (Hofer et al, 1997; Champagne et al., 2007; Wang et al., 2008). Resultados recentes de experimentos com plantas transgênicas de leguminosas têm demonstrado uma correlação entre a expressão dos homólogos de *LFY* e a modificação da complexidade da estrutura foliar. Plantas juvenis de soja produzem um primeiro par de folhas simples e opostas e, em seguida, apenas folhas compostas são produzidas em filotaxia espiralada (Champagne et al., 2007). Em plantas transgênicas de soja nas quais a expressão do homólogo de *LFY* de soja (*GmLFY*) foi reduzida, nós adicionais de folhas simples e opostas foram produzidas (Champagne et al., 2007). De forma similar, plantas de alfafa geralmente produzem folhas compostas com três folíolos, mas mutantes para o homólogo de *LFY* de alfafa (*SGL1*) produzem apenas folhas simples. Desta forma, é possível que a expressão de *PeLFY* e *PsLFY* nos meristemas vegetativos possa estar associada à diferenciação de folhas trilobadas nestas espécies, especialmente na transição de folhas juvenis simples para folhas adultas trilobadas em *P. edulis*.



Figura 13: RT-PCR de ápices de plantas de *P. edulis* em diferentes estágios de desenvolvimento. No painel superior, as bandas correspondem à amplificação de um fragmento do gene *PeLFY*. No painel inferior, as bandas indicam a amplificação de um fragmento do gene constitutivo *ACTINA*.

Adicionalmente aos fenótipos associados à complexidade das estruturas foliares, há ainda, tanto em leguminosas quanto em videira, relatos do papel de

homólogos de *LFY* na diferenciação das gavinhas (Hofer et al., 1997; Carmona et al., 2002). Mutantes de ervilha para o seu respectivo homólogo de *LFY* (*UNI*) além de produzirem folhas simples em substituição às folhas compostas, ainda não produzem gavinhas que, em ervilha, são folhas modificadas (Hofer et al., 1997). O homólogo de *LFY* de videira, *VFL*, se expressa nos estágios iniciais de desenvolvimento das gavinhas (Carmona et al., 2002). Assim, é possível que a expressão de *PeLFY* e *PsLFY* nos meristemas vegetativos maduros, que produzem primórdios de gavinhas, esteja relacionada à diferenciação destas estruturas em *Passiflora*.

Visando uma melhor compreensão do padrão de expressão de *PeLFY* e *PsLFY* durante o desenvolvimento reprodutivo em *Passiflora*, foram realizados experimentos de hibridização *in situ* em ápices vegetativos maduros e em ápices reprodutivos das espécies de *Passiflora* estudadas.

4.3.2 Hibridizações *in situ*

As hibridizações *in situ* revelaram o padrão de expressão dos genes *PeLFY* e *PsLFY* em ápices de *P. edulis* e *P. suberosa*, respectivamente (Figura 14 e 15). Verificou-se que em ambas as espécies os sinais de hibridização estão presentes nos primórdios foliares (FO) (Figuras 14A, E-G; 15A e F), no meristema axilar (ml) como um todo (Figuras 14F e G e 15F), e nos meristemas florais (mf) e nos primórdios de gavinha (ga) (Figuras 14B, C, H-J; 15B, D-J).

Nas duas espécies estudadas, os primórdios foliares apresentam sinal de hibridização para este gene com maior intensidade na região adaxial (Figuras 14E-G e 15F), e não foi detectada expressão nas estípulas (14A e 15B) que compartilham com as folhas a origem em um mesmo primórdio. O meristema axilar que dará

origem às flores e às gavinhas demonstrou expressar *LFY* em toda sua estrutura para as duas espécies, tanto na fase vegetativa, como na fase reprodutiva (14F e G e 15F, setas). Isto sugere a participação dos genes *PeLFY* e *PsLFY* no desenvolvimento das gavinhas e dos meristemas florais. Enquanto durante o seu desenvolvimento inicial, os primórdios de gavinha expressam *PeLFY* e *PsLFY* de maneira uniforme (Figuras 14E, I e 15B, E, I e F), nos estágios mais tardios, a expressão se limita a pontos de crescimento localizado como as regiões apicais e/ou as de contato (Figuras 14B e C).

No meristema floral, a expressão de *PeLFY* e *PsLFY* também é uniforme no início do desenvolvimento e se torna mais localizada durante o desenvolvimento dos órgãos florais (Figuras 14H-J; 15F-J). Em *P. suberosa*, a expressão é suprimida nos primórdios das brácteas logo após a sua formação (Figura 15 F e G), enquanto em *P. edulis* a expressão nestes órgãos continua até a formação dos primórdios florais (Figuras 14H-J). Este padrão de expressão diferencial poderia estar relacionado ao diferente número de primórdios de brácteas (1 em *P. suberosa* e 3 em *P. edulis*) ou ao fato das brácteas florais de *P. edulis* produzirem nectários extra-florais, enquanto estas estruturas estão ausentes na bráctea floral de *P. suberosa*. Uma observação contrária a esta última hipótese é o fato dos nectários extra-florais das folhas de *P. suberosa* não expressarem *PsLFY* (Figura 15C).

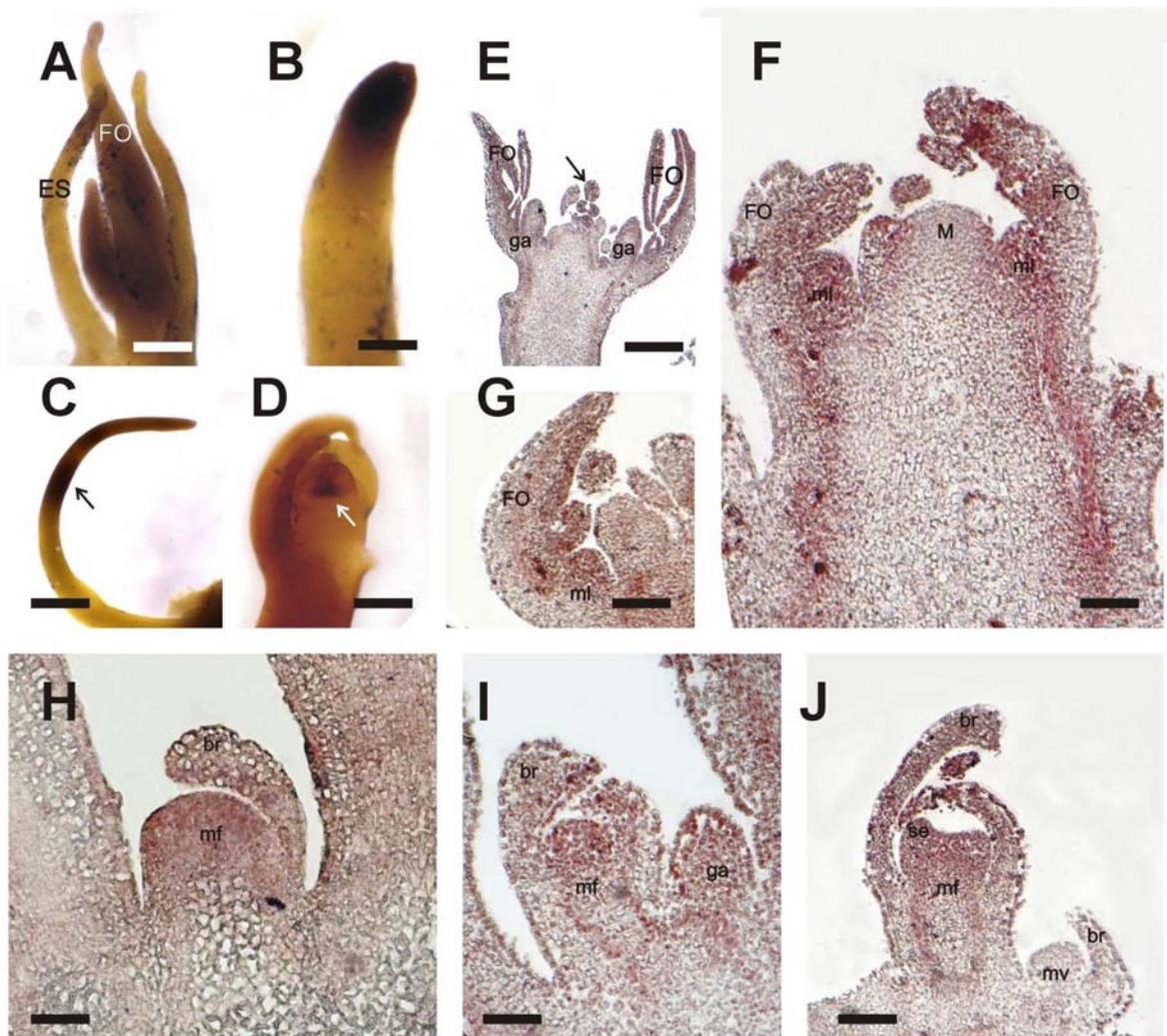


Figura 14: Hibridizações *in situ* tipo “whole mount” e em cortes histológicos de *P. edulis* com a sonda de *PeLFY*. A-D Hibridizações tipo “whole mount”. (A) Primórdio foliar, note que não há expressão nas estipulas. (B) Apice do primórdio de uma gavinha. (C) Primórdio de gavinha em desenvolvimento. Note a expressão em regiões localizadas (seta). (D) Meristema floral. A seta aponta o sinal de hibridização nas regiões internas. (E) Ápice caulinar. Note a presença de transcritos nos primórdios foliares (FO e seta) e nos primórdios de gavinha. (F) Hibridização *in situ* do ápice de *P. edulis* no qual a região adaxial dos primórdios foliares está marcada bem como os meristemas axilares. (G) Meristema axilar e primórdios foliares hibridizados. (H) Meristema floral e primórdio de bráctea. (I) Meristema floral e primórdio de gavinha. (J) Meristema Floral em um estágio mais desenvolvido com as brácteas e primórdios de sépalas mostrando sinal de hibridização. Note a ausência de sinal no meristema vegetativo. Barras: A, C e D: 1mm; B e E: 400 μ m; F, G e J: 100 μ m; H: 50 μ m; I:80 μ m; br: primórdio de bráctea; ES: estipulas; FO: primórdio de folha; ga: primórdio de gavinha; M: meristema apical caulinar; mf: meristema floral; ml: meristema axilar; se: primórdio de sépala.

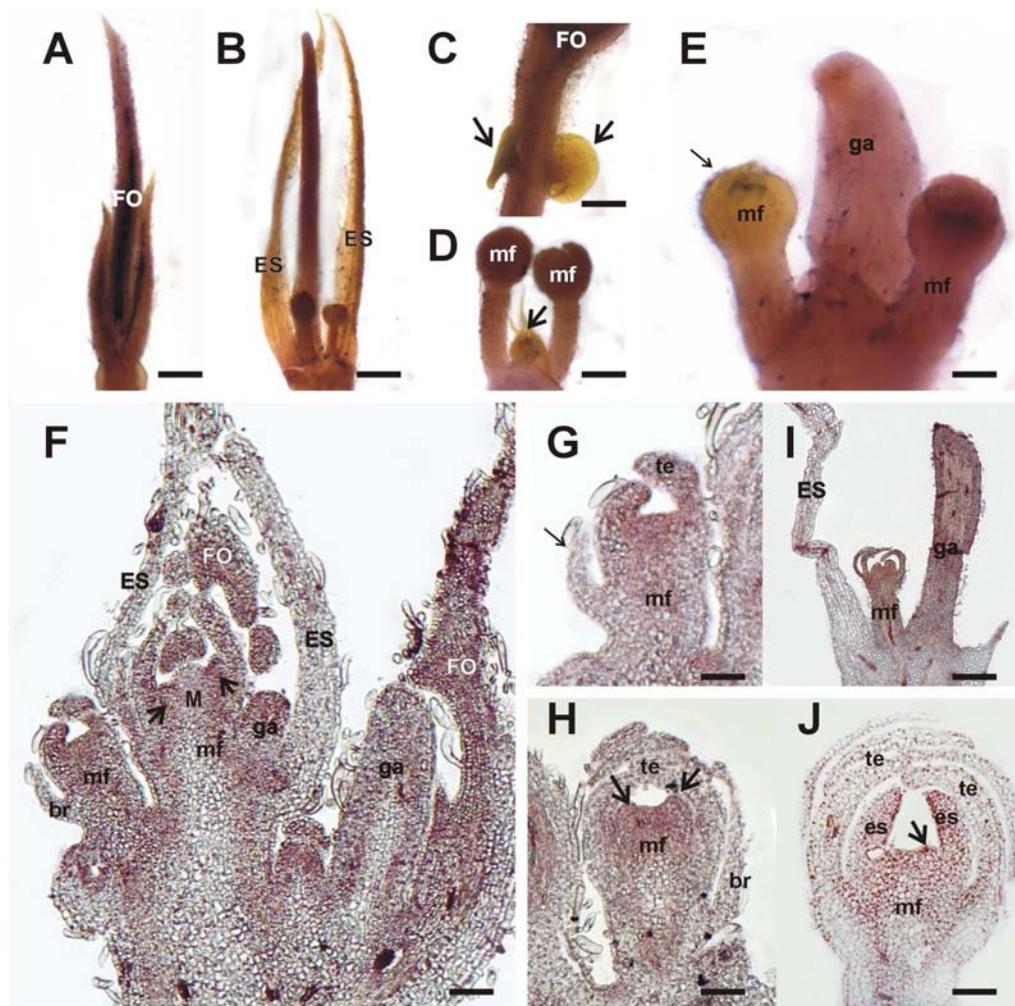


Figura 15: Hibridizações *in situ* tipo “whole mount” e em cortes histológicos de *P. suberosa* com a sonda de *PsLFY*. (A) Hibridização “whole mount” do primórdio foliar. (B) Hibridização “whole mount” de um nó com estipulas, flores e gavinhas, não há marcação nas estipulas. (C) Base de uma folha mostrando a ausência de sinal de hibridização nos nectários extra-florais (setas). (D) Inflorescência e meristema lateral vegetativo. Note a ausência de sinal no meristema vegetativo (seta). (E) Conjunto de inflorescência e primórdio de gavinha. Um dos meristemas florais não mostra sinal de hibridização (seta) e seu desenvolvimento provavelmente será abortado. (F) Ápice caulinar de *P. suberosa* aonde os meristemas axilares (setas), primórdios foliares e de gavinhas mostram sinal de hibridização. (G) Meristema floral no estágio de formação dos primórdios de tépalas com marcação mais evidente na região central e nos primórdios e mais fraca na bráctea (seta). (H) Meristema floral em estágio de formação dos primórdios dos estames (setas) com marcação evidente nestes. (I) Meristema floral e primórdio de gavinha. (J) Meristema floral no estágio de formação dos primórdios de carpelos (seta). Barras: A, B e I: 1mm; C e D: 0,4mm; E, H e J: 200 μ m; F: 300 μ m; G: 150 μ m; br: primórdio de bráctea; ES: estipulas; es: primórdio de estame; FO: primórdio de folha; ga: primórdio de gavinha; M: meristema apical caulinar; mf: meristema floral; te: primórdio de tépala.

Durante o desenvolvimento dos primórdios de sépalas e pétalas (tépalas, no caso de *P. suberosa*), a concentração de transcritos é maior na porção adaxial (Figura 14J e 15H e J). O sinal de expressão se torna mais fraco e os homólogos de *LFY* deixam de expressar nos órgãos já desenvolvidos (Figura 15J).

Plantas do gênero *Vitis*, assim como as do gênero *Passiflora*, possuem características únicas no seu ciclo reprodutivo. Durante a primavera e verão, meristemas laterais de plantas de videira formam inflorescências que entram em um estado de dormência em estágios iniciais e completarão o seu desenvolvimento somente na primavera seguinte. Estes meristemas laterais são estruturas únicas que podem originar tanto as inflorescências, durante a fase reprodutiva da planta, como as gavinhas durante a fase vegetativa (Carmona et al.,2008). Demonstrou-se que o homólogo de *LFY* de videira (*VFL*) se expressa nestes meristemas laterais independentemente de seu destino (gavinhas ou inflorescência). Porém, nas gavinhas sua expressão é transiente, enquanto que nos meristemas de inflorescência e nos meristemas florais, a expressão de *VFL* é mantida durante mais tempo, uma vez que se supõe que a função de *VFL* esteja relacionada com a ativação dos genes homeóticos que conferem identidade aos órgãos florais (Carmona et al., 2002). Devido às observações expostas acima, sugere-se que este padrão temporal da expressão de *VFL* seja o responsável pela formação de estruturas de diferentes identidades por um único meristema (Calonje et al.,2004). A semelhança dos padrões de expressão de *PeLFY* e *PsLFY* durante a formação de gavinhas e meristemas florais, com os observados para *VFL* durante a formação das estruturas homólogas em videira, sugerem que, igualmente, *PeLFY* e *PsLFY*

participem do processo molecular determinante da identidade de gavinhas e meristemas florais em *P. edulis* e *P. suberosa*, respectivamente.

Adicionalmente, de forma semelhante ao proposto para videira e para leguminosas (Hofer et al., 1997; Carmona et al., 2002; Champagne et al., 2007), os padrões de expressão de *PeLFY* e *PsLFY* exclusivamente nas folhas trilobadas de plantas maduras (estando os transcritos ausentes de folhas simples de plantas juvenis) sugerem uma participação destes genes na morfogênese das folhas trilobadas em *Passiflora*. Estudos suplementares do padrão de expressão de homólogos de *LFY* em outras espécies de *Passiflora* (e.g. espécies cujas folhas simples estejam presentes tanto na fase juvenil quanto na fase adulta, como por exemplo, em *P. alata* poderão corroborar esta hipótese.

4.4 Obtenção de plantas transgênicas de *Passiflora suberosa* e *Passiflora edulis* via *Agrobacterium tumefaciens*.

Para a verificação da eficiência de obtenção de plantas transgênicas de *Passiflora*, o protocolo descrito na literatura para a transformação de *P. edulis* (Manders et al., 1994) foi adaptado e testado com a utilização de uma construção de superexpressão do gene repórter codificador da β -Glucuronidase (35S::GUS). O método testado mostrou-se eficaz para a obtenção de plantas transgênicas de *P. suberosa*. Foram obtidas 12 linhagens independentes de *P. suberosa* expressando o gene GUS que mostraram resultados positivos no teste histoquímico, desde a fase inicial da formação dos calos até a regeneração de plantas inteiras (Figura 16).

Utilizando-se a mesma metodologia de transformação empregada para a produção das plantas 35S::GUS, foram obtidas plantas de *P. suberosa* com a

construção 35S::*LFY* (Figura 18). A confirmação da inserção do transgene se deu via PCR, utilizando-se DNA genômico das plantas oriundas do experimento de transformação e primers específicos para amplificação do gene *NPT-II*, que confere resistência à kanamicina. Todas as plantas potencialmente transgênicas (i.e. resistentes à kanamicina) testadas foram confirmadas para a presença do transgene (Figura 17).

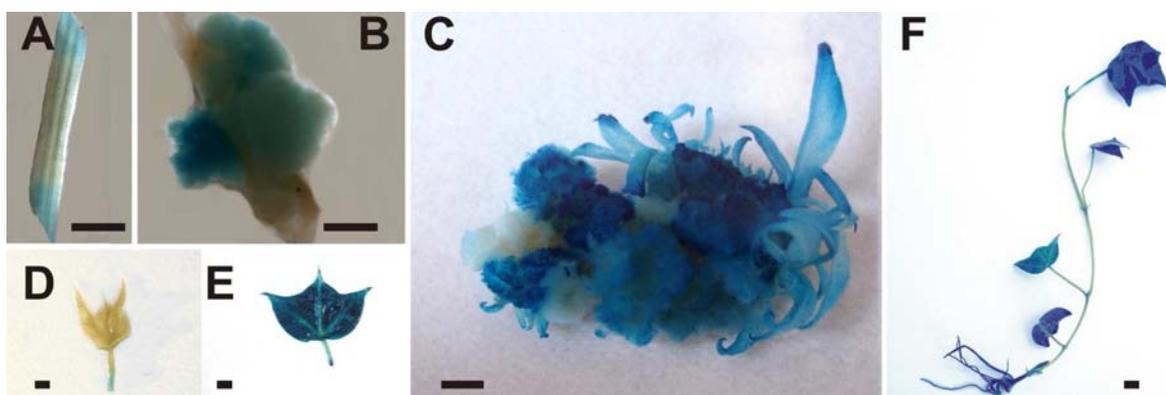


Figura 16: Teste histoquímico para a confirmação da transformação de *P. suberosa* com *Agrobacterium* contendo um vetor para a superexpressão do gene repórter GUS. Explante logo após o período de co-cultivo (A). Calos formados após 15 dias no meio de regeneração e seleção (B). Calo com plantas em início de regeneração aos 30 dias de cultivo (C). Folha jovem não transformada de uma planta controle (D), e folha jovem de uma planta transformada (E). Plântula inteira após cultivo *in vitro* por 30 dias (F) Barras:4mm.



Figura 17: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR para confirmação da presença do gene *NPT-II* nas plantas de *P. suberosa* transformadas com uma construção de superexpressão do gene *LFY* de *Arabidopsis*.



Figura 18: Calos de *P. suberosa* resistentes à kanamicina, potencialmente expressando a construção 35S::*LFY* em processo de regeneração. Barra: 3mm.

As plantas de *P. suberosa* transgênicas para a superexpressão do gene *LFY* estão em fase de alongamento e serão futuramente analisadas quanto ao seu fenótipo, em comparação com plantas transformadas com a construção 35S::*GUS* e com plantas não-transgênicas de *P. suberosa*.

Apesar de calos resistentes à kanamicina terem sido obtidos dos experimentos de transformação de *P. edulis* com a construção de superexpressão de *LFY* e dos mesmos apresentarem potencial regenerativo (Figura 19), não foi possível a obtenção de plantas inteiras. Experimentos futuros serão realizados na tentativa de obtenção de plantas de *P. edulis* superexpressando o gene *LFY*.

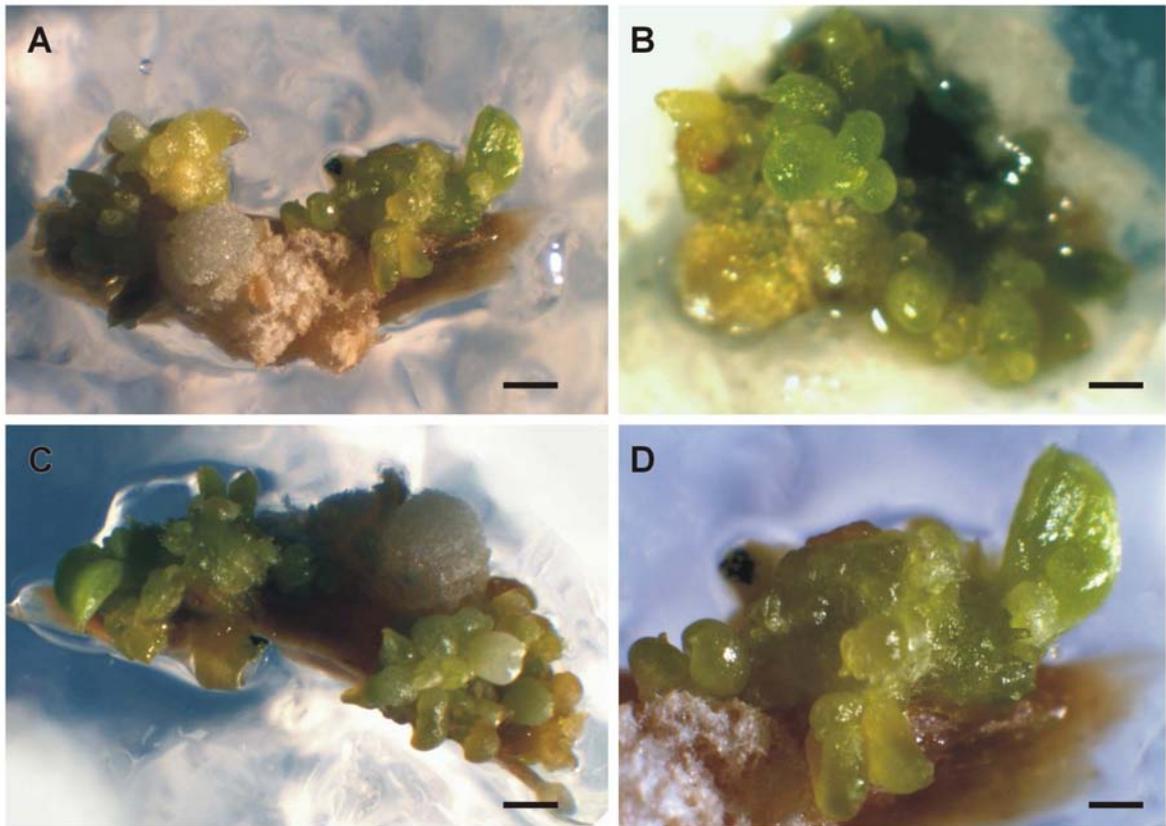


Figura 19: Calos de *P. edulis* resistentes à kanamicina, potencialmente expressando a construção 35S::LFY em processo de regeneração. Barra: 1mm.

V. CONCLUSÕES

A caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento reprodutivo de *P. edulis* e *P. suberosa* permitiu a descrição dos principais eventos envolvidos na diferenciação dos meristemas florais a partir de meristemas laterais. Esta descrição evidenciou características conservadas do desenvolvimento reprodutivo entre as duas espécies e diferenças fundamentais entre as mesmas. Esta análise revelou, adicionalmente, a origem comum dos primórdios de gavinha e dos meristemas florais em *Passiflora*.

Fragmentos de homólogos do gene *LFY* de *A. thaliana* foram clonados para duas espécies divergentes de *Passiflora*: *P. edulis* e *P. suberosa*. Estes homólogos de *LFY* em *Passiflora* foram denominados respectivamente *PeLFY* e *PsLFY*. A análise da seqüência dos fragmentos clonados revelou a similaridade dos mesmos com uma região específica do gene *LFY* para a qual os primers de PCR foram desenhados.

A análise da expressão dos genes *PeLFY* e *PsLFY* via RT-PCR demonstrou que estes se expressam tanto em ápices contendo meristemas vegetativos de plantas adultas quanto em ápices meristemáticos de plantas na fase reprodutiva. Transcritos destes genes não foram detectados em tecidos de raiz, caule e folhas expandidas. A complementação da análise dos padrões de expressão de *PeLFY* e *PsLFY* por experimentos de hibridização *in situ* revelou que estes genes se expressam preferencialmente em primórdios de folhas trilobadas de plantas adultas, em primórdios de gavinhas e em meristemas florais em diferentes fases de desenvolvimento.

Protocolos de obtenção de plantas transgênicas puderam ser obtidos para *P. suberosa*, com a expressão de um gene marcador exógeno. Adicionalmente, plantas

transgênicas contendo uma construção de superepressão do gene *LFY* foram obtidas e contribuirão para a continuidade dos estudos da função de homólogos do gene *LFY* em *Passiflora*.

VI LITERATURA CITADA

- Albert, V. A.; Oppenheimer, D.G.; Lindqvist, C., 2002 . Pleiotropy, redundancy and the evolution of flowers. *Trends Plant Sci.* 7, 297–301.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res.* 25:3389-3402.
- Blázquez, M.A.; Soowal, L.N.; Lee, I.; Weigel, D., 1997. *LEAFY* expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* 124:3835-3844.
- Calonje, M.; Cubas P.; Martínez-Zapater, J.M.; Carmona M. J., 2004. Floral Meristem Identity Genes Are Expressed during Tendril Development in Grapevine. *Plant Physiology* 135:1–11.
- Carmona M.; Cubas, P.; Zapater, J. M., 2002. *VFL*, the Grapevine *FLORICAULA/LEAFY* Ortholog, Is Expressed in Meristematic Regions Independently of Their Fate. *Plant Physiology* 130:68–77.
- Carmona, M. J.; Chaib, J.; Martínez-Zapater, J.M.; Thomas, M. R., 2008. A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2579–2596.
- Champagne, C.; Goliber, T.E.; Wojciechowski, M.F.; Mei, R.W.; Townsley, B.T.; Wang, K.; Paz, M.M.; Geeta, R. Sinha, N.R., 2007. Compound Leaf Development and Evolution in the Legumes. *Plant Cell* 19:3369-3378.
- Coen E.S; Meyerowitz, E.M., 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31-37.
- Coen, E. S., 1991. The role of homeotic genes in flower development and evolution. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 241-279.

- Dornelas, M.C., Vieira, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:211-217. 1994.
- Dornelas, M.C.; Wittich, P.; Von Recklinghausen, I.; Van Lammeren, A.A.M.; Kreis, M. Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. Plant Mol Biol . 39:137-147. 1999.
- Dornelas, M.C.; Van Lammeren, A.A.M.; Kreis, M. *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. Plant Journal. 21:419-429. 2000.
- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. A genomic approach to elucidating grass flower development. Genetics and Molecular Biology. 24:69-76. 2001.
- Dornelas, M. C.; Amaral, W. A. N.; Rodriguez, A. P. M., 2004. *EgLFY*, the Eucalyptus grandis homolog of the *Arabidopsis* gene *LEAFY* is expressed in reproductive and vegetative tissues. Brazilian Journal of Plant Physiology, 16:105-114.
- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.) homologue of the *LEAFY/FLORICAULA* gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems. Journal of Experimental Botany 56:1965-1974. 2005a.
- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. A *FLORICAULA/LEAFY* gene homolog is preferentially expressed in developing female cones of the tropical pine *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Genetics and Molecular Biology 28:299-307. 2005b.
- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. The tropical cedar tree (*Cedrela fissilis*, Meliaceae) homolog of the *Arabidopsis* *LEAFY* gene is expressed in reproductive tissues and can complement *Arabidopsis leafy* mutants. Planta 223:306-314. 2006a.

- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. Evolutionary conservation of genes controlling flowering pathways between *Arabidopsis* and grasses. In: TEIXEIRA DA SILVA, J.A. (ed) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Londres: Global Science Books. Vol. 4, p. 272-279. 2006b.
- Doyle, J.J.; Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Frohlich, M.W; Meyerowitz, E.M., 1997. The search for flower homeotic gene homologs in basal angiosperms and gnetales: a potential new source of data on the evolutionary origin of flowers. Intl. J. Plant Sci. 158(suppl):S131-S142.
- Frohlich, M. V.; Parker, D. S. 2000. The Mostly Male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils. Systematic Botany 25:155-170.
- Gourlay, C.W., Hofer, J.M., and Ellis, T.H., 2000. Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESSN*. Plant Cell 12: 1279–1294.
- Guo, Jian-lin; Yang, Q., 2008. Molecular Cloning and Expression Analysis of a *LFY* Homologous Gene from Potato. Plant Mol Biol Rep, 26:324–334.
- Hamès, C.; Ptchelkine, D.; Grimm, C.; Thevenon, E.; Moyroud, E.; Gérard, F.; Martiel, Jean-Louis; Benlloc, R.; Parcy, F.; Müller, C. W., 2008. Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. The EMBO Journal 27: 2628–2637.
- Hasebe, M.; Wen, C.-K.; Kato, M.; Banks, J. A., 1998. Characterization of MADS homeotic genes in the fern *Ceratopteris richardii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95,6222 -6227.

- Himi, S., Sano, R., Nishiyama, T., Tanahashi, T., Kato, M., Ueda, K. and Hasebe, M., 2001. Evolution of MADS-box gene induced by *FLO/LFY* genes. *J. Mol. Evol.*53: 387-393.
- Hofer, J; L. Turner, R; Hellens, M; Ambrose, P; Matthews, A. Michael; N. Ellis, 1997. *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Current Biology* 7:581--587.
- Ingram, G. C., Goodrich, J., Wilkinson, M. D., Simon, R., Haughn, G. W., and Coen, E. S., 1995. Parallels between unusual floral organs and fimbriata, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell* 7: 1501–1510.
- Irish, V. F., and Sussex, I. M., 1990. Function of the *APETALA-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* 2, 741–753.
- Jack, T., Brockman, L. L., and Meyerowitz, E. M., 1992. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68: 683–697.
- Kanrar, S.; Bhattacharya, M.; Arthur, B.; Courtier, J.; Smith, H. M. S., 2008. Regulatory networks that function to specify flower meristems require the function of homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 54:924--937.
- Kelly, A.J.; Bonnländer, M.B.; Meeks-Wagner, D.R., 1995. *NFL*, the tobacco homolog of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell* 7:225--234.

- Krosnick, S.E.; Freudenstein, J.E., 2005. Monophyly and Floral Character Homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). *Systematic Botany* 30:139–152.
- Kugler, E. E.; King L. A., 2004. A brief history of the passionflower. in *Passiflora: passionflowers of the world* by T.Ulmer and J. MacDougal. Portland: Timber Press. pp. 15–26.
- Kumar, S.; Tamura K.; Jacobsen, I.; Nei N., 2000. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 2.0. Pennsylvania and Arizona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe, Arizona. *Systematic Botany* 30:139-152.
- Lee, I.; Wolfe, D. S.; Nilsson, O. Weigel, D., 1997. A *LEAFY* co-regulator encoded by unusual floral organs. *Curr. Biol.* 7:95–104.
- Levin, J. Z.; Meyerowitz, E. M., 1995. *UFO*: An *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* 7: 529–548.
- Ma, Yue-Ping; Fang, Xiao-Hua; Chen F.; Daí, Si-Lan., 2008. DFL, a *FLORICAULA/LEAFY* homologue gene from *Dendranthema lavandulifolium* is expressed both in the vegetative and reproductive tissues. *Plant Cell Rep*, 27:647-654.
- Maizel, A.; Busch, A. M.; Tanahashi, T.; Perkovic, J.; Kato, M.; Hasebe, M.; Weigel D., 2005. The floral regulator *LEAFY* evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* 308:260-263.
- Manders, G.; Otoni W. C.; Vaz, F. B.; Blackball. N. W.; Power, J. B.; Davey, M. R., 1994. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13:697-702.

- Mccabe, D.; Swain, W.F.; Martinell, B.J.; Christou, P., 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- Mellerowicz, E.J.; Horgan, K.; Walden, A.; Coker, A; Walter, C., 1998. *PRFLL*: A *Pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY* is expressed in buds containing vegetative and undifferentiated male cone primordia. *Planta* 206:619-629.
- Molinero-Rosales, N.; Jamilena, M.; Zurita, S.; Gomez, P.; Capel, J.; Lozano, R., 1999. *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J.* 20: 685–693.
- Mouradov, A.; Glassic, T.; Hamdorf, B.; Murphy, L.; Fowler, B.; Marla S.; Teasdale RD., 1998. *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6537-6542.
- Murashige, T.; Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nilsson, O., Lee, I.; Blazquez, M. A.; Weigel, D., 1998. Flowering time genes modulate the response to leafy activity. *Genetics* 150: 403–410.
- Peña, L.; Martin-Trillo, M.; Juarez, J.; Pina, J.A.; Navarro, L.; Martinez-Zapater, J.M., 2001. Constitutive expression of Arabidopsis *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat Biotechno.* 19:263-267.
- Pouteau, S.; Nicholls, D.; Tooke, F.; Coen, E.; Battey, N., 1997. The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*. *Development* 124: 3343–3351.
- Prusinkiewicz, P.; Erasmus, Y.; Lane, B.; Harder, L. D.; Coen, E. 2007. Evolution and development of inflorescence architectures. *Science* 316:1452-1456.

- Rottmann, W.H.; Meilan, R.; Sheppard, L.A.; Brunner, A.M.; Skinner, J.S.; Ma, C.; Cheng, S.; Jouanin, L.; Pilate, G.; Strauss, S.H., 2000. Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and Arabidopsis. *Plant Journal* 22:235-245.
- Ruiz-Garcia, L.; Madueno, F.; Wilkinson, M.; Haughn, G.; Salinas, J.; Martinez-Zapater, J. M., 1997. Different roles of flowering time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1921–1934
- Scorza, R.; Janick, J., 1980. In vitro flowering of *Passiflora suberosa* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105:892-897.
- Shindo, S.; Sakakibara, K.; Sano, R.; Ueda, K.; Hasebe, M., 2001. Characterization of a *FLORICAULA/LEAFY* homologue of *Gnetum parvifolium* and its implications for the evolution of reproductive organs in seed plants. *Int. J. Plant Sci.* 162:1199 - 1209.
- Shu, G.; Amaral, W.; Hileman, L. C.; Baum, D. A., 2000. *LEAFY* and the evolution of rosette flowering in violet cress (*Jonopsidium acaule*, Brassicaceae) . *American Journal of Botany* 87:634–641.
- Souer, E.; Rebocho, A.B.; Bliet, M.; Kusters, E.; de Bruin, R.A.M.; Koes, R., 2008. Patterning of inflorescences and flowers by the F box protein *DOUBLE TOP* and the *LEAFY* homolog *ABERRANT LEAF AND FLOWER* of petunia. *Plant Cell* 20: 2033–2048.
- Southerton, S. G.; Strauss, S. H.; Olive, M. R.; Harcourt, R. L.; Decroocq, V.; Zhu, X.; Llewellyn, D. J.; Pescocock, W. J.; Dennis, E. S., 1998. *Eucalyptus* has a functional

- equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Molecular Biology* 37:897-910.
- Tanahashi, T.; Sumikawa, N.; Kato, M.; Hasebe, M., 2005. Diversification of gene function: homologs of the floral regulator *FLO/LFY* control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 132: 1727-1736.
- Telfer, A.; Bollman, K. & Poethig, R. ,1997. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 645-654.
- Theißen, G.; Becker, A., 2004. Gymnosperm orthologues of class B floral homeotic genes and their impact on understanding flower origin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23:129-148.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J ., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Ulmer, T; Macdougall, J., 2004. *Passiflora*: passion flowers of the world. Portland: Timber Press.
- Vázquez-Lobo, A.; Carlsbecker, A.; Vergara-Silva.; Alvarez-Buylla, E.R.; Piñero, D.; Engström, P., 2007. Characterization of the expression patterns of *LEAFY/FLORICAULA* and *NEEDLY* orthologs in female and male cones of the conifer genera *Picea*, *Podocarpus*, and *Taxus*: implications for current evo-devo hypotheses for gymnosperms. *Evolution and Development* 9:446–459.
- Venkatachalam,P.; Geetha,N.; Khandelwal,A.; Shaila M.S.; Lakshmi Sita, G. 2000. *Agrobacterium* mediated genetic transformation from cotyledonary explants of

- groundnut (*Arachis hypogaea* L.) via somatic embryogenesis, *Curr. Sci.* 78:1130-1136.
- Wang, H.; Chen, J.; Wen, J.; Tadege, M.; Li, G.; Liu, Y.; Mysore, K.S.; Ratet, P.; Chen, R., 2008. Control of Compound Leaf Development by *FLORICAULA/LEAFY* Ortholog *SINGLE LEAFLET1* in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 146:1759-1772.
- Weigel, D; Alvarez, J; Smyth, D.R; Yanofsky, M.F.; Meyerowitz, E. M., 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69:843--859.
- Weigel, D; Nilsson, O., 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377:495-500.
- Weigel, D; Nilsson, O., 1997. Modulating the timing of flowering. *Plant biotechnology*. 8:195-199.
- Wilkinson, M. D.; Haughn, G. W., 1995. *UNUSUAL FLORAL ORGANS* controls meristem identity and organ primordia fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 1485-1499.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **Estudo da função do gene leafy (lfy) em duas espécies de *Passiflora***.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 2006/03), intitulado **Caracterização molecular do desenvolvimento reprodutivo no gênero *Passiflora* (PASSIFLORACEAE)**;

() tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____



Aluno:
Lucas Cutri



Orientador: Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas
Marcelo C. Dornelas
Depto. Fisiologia Vegetal - IB
Matr. 28849-8 - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Prof. Dra. HELENA COUTINHO DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP