



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**TITO RODRIGUES LUSTOSA**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *SERK1*, *SERK2* E *SERK3*  
DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Medicago truncatula***

**Palmas-TO**

**2021**

**TITO RODRIGUES LUSTOSA**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *SERK1*, *SERK2* E *SERK3*  
DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Medicago truncatula***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroenergia, da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Agroenergia.

Orientador: Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto

Palmas-TO

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

L972a LUSTOSA, TITO.

ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES SERK1, SERK2 E SERK3 DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Medicago truncatula*. / TITO LUSTOSA. – Palmas, TO, 2021.

49 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2021.

Orientador: Horllys Barreto

1. Embriogênese somática. 2. Genes. 3. Expressão gênica. 4. Planta modelo. I. Título

**CDD 333.7**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**TITO RODRIGUES LUSTOSA**

ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *SERK1*, *SERK2* E *SERK3*  
DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Medicago truncatula*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, foi avaliado para a obtenção para título de Mestre em Agroenergia, e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca examinadora

Data de Aprovação 08/09/2021

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto (Presidente)

---

Profa. Dr. Joênes Mucci Pelúzio (Examinador Interno)

---

Prof. PhD. Vagner Augusto Benedito (Examinador Externo)

## 1. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados na RT-qPCR .....	35
---	----

## 2. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Comparação da indução de embriogênese somática entre a linhagem M9-10a (alto potencial embriogênico) e a linhagem M9 (baixo potencial embriogênico) na planta modelo *M. truncatula*..... 37
- Figura 2 - Perfil de expressão no MtGEA (Medicago truncatula Gene Expression Atlas - <http://mtgea.noble.org/v3/>) dos genes *MtSERK1* (Mtr.43625.1.S1\_at) e *MtSERK2* (Mtr.37421.1.S1\_at) em alguns órgãos ..... 39
- Figura 3 - Perfil da expressão dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* em explantes de folhas das linhagens M9-10a (alto potencial embriogênico) e M9 (baixo potencial embriogênico) de *Medicago truncatula* por RT-qPCR ..... 41

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	09
2	OBJETIVO .....	11
2.1	Objetivo geral .....	11
2.2	Objetivos específicos .....	11
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	12
3.1	Planta modelo .....	12
3.2	Embriogênese somática .....	13
3.3	Genes relacionados a embriogênese somática .....	13
3.4	Genes <i>SERK</i> .....	14
3.5	Transformação gênica .....	16
4	PERSPECTIVAS .....	17
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
	ARTIGO 01.....	29
1	RESUMO .....	30
2	ABSTRACT .....	31
3	INTRODUÇÃO .....	32
4	MATERIAL E MÉTODS .....	33
4.1	Análise <i>in silico</i> .....	33
4.2	Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental.....	33
4.3	Extração de RNA e síntese de cDNA .....	35
4.4	Desenho de <i>primers</i> e PCR em tempo real .....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Indução da Embriogênese Somática .....	36
5.2	Análise <i>in silico</i> .....	37
5.3	Expressão gênica (RT-qPCR) .....	39
6	CONCLUSÃO .....	42
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

As leguminosas (Fabaceae) são um grupo de plantas de variados tipos que constituem o reino vegetal e estão representadas por mais de 18.000 espécies no planeta (GRESSHOFF et al., 2015). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2020), o Brasil plantou em 2018 dentre as principais leguminosas soja, feijão, ervilha e amendoim, uma área de mais de 37 milhões de hectares, tendo uma produção de 121 milhões de toneladas. Todos estes legumes contribuíram em exportações no mesmo ano à economia brasileira um saldo de US\$46 bilhões.

A importância das leguminosas se dá por sua utilização em diversas áreas desde a alimentação humana (VASANTHAKUMARI; JAGANMOHAN, 2018) e animal (VILLALBA; ATE; MACADAM, 2021), produção de fármacos (PATHANIA et al., 2020), cosméticos (TUNGMUNNITHUM; HANO, 2020), biocombustíveis (UDOP, 2021), uso como plantas ornamentais (ZULKARNAIN; ELIYANTI; SWARI, 2019) e em estudos genéticos (ABEBE et al., 2021; WANG et al., 2021).

Quanto aos estudos genéticos é frequente o uso de plantas modelo no intuito de facilitar a investigação de fenômenos biológicos específicos. A *Arabidopsis thaliana* é a principal planta modelo utilizada em estudos genéticos, devido ao genoma pequeno, ciclo de vida rápido, ampla produção de sementes, fácil transformação genética e a capacidade de crescimento em laboratório (MU et al., 2018). Porém, como a *A. thaliana* não abrange todos os aspectos biológicos das plantas, a espécie *Medicago truncatula* é utilizada como um modelo alternativo para estudos genéticos voltados para leguminosas (BARKER et al., 1990).

Por esta razão, a espécie *M. truncatula* tem sido alvo de diversos estudos transcriptômicos, cujo o objetivo é entender os mecanismos moleculares envolvidos no crescimento e desenvolvimento da planta (JAUDAL et al., 2020; CHEN et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

Além dos estudos transcriptômicos, as plantas modelos são modificadas geneticamente via silenciamento ou superexpressão gênica, que permite compreender a função dos genes. Sendo, um dos maiores gargalos desse processo, a embriogênese somática, ou seja, a regeneração da planta após o evento de transformação genética.



A embriogênese somática é um processo de regeneração *in vitro* que ocorre divisão celular e diferenciação de embriões tal como o desenvolvimento das sementes, mas sem necessidade de união sexual entre células germinativas (ZIMMERMAN, 1993). Na teoria a ES tem grandes benefícios e vantagens como meio de propagação *in vitro* quando comparado com outros processos de propagação: apresenta alta taxa de multiplicação; aumento da produção por meio da manutenção da cultura em meio líquido; permite o plantio direto da muda, sem enxertos, pela ES com menor custo de produção e possibilita a transferência de genes (CARVALHO *et al*, 2006).

A ES é possivelmente a via de regeneração vegetal mais pesquisada e estudada, mas pouco compreendida (FEHÉR, 2015). Entre os genes estudados durante o desenvolvimento da ES estão os genes SERKs, identificados pela primeira vez em cultura de células embriogênicas de cenoura (SCHIMIDT *et al*, 1997). Desde então o gene *SERK* têm sido identificados e caracterizados em uma grande variedade de plantas, estando eles associados com a capacidade de células individualmente evoluírem a nível de embriões (TALAPATRA, GHOSHAL, RAYCHAUDHURI, 2014).

Assim, considerando a importância da espécie *M. truncatula* como planta modelo para o estudo de leguminosas, este trabalho teve como objetivo analisar o padrão de expressão dos genes *SERK1*, *SERK2* e *SERK3* durante o processo de embriogênese somática em *M. truncatula*

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar os aspectos moleculares do processo de embriogênese somática em *Medicago truncatula* por meio do estudo transcricional dos genes *SERK1*, *SERK2* e *SERK3*.

### **2.2 Objetivos específicos**

Analisar a expressão diferencial dos genes *SERK1*, *SERK2* e *SERK3* por meio de um banco de dados (*Gene Expression Atlas*) de experimentos desenvolvidos via RNAseq.

Analisar o perfil de expressão dos genes *SERK1*, *SERK2* e *SERK3* via RT-qPCR.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Planta modelo

A *Arabidopsis thaliana* é a principal planta modelo utilizada em estudos genéticos devido seu ciclo de vida curto e genoma relativamente pequeno, sendo 10% do seu conteúdo repetitivo, o que a torna um organismo ideal para pesquisas em laboratório de modo que o conhecimento do estudo dessa espécie propicie aplicações diretas ou indiretas à agricultura e à saúde humana (MU; *et al*, 2018).

Há mais variedades de plantas modelos como por exemplo a espécie *Setaria viridis* que é frequentemente utilizada como planta modelo em estudos de espécies pertencentes à família Poaceae (LI; BRUTNELL, 2011). Semelhante à *A. thaliana* a *Setaria* possui um genoma pequeno, porte pequeno e é facilmente cultivável (BRUTNELL; WANG; SWARTWOO, 2012). Para plantas leguminosas (Fabaceae) é comum o uso da *Medicago truncatula* por se tratar uma espécie anual muito utilizada para estudos de genômica funcional cujo genoma é diplóide e apresenta facilidade de transformação (YOUNG; *et al*, 2011).

A espécie *Medicago truncatula* surgiu como o modelo ideal para o estudo genético em leguminosas, pois apresenta um pequeno genoma (próximo do genoma da *Oryza sativa*, quatro vezes maior do que o da *Arabidopsis*, mas duas vezes inferior ao da *Glycine max* e dez vezes inferior ao da *Pisum sativum*), natureza autógama, elevada produção de sementes e ciclo de vida curto (ARAÚJO *et al.*, 2004). A espécie *M. truncatula* tem sido estudada já a algumas décadas (CHENG; WANG; LEE *et al.*, 2014) no intuito de se elucidar os mecanismos moleculares envolvidos em respostas fisiológicas de leguminosas. Yu *et al.* (2020) por exemplo identificaram genes da família *aldo-keto reductases* (AKRs), que estão relacionados a resposta a estresses abióticos. Zhao e colaboradores (2019) identificaram um conjunto de RNAs não codificantes longos (lncRNAs) responsivos ao frio.

Uma característica importante da planta modelo *M. truncatula* é a sua grande biodiversidade (KALLALA; *et al*, 2019). Neste sentido, muitos genótipos de *M. truncatula* já foram investigados quanto aos mecanismos de tolerância a diferentes estresses abióticos como: estresse hídrico (BADRI; ARRAOUADI; HUGUET, 2010) e salino (MHAADHBI; DJÉBALI; CHIHAOUI, 2011) e estresses bióticos (CHUHAOUI; *et al.*, 2014).

### **3.2 Embriogênese somática**

As plantas por meio das células vegetais são dotadas de habilidades únicas que viabilizam mudanças em seu programa de desenvolvimento, ou seja, podem alterar o curso do desenvolvimento vegetativo para o embrionário em etapas conhecidas como embriogênese somática (ZAVATTIERI *et al.*, 2010). Durante a embriogênese, as células somáticas do explante passam pelos estágios da indução e desdiferenciação sendo que não há nenhum entendimento entre autores quanto à terminologia referente às etapas entre as espécies associadas (JIMÉNEZ, 2010). O estágio de indução é uma via direta em que células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica (sem uma etapa de desdiferenciação), ao passo que a desdiferenciação é uma via indireta que envolve normalmente a fase de calo (JIMÉNEZ, 2001). As alterações nas células vegetais em cada uma dessas etapas ocorrem em nível genético, epigenético, proteômico e bioquímico, o que resulta em sua desdiferenciação para o estado meristemático e depois diferenciação em embriões somáticos (SUPRASANNA; BAPAT, 2005).

A ES é, portanto, o processo pelo qual células somáticas evoluem ao nível de estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de células germinativas, com uma série de fases embriológicas peculiares (JIMÉNEZ, 2001). O fato do desenvolvimento embrionário somático ocorrer em geral por meio dos mesmos estágios do desenvolvimento do embrião zigótico, favorece o uso da ES como modelo para o estudo da embriogênese (TVOROGOVA *et al.*, 2019).

Além do mais a ES pode ser aplicada nos processos de transformação de plantas, micropropagação (BRETON; COMU; CHRIQUI, 2004) e produção de sementes artificiais (CHERUVATHUR; KUMAR; THOMAS, 2013), fazendo com que seja um dos sistemas de regeneração de plantas mais explorado, entretanto, em razão dos complexos processos celulares, os mecanismos de indução e regulação ainda não foram totalmente interpretados (ORŁOWSKA; KĘPCZYŃSKA, 2020).

### **3.3 Genes relacionados à embriogênese somática**

Dentre os mecanismos de indução e regulação da ES, estão os mecanismos genéticos, contudo, a cascata genética que induz a desdiferenciação celular e o desenvolvimento de embriões somáticos não estão totalmente compreendidos (FEHÉR, 2015; TVOROGOVA; KRASNOPEROVA; KUDRIASHOV *et al.*, 2019). Sabe-se, entretanto, até o momento que a correlação com ES foi estabelecida pelos genes *LEAFY*

*COTYLEDON 1* e *LEAFY COTYLEDON 2* (*LEC1* e *LEC2*), (KWONG; *et al*, 2003) *AGAMOUS-LIKE 15* (*AGL15*) (ADAMCZYK; LEHTI-SHIU; FERNANDEZ, 2007), *BABY BOOM* (*BBM*) (GALINHA; *et al*, 2007), *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE* (*SERK*) (ALBRECHT; *et al*, 2008), *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*) (SU; *et al*, 2009) e outros genes (FEHÉR, 2015).

No desenvolvimento da planta, bem como na ES, estes genes assumem diferentes papéis como fatores de transcrição, associação ao desenvolvimento e maturação da semente (SANTOS-MENDOZA; *et al*, 2008), crescimento de órgão primordiais (GALINHA; *et al*, 2007) e sinalização de hormônios e morfogênese (ALBRECHT; *et al*, 2008).

Segundo Orłowska *et al.* (2017), em *Medicago truncatula*, o gene *LEC1* e seu homólogo *LIL* são responsáveis pelos estágios finais do desenvolvimento, sendo estes conhecidos como genes marcadores desta etapa. Podem estar também associados à aquisição de competência embriogênica por células somáticas sendo os principais acontecimentos na indução de ES. Durante a ES a expressão do gene *LEC1* demonstrou alteração no programa de desenvolvimento de células como protoplastos em *Medicago sativa* (DOMOKI *et al.*, 2006), folhas de mudas de *Coffea canephora* (NIC-CAN *et al.*, 2013), hipocótilo de *Daucus carota* (YAZAWA *et al.*, 2004) e embriões imaturos de *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* (ZHANG *et al.*, 2002; GAJ *et al.*, 2005).

Entre os reguladores da ES, as proteínas da família *WOX* também desempenham papéis importantes. O *WOX* (*HOMEODOMAIN RELACIONADO COM WUSCHEL*) é uma família de fatores de transcrição (*TFs*) contendo homeodomínio. A atividade dos diferentes genes *WOX* estão presentes em diferentes órgãos e tecidos vegetais, mantendo o desempenho do meristema além de regular a proliferação e diferenciação celular (TVOROGOVA *et al.*, 2019).

Outro gene identificado capaz de converter células somáticas em embriogênicas ou totipotentes é o gene conhecido como *BABY BOOM* (*BBM*) (HORSTMAN; LI; HEIDMANN *et al*, 2017). O gene *AGL15* que é um fator de transcrição da família *MADS-Box* (LEHTI-SHIU *et al*, 2005) também é descrito durante a indução da ES (ADAMCZYK; LEHTI-SHIU; FERNANDEZ, 2007).

### **3.4 Genes *SERK***

A primeira vez que o gene *SERK* foi identificado foi há mais de duas décadas em culturas de células embriogênicas de cenoura (*Daucus carota*) (SCHMIDT *et al.*, 1997),

a descoberta do gene em tecidos embriogênicos gerou seu nome *SERK-Somatic embryogenesis receptor-like kinase* (CUEVA-AGILA et al., 2020). Desde então, o mesmo é descrito na literatura durante diversos processos em plantas, como em respostas a estresses abióticos e bióticos (LI et al., 2017a), crescimento e produtividade (SINGH; KHURANA, 2017), desenvolvimento de anteras (LI et al., 2017b), desenvolvimento vascular (ZHANG et al., 2016) e outros.

A expressão do gene *SERK* durante a embriogênese somática já foi relatada para diferentes espécies (CUEVA-AGILA et al., 2020; GHAI et al., 2020; KOEHLER et al., 2020). A sua expressão é observada desde o estágio celular competente até o estágio globular de embriões somáticos (CHUGH e KHURANA, 2002).

Com base no número de cópias encontradas em algumas espécies, sugere-se no geral que o *SERK* está vinculado a uma família de genes que tem preferência de expressão durante a indução de ES e provavelmente em embriogênese zigótica (HECHT; VIELLE-CALZADA; HARTOG et al., 2001). Achados na literatura demonstraram que a regulação positiva do gene *SERK* específico pode ter relação de totipotência em diferentes espécies de plantas, bem como sugere-se que o *SERK* pode ser útil como um marcador molecular para distinção de células competentes e não competentes (PILARSKA, MALEC, et al., 2016).

Em *A. thaliana* a expressão do gene *SERK1* foi detectada em células com competência embriogênica, em células embriogênicas e embriões somáticos iniciais, além disso, sua expressão pode ser observada também antes da fertilização de óvulos e ao longo do desenvolvimento do embrião zigótico (HECHT et al., 2001). No milho (*Zea mays*), o gene *SERK* é expresso em diferentes tecidos, como células embriogênicas, estágios tardios do embrião, óvulos e folhas (BAUDINO et al., 2001). Na soja (*Glycine max*) o gene *SERK* foi isolado e caracterizado tendo sua localização subcelular identificada ao nível de uma proteína ligada à membrana plasmática (YANG et al., 2011). Em algodão (*Gossypium hirsutum L.*) uma sonda do gene *GhSERK1* foi utilizada para estimar a capacidade embriogênica somática em genótipos de algodão visando a diminuição de custos e celeridade nos procedimentos em ensaios de tecidos da cultura (DA CUNHA SOARES et al., 2018).

Em *Medicago truncatula*, a expressão foi observada em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (NOLAN, IRWANTO, ROSE, 2003).

### 3.5 Transformação genética

A transformação genética é uma técnica comum para melhoramento de produção e aumento da atividade das plantas (LORENCE; VERPOORTE, 2004). O método de transformação genética no gênero *Medicago* compreende a introdução de DNA por meio do sistema *Agrobacterium tumefaciens* sendo este amplamente utilizado para inserção de genes de interesse agrônomo ou para pesquisas em leguminosas (IANTCHEVA; VLAHOVA; ATANASSOV, 2005). Thomas *et al.* (1992) foram os primeiros a conseguir com êxito a transformação genética em *Medicago truncatula* utilizando um plasmídeo e um vetor binário com gene de resistência.

Existem diversos mutantes de *Medicago truncatula*, como os utilizados por Arraouadi *et al* (2011) para demonstração de resposta a estresse por *NaCl*. Além disso, as linhagens mutantes da *Medicago truncatula* também são estudadas para investigação genética das propriedades simbióticas, marcadores morfológicos e capacidade de regeneração e transformação a exemplo da linhagem R-108-1 e Jamelong J5 (CERBAH *et al*, 1999).

Tadege *et al* (2008) escolheu a linhagem transgênica da *M. truncatula* Tnk88-7-7 contendo inserções da *Nicotiana tabacum* do tipo 1 (Tnt1) para geração de uma grande quantidade de linhagens mutantes por embriogênese somática a partir de explantes foliares. Rahoui *et al* (2016) utilizou cinco linhagens de *M. truncatula* para avaliar respostas e estresse induzido por cádmio nos sistemas antioxidantes e diferenciação em raízes da espécie.

## 4 PERSPECTIVAS

Como demonstrado a *Medicago truncatula* é uma planta modelo muito estudada em razão da sua capacidade genética e agronômica. Neste sentido, em virtude da disponibilidade das ferramentas biotecnológicas e de bioinformática há um desejo por mais compreensão dos processos genéticos e de como estes podem ajudar no esclarecimento das rotas bioquímicas, bem como no melhoramento de leguminosas importantes do ponto de vista econômico.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAN DEN TOORN, Marije; ALBRECHT, Catherine; DE VRIES, Sacco. On the origin of SERKs: bioinformatics analysis of the somatic embryogenesis receptor kinases. **Molecular plant**, v. 8, n. 5, p. 762-782, 2015.

ABEBE, Abush Tesfaye et al. Assessment of diversity in tropical soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties and elite breeding lines using single nucleotide polymorphism markers. **Plant Genetic Resources**, v. 19, n. 1, p. 20-28, 2021.

ADAMCZYK, Benjamin J.; LEHTI-SHIU, Melissa D.; FERNANDEZ, Donna E. The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 50, n. 6, p. 1007-1019, 2007.

ALAN M. JONES, JOANNE CHORY, JEFFERY L. DANGL, MARK ESTELLE, STEVEN E. JACOBSEN, ELLIOT M. MEYEROWITZ, Magnus Nordborg and Detlef Weige. The Impact of *Arabidopsis* on Human Health: Diversifying Our Portfolio. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3124625/>>. Acesso em: 7 mai 2020.

ALBRECHT, Catherine et al. *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and-independent signaling pathways. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 611-619, 2008.

ARRAOUADI, S. et al. Analysis of NaCl stress response in Tunisian and reference lines of *Medicago truncatula*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 2, p. 316-323, 2011.

BADRI, Mounawer et al. Comparative effects of water deficit on *Medicago laciniata* and *Medicago truncatula* lines sampled from sympatric populations. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 2, n. 8, p. 259-266, 2010.

BAUDINO, S., HANSEN, S., BRETTSCHEIDER, R., *et al.* "Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family", **Planta**, v. 213, n. 1, p. 1-10, 2001. DOI: 10.1007/s004250000471.

BARRETO, Horllys Gomes. *IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM Medicago*. 2013. 2013.

BARKER, David G. et al. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 8, n. 1, p. 40-49, 1990.

BHULLAR, Dilbag S; SHEAHAN, Michael B; ROSE, Ray J. RNA processing body (P-body) dynamics in mesophyll protoplasts re-initiating cell division. p. 1627–1637, 2017.

BONNIN, Isabelle; PROSPERI, Jean-Marie; OLIVIERI, Isabelle. Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. **Genetics**, v. 143, n. 4, p. 1795-1805, 1996.

BOUTILIER, Kim et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **The Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, 2002.

BRASIL. *Ministério Abastecimento, Pecuária e Abastecimento*. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/feijao/2019/41a-ro/app\\_41ro\\_feijao\\_mercado.pdf/view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/feijao/2019/41a-ro/app_41ro_feijao_mercado.pdf/view)>. Acesso em: 13 abr 2020.

BRAYBROOK, Siobhan A. et al. Genes directly regulated by *LEAFY COTYLEDON2* provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 9, p. 3468-3473, 2006.

BRETON, Christian et al. Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of “Early Mature” walnut trees (*Juglans regia*) that flower in vitro. **Tree physiology**, v. 24, n. 4, p. 425-435, 2004.

BRUTNELL, Thomas P. et al. *Setaria viridis*: a model for C<sub>4</sub> photosynthesis. **The Plant Cell**, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.

CARVALHO, J. M. F. C., LIMA, M. M. A., AIRES, P. S. R., *et al.* **Embriogênese Somática. Embrapa Algodão**: Documentos 152, Campina Grande, p. 12-13, 2006.

CERBAH, Malika et al. FISH chromosome mapping allowing karyotype analysis in *Medicago truncatula* lines Jemalong J5 and R-108-1. **Molecular plant-microbe**

**interactions**, v. 12, n. 11, p. 947-950, 1999.

CHEN, Zhijuan et al. Genome-wide association study identified candidate genes for seed size and seed composition improvement in *M. truncatula*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

CHENG, Xiaofei et al. An efficient reverse genetics platform in the model legume *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 1065-1076, 2014.

CHERUVATHUR, Meena K.; KUMAR, G. Krishna; THOMAS, T. Dennis. Somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 113, n. 1, p. 63-71, 2013.

CHIHAOUI, Saif-Allah et al. *Phoma medicaginis* colonizes *Medicago truncatula* root nodules and affects nitrogen fixation capacity. **European journal of plant pathology**, v. 141, n. 2, p. 375-383, 2015.

CHOI, Hong-kyu e colab. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of. v. 1502, n. March, p. 1463–1502, 2004.

CHUGH, A., KHURANA, P. "Gene expression during somatic embryogenesis - Recent advances", **Current Science**, v. 83, n. 6, p. 715–730, 2002.

CUEVA-AGILA, Augusta Y. et al. Isolation, phylogenetic analysis, and expression of a Somatic Embryogenesis Receptor like Kinase (SERK) gene in *Cattleya maxima* Lindl. **Current Plant Biology**, v. 21, p. 100139, 2020.

DA CUNHA SOARES, Taiza et al. Validating a probe from GhSERK1 gene for selection of cotton genotypes with somatic embryogenic capacity. **Journal of biotechnology**, v. 270, p. 44-50, 2018.

DOMOKI, M. et al. Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1759, n. 11-12, p. 543-551, 2006.

EMBRAPA. *Embrapa Soja*. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso

em: 13 abr 2020.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAOSTAT*. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 13 abr 2020.

FEHÉR, Attila. Biochimica et Biophysica Acta Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate ☆. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1849, n. 4, p. 385–402, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>>.

GAJ, Malgorzata D. et al. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. *Planta*, v. 222, n. 6, p. 977-988, 2005.

GALINHA, Carla et al. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, v. 449, n. 7165, p. 1053-1057, 2007.

GHAI, Devina et al. Genome wide characterization of the SERK/SERL gene family in *Phalaenopsis equestris*, *Dendrobium catenatum* and *Apostasia shenzhenica* (Orchidaceae). *Computational biology and chemistry*, v. 85, p. 107210, 2020.

GOUW, Joost W.; KRIJGSVELD, Jeroen; HECK, Albert JR. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Molecular & cellular proteomics*, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2010.

GRESSHOFF, Peter M. et al. The value of biodiversity in legume symbiotic nitrogen fixation and nodulation for biofuel and food production. *Journal of plant physiology*, v. 172, p. 128-136, 2015.

HECHT, Valérie et al. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, v. 127, n. 3, p. 803-816, 2001.

HYUNG, Daejin et al. Cross-family translational genomics of abiotic stress-responsive genes between Arabidopsis and *Medicago truncatula*. *PLoS One*, v. 9, n. 3, p. e91721, 2014.

IANTCHEVA, A.; VLAHOVA, M.; ATANASSOV, A. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using system for direct somatic embryogenesis promoted by TDZ.

**Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 19, n. 2, p. 50-56, 2005.

IEA, Instituto de Economia Agrícola -. *Amendoim : exportações em alta e a importante participação dos municípios paulistas*. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/AIA/AIA-23-2019.pdf>>. Acesso em: 13 abr 2020.

JAUDAL, Mauren et al. Medicago PHYA promotes flowering, primary stem elongation and expression of flowering time genes in long days. *BMC plant biology*, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2020.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, n. 2, p. 196–223, 2001.

KALLALA, Nadia et al. Biodiversity within Medicago truncatula genotypes toward response to iron deficiency: Investigation of main tolerance mechanisms. **Plant Species Biology**, v. 34, n. 3, p. 95-109, 2019.

KOEHLER, Andréa D. et al. SERK genes identification and expression analysis during somatic embryogenesis and sporogenesis of sexual and apomictic Brachiaria brizantha (Syn. Urochloa brizantha). *Planta*, v. 252, n. 3, p. 1-15, 2020.

KWONG, Raymond W. et al. LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. **The Plant Cell**, v. 15, n. 1, p. 5-18, 2003.

LEHTI-SHIU, Melissa D.; ADAMCZYK, Benjamin J.; FERNANDEZ, Donna E. Expression of MADS-box genes during the embryonic phase in Arabidopsis. **Plant molecular biology**, v. 58, n. 1, p. 89-107, 2005.

LI, Pinghua; BRUTNELL, Thomas P. Setaria viridis and Setaria italica, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 9, p. 3031-3037, 2011.

LI, Lingyong e colab. Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 genes in the model legume Medicago truncatula. *Planta*, v. 226, n. 1, p. 109–123, 2007.

LI, Yingbo et al. Expression analysis of three SERK-like genes in barley under abiotic

and biotic stresses. *Journal of Plant Interactions*, v. 12, n. 1, p. 279-285, 2017a.

LI, Zhiyong et al. Two SERK receptor-like kinases interact with EMS1 to control anther cell fate determination. *Plant physiology*, v. 173, n. 1, p. 326-337, 2017b.

LIONHEART, Gemma e colab. The Impact of Simulated Microgravity on the Growth of Different Genotypes of the Model Legume Plant *Medicago truncatula*. 2018. , p. 491–5.

LORENCE, Argelia; VERPOORTE, Robert. Gene transfer and expression in plants. **Recombinant Gene Expression**, p. 329-350, 2004.

MHADHBI, Haythem et al. Nodule senescence in *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium* symbiosis under abiotic constraints: biochemical and structural processes involved in maintaining nitrogen-fixing capacity. **Journal of plant growth regulation**, v. 30, n. 4, p. 480-489, 2011.

MU, Dan et al. Investigation on Tree Molecular Genome of *Arabidopsis Thaliana* for Internet of Things. *IEEE Access*, v. 6, p. 67688-67698, 2018.02.

NATURE. *Model plants*. Disponível em: <<https://www.nature.com/subjects/model-plants>>. Acesso em: 28 abr 2020.

NIC-CAN, Geovanny I. e colab. New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013.

NOLAN, K. E.; ROSE, R. J.; GORST, J. R. Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Reports*, v. 8, n. 5, p. 278–281, 1989.

NOLAN, Kim E.; IRWANTO, Rina R.; ROSE, Ray J. Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*, v. 133, n. 1, p. 218–230, 2003.

ORŁOWSKA, Anna e colab. Identification of LEC1, L1L and Polycomb Repressive Complex 2 genes and their expression during the induction phase of *Medicago truncatula* Gaertn. somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 129, n. 1, p. 119–132, 2017.

ORŁOWSKA, Anna; KEPCZYŃSKA, Ewa. Oxidative status in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues with particular reference to somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 140, n. 1, p. 35–48, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01709-0>>.

PATHANIA, Ruhi et al. An assessment of potential nutritive and medicinal properties of *Mucuna pruriens*: a natural food legume. *3 Biotech*, v. 10, p. 1-15, 2020.

PECRIX, Yann e colab. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nature Plants*, v. 4, n. 12, p. 1017–1025, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41477-018-0286-7>>.

PILARSKA, M., MALEC, P., SALAJ, J., *et al.* "High expression of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE coincides with initiation of various developmental pathways in in vitro culture of *Trifolium nigrescens*", **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 345–355, 1 mar. 2016. DOI: 10.1007/s00709-015-0814-5. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)>. Acesso em: 5 mar. 2021.

RAHOUI, Sondès et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems and differentiation in roots of contrasted *Medicago truncatula* lines. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 473-489, 2017.

ROCHA, Diego Ismael et al. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 747-758, 2012.

ROSE, Ray J. Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: Cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. March, 2019.

ROSE, Ray J.; MCCURDY, David W. New Beginnings: Mitochondrial Renewal by Massive Mitochondrial Fusion. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 8, p. 641–643, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.005>>.

ROSE, Ray James; SHEAHAN, Michael Brian; TIEW, Terence Wei-yang. Connecting Stress to Development in the Induction of Somatic Embryogenesis Connecting Stress to Development in the Induction of Somatic Embryogenesis. n. January 2013, 2017.

SANTOS-MENDOZA, Monica et al. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 608-620, 2008.

SERIVICHYASWAT, P., RYU, H. S., KIM, W., *et al.* "Expression of the floral repressor miRNA156 is positively regulated by the AGAMOUS-like proteins AGL15 and AGL18", **Molecules and Cells**, v. 38, n. 3, p. 259–266, 2015. DOI: 10.14348/molcells.2015.2311.

SILVA, A. T., BARDUCHE, D., DO LIVRAMENTO, K. G., *et al.* "A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of Coffea arabica L", **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 1, p. 93–101, 2015. DOI: 10.1007/s11627-014-9643-z.

SINGH, Akanksha; KHURANA, Paramjit. Ectopic expression of Triticum aestivum SERK genes (TaSERKs) control plant growth and development in Arabidopsis. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, 1997.

TADEGE, Million et al. Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, v. 54, n. 2, p. 335-347, 2008.

TALAPATRA, S., GHOSHAL, N., RAYCHAUDHURI, S. Sen. "Molecular characterization, modeling and expression analysis of a somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) gene in *Momordica charantia* L. during somatic embryogenesis", **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, n. 3, p. 271–283, 1 mar. 2014. DOI: 10.1007/s11240-013-0401-4.

TANG, Haibao e colab. An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.

THOMAS, M. R.; ROSE, R. J.; NOLAN, K. E. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids.



**Plant Cell Reports**, v. 11, n. 3, p. 113-117, 1992.

TIEW, Terence W; SHEAHAN, Michael B; ROSE, Ray J. Peroxisomes contribute to reactive oxygen species homeostasis and cell division induction in *Arabidopsis* protoplasts. v. 6, n. August, p. 1–16, 2015.

TUNGMUNNITHUM, Duangjai; HANO, Christophe. Cosmetic Potential of *Cajanus cajan* (L.) Millsp: Botanical Data, Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. *Cosmetics*, v. 7, n. 4, p. 84, 2020.

TVOROGOVA, V E e colab. Transcriptomic analysis of *Medicago truncatula* calli with MtWOX9-1 overexpression со сверхэкспрессией гена MtWOX9-1. v. 23, n. 6, p. 691–699, 2019.

UDOP. Óleo de Soja Dispara 66% no Ano com Maior Demanda de Biocombustíveis. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2021/06/09/oleo-de-soja-dispara-66-no-ano-com-maior-demanda-de-biocombustiveis.html>. Acesso em 05 de julho de 2021.

VASANTHAKUMARI, P.; JAGANMOHAN, R. Process development and formulation of multi-cereal and legume cookies. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 12, p. e13824, 2018.

VILLALBA, Juan Jose; MACADAM, Jennifer W.; ATEŞ, Serkan. Non-Fiber Carbohydrates in Forages and their Influence on Beef Production Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, p. 71, 2021.

WANG, Xin-ding e colab. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. p. 599–609, 2011.

WANG, Shumin et al. Overexpression of MtRAV3 enhances osmotic and salt tolerance and inhibits growth of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 163, p. 154-165, 2021.

WÓJCIK, Anna M.; WÓJCIKOWSKA, Barbara; GAJ, Małgorzata D. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 4, p. 1–19, 2020.

YANG, C., ZHAO, T., YU, D., *et al.* "Isolation and Functional Characterization of a SERK Gene from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)", **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, n. 2, p. 334–344, 2011. DOI: 10.1007/s11105-010-0235-8.

YAZAWA, Katsumi; TAKAHATA, Kiminori; KAMADA, Hiroshi. Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 3, p. 215–223, 2004.

YOUNG, Nevin D. *et al.* The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 520-524, 2011.

YU, Jie *et al.* Analysis of aldo–keto reductase gene family and their responses to salt, drought, and abscisic acid stresses in *Medicago truncatula*. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 754, 2020.

ZAVATTIERI, Maria Amely *et al.* Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 12-13, 2010.

ZULKARNAIN, Zulkarnain; ELIYANTI, Eliyanti; SWARI, Elly Indra. Pollen viability and stigma receptivity in *Swainsona formosa* (G. Don) J. Thompson (Fabaceae), an ornamental legume native to Australia. *Ornamental Horticulture*, v. 25, p. 158-167, 2019.

ZHANG, Heqiao *et al.* SERK family receptor-like kinases function as co-receptors with PXY for plant vascular development. *Molecular plant*, v. 9, n. 10, p. 1406-1414, 2016.2019.

ZHANG, Cuiqin *e colab.* Genome-wide analysis of the CCCH zinc finger gene family in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports*, v. 32, n. 10, p. 1543–1555, 2013.

ZHANG, Huoming *e colab.* *Arabidopsis* proteome and the mass spectral assay library. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41597-019-0294-0>>. Acesso em: 28 abr 2020.

ZHANG, Pengcheng *et al.* MtFULc controls inflorescence development by directly repressing MtTFL1 in *Medicago truncatula*. *Journal of Plant Physiology*, v. 256, p.

153329, 2021.

ZHANG, Shibo e colab. Similarity of expression patterns of knotted1 and ZmLEC1 during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, v. 215, n. 2, p. 191–194, 2002.

ZHAO, Mingui e colab. Identification of tissue-specific and cold-responsive lncRNAs in *Medicago truncatula* by high-throughput RNA sequencing. *BMC Plant Biology*, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2020.

ZHAO, Yang e colab. AGLF provides C-function in floral organ identity through transcriptional regulation of AGAMOUS in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 11, p. 5176–5181, 2019.

ZHOU, Zhixiang e colab. *Transcriptome Analysis of the Cytokinin Response in Medicago truncatula*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12374-020-09244-8>>. Acesso em: 28 abr 2020.

ZIMMERMAN, J. Lynn. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell*, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.

**ARTIGO 01**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *SERK1*, *SERK2* E *SERK3*  
DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Medicago truncatula***

## 1 RESUMO

A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos que possibilita a regeneração de plantas, o que a torna essencial para o avanço do melhoramento genético vegetal. Entre os genes envolvidos durante o processo de embriogênese somática, os genes *SERKs* já foram identificados e caracterizados em diversas espécies. A espécie *Medicago truncatula* é utilizada como planta modelo para estudos genéticos voltados para leguminosas, dessa maneira, no intuito de se entender melhor o processo de embriogênese somática em leguminosas, este trabalho teve por objetivo analisar a expressão dos genes *SERK1*, *SERK2* e *SERK3* durante a embriogênese somática em duas linhagens (M9-10a, embriogênica e M9, que apresenta baixo potencial embriogênico) de *M. truncatula*. Na análise *in silico* foi utilizado o banco de dados *Gene Expression Atlas* de *Medicago truncatula* e a análise da expressão relativa foi realizada via RT-qPCR. Nossos resultados sugerem que dos três genes analisados o gene *MtSERK1* é o principal envolvido na indução da embriogênese somática em *M. truncatula*, devido a sua expressão mais elevada na linhagem embriogênica e a baixa expressão na linhagem não embriogênica.

**Palavras chave:** Planta modelo. Expressão gênica. RT-qPCR.

## **2 ABSTRACT**

Somatic embryogenesis is a tissue culture technique that enables the regeneration of plants, making it essential for the advancement of plant genetic improvement. Among the genes involved in the process of somatic embryogenesis, SERKs genes have already been identified and characterized in several species. The *Medicago truncatula* species is used as a model plant for genetic studies aimed at legumes, thus, in order to better understand the process of somatic embryogenesis in legumes, this study aimed to analyze the expression of SERK1, SERK2 and SERK3 genes during somatic embryogenesis in two strains (M9-10a, embryogenic and M9, which has low embryogenic potential) of *M. truncatula*. In silico analysis, the Gene Expression Atlas database from *Medicago truncatula* was used and the relative expression analysis was performed via RT-qPCR. Our results suggest that of the three genes analyzed, the MtSERK1 gene is the main one involved in the induction of somatic embryogenesis in *M. truncatula*, due to its higher expression in the embryogenic lineage and its low expression in the non-embryogenic lineage.

**Key words:** Model plant. Gene expression. RT-qPCR.

### 3 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática foi descrita há mais de 50 anos (STEWARDE; MAPE; SMITH, 1958) e é uma técnica da cultura de tecidos que possibilita a regeneração de plantas (IBRAHIM; FAHMY; AHMED, 2019). Por meio da embriogênese somática ocorre a divisão das células e a diferenciação em embriões, semelhante ao desenvolvimento de embriões zigóticos, porém sem a fusão de gametas (ZIMMERMAN, 1993). Por representar a base do avanço do melhoramento vegetal por meio da engenharia genética (IBRAHIM; FAHMY; AHMED, 2019), a embriogênese somática vem sendo estudado há décadas (KOMAMINE et al., 1992) no intuito de se entender os mecanismos morfológicos (RUYUE et al., 2019), fisiológicos (PENG et al., 2020) e moleculares envolvidos ao longo do processo (BARRETO et al., 2019).

Entre as proteínas envolvidas na embriogênese somática, as proteínas SERKs (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*), pertencentes a subfamília *Leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs)* (ITO; TAKAYA; KURATA, 2005) desempenham um papel importante (KUMAR; STADEN, 2019). As proteínas SERKs são caracterizadas pela presença de domínio N-terminal com repetições ricas em leucina, um domínio rico em prolina e um domínio transmembrana único (Schmidt et al., 1997; HECHT et al., 2001).

A primeira vez que o gene SERK foi identificado foi há mais de duas décadas em culturas de células embriogênicas de cenoura (*Daucus carota*), como genes marcadores (Schmidt et al., 1997). Desde então, a identificação e caracterização desses genes durante o processo de embriogênese somática vem sendo descrita para diversas espécies (KARIM et al., 2018; PORRAS-MURILLO; ANDRADE-TORRES; SOLÍS-RAMOS, 2018; LI et al., 2019; CUEVA-AGILA et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Dentre as espécies em que os genes SERKs já foram identificados está a espécie *Medicago truncatula* (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003; NOLAN; KURDYUKOV; ROSE, 2009; NOLAN; KURDYUKOV; ROSE, 2011). É comum o uso da espécie de *M. truncatula* como um modelo alternativo para estudos genéticos voltados para leguminosas (BARKER et al., 1990), que são um grupo de plantas de grande importância devido a sua utilização em diversas áreas, como alimentação humana (VASANTHAKUMARI; JAGANMOHAN, 2018) e animal (VILLALBA; ATEŞ; MACADAM, 2021), produção de fármacos (PATHANIA et al., 2020), cosméticos (TUNGMUNNITHUM; HANO,

2020), biocombustíveis (UDOP, 2021) e uso como plantas ornamentais (ZULKARNAIN; ELIYANTI; SWARI, 2019).

Embora alguns trabalhos tenham avaliado o perfil de expressão dos genes SERKs durante a indução de embriogênese somática em *M. truncatula*, esse é o primeiro estudo com duas linhagens contrastantes (M9-10a, embriogênica e M9, que apresenta baixo potencial embriogênico). Assim, diante da importância da espécie de *M. truncatula* como planta modelo para pesquisas em leguminosas, este estudo teve por objetivo analisar a expressão dos genes *SERK1*, *SERK2* e *SERK3* durante a embriogênese somática em duas linhagens de *M. truncatula*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Análise *in silico*

Na análise *in silico* foram utilizadas as sequências dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* identificadas por Norlan, Kurdyukov e Rose (2011) e a análise de expressão foi realizada por meio do banco de dados *Gene Expression Atlas de Medicago truncatula* (MtGEA <https://medicago.toulouse.inrae.fr/MtExpress>) (BENEDITO et al., 2008).

### 4.2 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Moleculares da Universidade Federal do Tocantins (LAM-UFT) em parceria com o Laboratório de Genética Funcional de Plantas da West Virginia University (WVU-USA). Foram utilizadas sementes escarificadas e esterilizadas de dois genótipos (M9-10a e M9) de *Medicago truncatula*. O processo de escarificação foi executado em capela de exaustão, no qual iniciou-se com a imersão das sementes em ácido sulfúrico concentrado, por 10 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada fria (4°C), sendo então levadas para câmara de fluxo laminar, onde foi realizado a esterilização com solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente (10 µL de Tween 20) por 10 minutos. Logo após, as sementes foram lavadas por quatro vezes com água



destilada autoclavada e colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro autoclavado.

Posteriormente, as sementes foram transferidas para um frasco (1 semente/frasco) contendo 40 mL de meio com sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose. Após a adição de sacarose o pH foi ajustado para 5,8 com KOH 0,1M. Adicionou-se então 0,7 % de ágar e o meio foi autoclavado. Para a vernalização das sementes, os frascos foram mantidos no escuro por três dias a 4°C e depois transferidas para uma câmara de crescimento a temperatura de 24/22°C (dia/noite), com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  produzido por lâmpadas fluorescentes de espectro total.

Após 45 dias de cultivo, foram coletadas folhas completamente expandidas (explantes) e realizado o cultivo *in vitro* em placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 3 % de sacarose, 0,7% de ágar, 0,2 mg/L de zeatina, 0,1 mg/L de 2,4-D. Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas sob fotoperíodo de 16h e irradiância de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a 24° C até a coleta do material. Foi realizado a excisão e coleta dos calos que proliferaram nas margens dos cortes das folhas, os mesmos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Foram utilizadas duas linhagens [M9-10a (embriogênica) e M9 (baixo potencial embriogênico) (SANTOS; FEVEREIRO, 2002)], de *Medicago truncatula* e o experimento foi realizado com três repetições biológicas, sendo que cada repetição biológica foi formada por três placas de Petri contendo cinco explantes cada uma. Cada linhagem foi avaliada em 10 tempos de cultivo (0, 2, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 240, 336 horas) em um delineamento inteiramente casualizado.

### **4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA**

A extração de RNA foi realizada com o *kit mirVana* (Ambion), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram tratadas com *DNA-free kit* (Ambion), para eliminação do DNA residual. Em seguida, a quantidade e qualidade do RNA foram analisadas em espectrofotômetro, e a integridade verificada em gel de agarose a 1%. Para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit SuperScript III Reverse Transcriptase* (Life Technologies). As amostras foram então armazenadas em freezer a -20°C.

#### 4.4 Desenho de *primers* e PCR em tempo real

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express v2.0 da *Applied Biosystems* e as sequências dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* empregadas foram as sequências identificadas por Norlan, Kurdyukov e Rose (2011) (Tabela 1).

**Tabela 1** - *Primers* utilizados na RT-qPCR

Gene	Primer sequence(5' – 3')	Amplicon (pb)	Amplification efficiency (%)
<i>MtSERK1</i>	F: GGCACCTCATCCCAATTCTG R: CTGACAATGTCATCTTGGACCAG	82	90
<i>MtSERK2</i>	F: TCCAGCCAGATGAACTCTCAG R: TCAGGCAGAGGAAAAAGGATTGT	92	100
<i>MtSERK3</i>	F: GAACGTAATGGCTCTCAACCTCC R: AAGTAAGCAATCCCCCTGGC	83	93
<i>ACTIN2</i>	F: TCAATGTGCCTGCCATGTATGT R: ACTCACACCGTCACCAGAATCC	100	91
<i>UBIQUITIN</i>	F: GCAGATAGACACGCTGGGA	100	93

	R: AACTCTTGGGCAGGCAATAA		
<i>HELICASE</i>	F:GTACGAGGTCGGTGCTCTTGAA	100	99
	R: GCAACCGAAAATTGCACCATAC		

Para a análise da expressão gênica quantitativa por RT-qPCR foi utilizado o termociclador modelo ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR Green, e o cDNA foi obtido a partir do RNA extraído dos explantes nos 10 tempos de cultivo. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, encerrando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).

Foram utilizados para cada reação 1,0 µL de cDNA (diluído 1:5), 3,6µL de água, 0,2 µL de cada primer a 10µM e 5,0µL de *Master Mix PowerUp SYBR green UDG com ROX* (Invitrogen). As amostras foram processadas em réplicas técnicas e os resultados normalizados usando *Cqs* (Ciclo de quantificação) obtidos pela expressão dos genes de referência *ACTIN2*, *UBIQUITIN* e *HELICASE* (Kakar et al. 2008 ) (Tabela 1). A fórmula usada para calcular a expressão relativa foi a descrita por Pfaffl (2001).

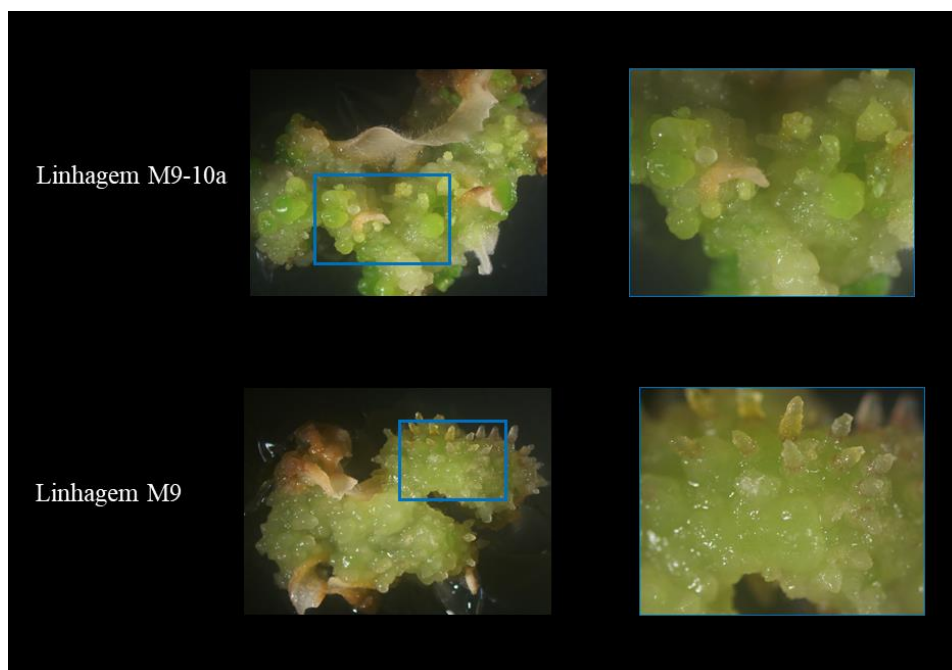
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Indução da Embriogênese Somática

Para investigar o perfil transcricional dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* durante a embriogênese somática foram utilizadas duas linhagens de *M. truncatula*. As linhagens foram M9, considerada de baixo potencial embriogênico e a linhagem M9-10a que é uma linhagem derivada a partir da M9, porém caracterizada por ter alto potencial embriogênico (SANTOS; FEVEREIRO, 2002). Como esperado, as linhagens apresentaram comportamentos distintos ao longo do tempo de cultivo, mesmo sendo submetidas às mesmas condições, semelhante ao descrito por Barreto et al. (2019), confirmando que a competência embriogênica está correlacionada ao genótipo (DAS NEVES et al., 1999). Após 20 dias de cultivo, na linhagem M9-10a já era possível

observar uma grande quantidade de embriões somáticos, diferente da linhagem M9 (Figura 1).

**Figura 1** - Comparação da indução de embriogênese somática entre a linhagem M9-10a (alto potencial embriogênico) e a linhagem M9 (baixo potencial embriogênico) na planta modelo *M. truncatula*.



Devido ao comportamento embriogênico diferente dessas duas linhagens, as mesmas já foram utilizadas em estudos cujo o objetivo era elucidar as vias de biossíntese de giberelina durante a indução de embriogênese somática (IGIELSKI; KEPCZYNSKA, 2017). Igielski e Kępczyńska (2017) em suas análises não notaram a formação de embriões a partir da linhagem M9, além disso, seus resultados sugerem que principalmente a giberelina 3 (*GA3*) participa da indução de embriogênese somática em *M. truncatula*.

## 5.2 Análise *in silico*

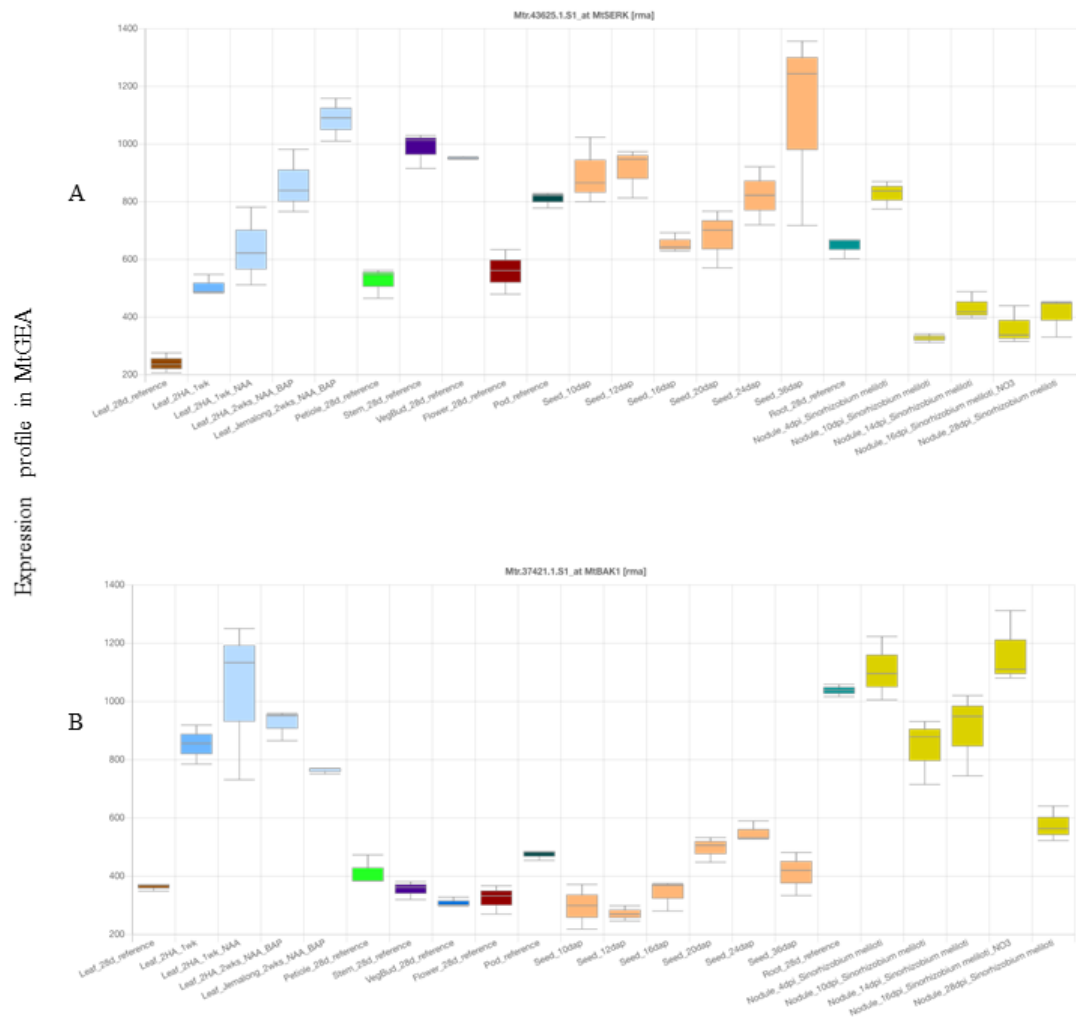
Na análise *in silico* foram utilizadas as sequências dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* identificadas por Norlan, Kurdyukov e Rose (2011) submetidas ao banco de dados *Gene Expression Atlas de Medicago truncatula* (MtGEA). O MtGEA

é uma plataforma que permite análises de dados de transcrição em diferentes tecidos e condições da espécie *M. truncatula* (HE et al., 2009).

A partir da análise feita no MtGEA foi possível identificar a expressão dos genes *MtSERK1* e *MtSERK2* (nomeado no banco de dados como *MtBAK1*) em diferentes bibliotecas (Figura 2) disponibilizadas por Benedito et al. (2008) e Imin et al. (2008). Porém, em relação à expressão do gene *MtSERK3* não foi identificado em nenhum dos tecidos analisados. Ao explorar o perfil de expressão do *MtSERK1* nos diferentes tecidos, observamos que os níveis mais elevados ocorrem durante o desenvolvimento de sementes, sugerindo seu envolvimento durante a embriogênese zigótica (IMIN et al., 2008) e em explantes foliares (Figura 2-A). Nos tecidos foliares foi possível observar que a expressão do gene *MtSERK1* é regulada positivamente na presença de auxina (NAA) e citocinina (BAP) (Figura 2-A), esses resultados corroboram com os descritos por Nolan, Irwanto e Rose (2003) que afirmam que a presença de auxina juntamente com a citocinina no meio favorecem a formação de calos e embriões somáticos, e induz a expressão do gene *MtSERK1*, tanto na linhagem embriogênica (2HA) como na linhagem de baixo potencial embriogênica (Jemalong).

Quanto ao perfil de expressão apresentado pelo *MtSERK2* (*MtBAK1*), os níveis mais elevados foram detectados nos tecidos foliares no meio contendo auxina (NAA) e em nódulos radiculares (Figura 2-B).

**Figura 2-** Perfil de expressão no MtGEA (Medicago truncatula Gene Expression Atlas - <http://mtgea.noble.org/v3/>) dos genes *MtSERK1* (Mtr.43625.1.S1\_at) e *MtSERK2* (Mtr.37421.1.S1\_at) em alguns órgãos.



### 5.3 Expressão gênica (RT-qPCR)

Na análise de expressão relativa dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* foi possível observar uma variação de expressão nas duas linhagens analisadas, indicando dessa maneira diferenças em suas funções. O gene *MtSERK1* na linhagem embriogênica (M9-10a) por exemplo, foi mais expresso que o gene *MtSERK2* durante todo o período de cultivo *in vitro* (Figura 3-A e B).

Ao se analisar individualmente cada gene, nota-se que o gene *MtSERK1* foi expresso em ambas as linhagens, porém, a sua maior expressão foi na linhagem embriogênica (M9-10a), desde as primeiras horas de cultivo *in vitro*, atingindo os maiores

níveis de expressão em 240 h de cultivo (10 dias). Já na linhagem de baixo potencial embriogênico (M9) os níveis de expressão foram baixos, ocorrendo um pequeno aumento a partir das 240 h de cultivo, contudo, ainda assim os níveis de expressão do *MtSERK1* na linhagem embriogênica foi 100 vezes maior do que na linhagem não embriogênica nesse período (Figura 3-A).

Estes resultados diferem dos descritos por Nolan, Irwanto e Rose (2003) ao analisarem duas linhagens de *M. truncatula*, pois afirmam que a capacidade embriogênica reduzida de uma das linhagens não gerou diferença significativa na expressão do *MtSERK1*. Todavia, o padrão de expressão do *MtSERK1* aqui descrito é semelhante aos apresentados por seus homólogos em outras espécies de plantas, como em *A. thaliana* (HECHT et al., 2001), *Cocos nucifera* (PEREZ-NUNEZ et al., 2009) *Ananas comosus* (MA et al., 2012) e *Cedrela odorata* (PORRAS-MURILLO; ANDRADE-TORRES; SOLÍS-RAMOS, 2018), onde a sua expressão é ausente ou extremamente baixa em tecidos não embriogênicos.

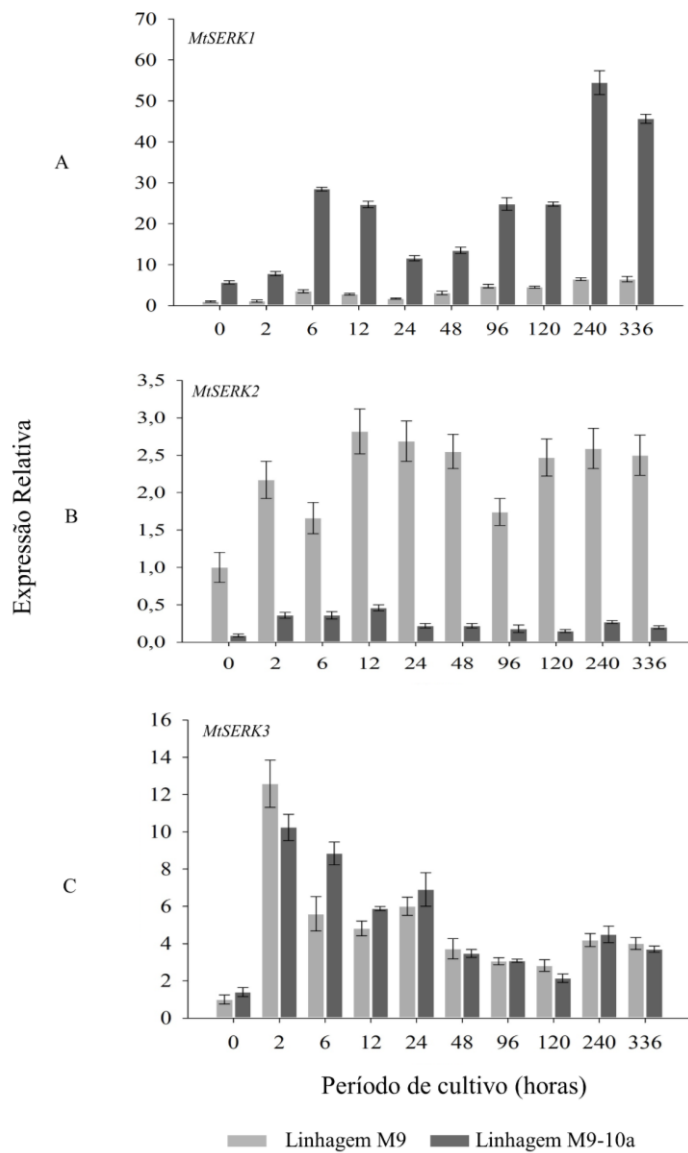
Assim como o gene *MtSERK1*, o gene *MtSERK2* foi expresso nas duas linhagens, mas os maiores níveis de expressão foram observados na linhagem de baixo potencial embriogênico (M9) nas 12 horas de cultivo. Entretanto, a sua expressão mesmo na linhagem não embriogênica foi baixa (Figura 3-B).

Em relação aos tecidos embriogênicos a expressão do *SERK2* já foi relatada também para outras espécies como *Zea mays* (BAUDINO et al., 2001), *Garcinia mangostana* (MAHDAVI-DARVARI; NOOR, 2017) e *Cedrela odorata* (PORRAS-MURILLO; ANDRADE-TORRES; SOLÍS-RAMOS, 2018). Em *Zea mays* e *Cedrela odorata* a sua expressão além de ser detectada em tecidos embriogênicos, foi relatada em tecidos não embriogênicos também, sendo considerada em ambos os tecidos relativamente uniforme (BAUDINO et al., 2001; PORRAS-MURILLO; ANDRADE-TORRES; SOLÍS-RAMOS, 2018), diferente do perfil de expressão apresentado pelo *MtSERK2* que mostrou grande variação entre as duas linhagens (Figura 3-B).

Quanto à expressão do gene *MtSERK3* é possível observar que a mesma é parcialmente uniforme nas linhagens estudadas, com maiores níveis de expressão nas duas primeiras horas de cultivo (Figura 3-C). Schellenbaum et al. (2008) analisaram o padrão de expressão do *SERK3* em tecidos embriogênicos de *Vitis vinifera* e observaram uma expressão estável durante as primeiras fases de cultura *in vitro*. Além disso, os resultados aqui apresentados corroboram com os descritos por Nolan, Kurdyukov e Rose

(2011) para *M. truncatula*, que relataram uma expressão do *MtSERK3* semelhante nos dois genótipos analisados.

**Figura 3** - Perfil da expressão dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* em explantes de folhas das linhagens M9-10a (alto potencial embriogênico) e M9 (baixo potencial embriogênico) de *Medicago truncatula* por RT-qPCR durante 336 horas de cultivo de indução de embriogênese somática. O eixo x representa o período de cultivo e o eixo y representa a expressão relativa. As barras de erro representam erros padrão de triplicatas biológicas. A expressão de cada gene foi normalizada usando três genes de referência ( $\beta$  - ACTIN, UBIQUITIN e HELICASE).





## 6 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo foi possível a caracterização transcricional dos genes *MtSERK1*, *MtSERK2* e *MtSERK3* em duas linhagens com alto e baixo potencial embriogênico de *Medicago truncatula*. Os resultados obtidos sugerem que dos três genes analisados, o gene *MtSERK1* é o principal envolvido na indução da embriogênese somática em *M. truncatula*, devido a sua expressão mais elevada na linhagem embriogênica e a baixa expressão na linhagem não embriogênica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER, David G. et al. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 8, n. 1, p. 40-49, 1990.

BARRETO, Horllys Gomes et al. Transcriptional profiling of the AFL subfamily of B3-type transcription factors during the *in vitro* induction of somatic embryogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 139, n. 2, p. 327-337, 2019.

BAUDINO, Sylvie et al. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta*, v. 213, n. 1, p. 1-10, 2001.

BENEDITO, Vagner A. et al. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, v. 55, n. 3, p. 504-513, 2008.

CUEVA-AGILA, Augusta Y. et al. Isolation, phylogenetic analysis, and expression of a Somatic Embryogenesis Receptor like Kinase (SERK) gene in *Cattleya maxima* Lindl. *Current Plant Biology*, v. 21, p. 100139, 2020.

DAS NEVES, Lucinda Oliveira et al. Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn cv. *Jemalong*. *Plant Cell Reports*, v. 18, n. 5, p. 398-405, 1999.

HE, Ji et al. The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2009.

HECHT, Valérie et al. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, v. 127, n. 3, p. 803-816, 2001.

IBRAHIM, Ahmed S.; FAHMY, Ashraf H.; AHMED, Shreen S. Copper nanoparticles elevate regeneration capacity of (*Ocimum basilicum*L.) plant via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 136, n. 1, p. 41-50, 2019.

IMIN, Nijat et al. Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures. *BMC plant biology*, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2008.

ITO, Yukihiro; TAKAYA, Kazuhiko; KURATA, Nori. Expression of SERK family receptor-like protein kinase genes in rice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, v. 1730, n. 3, p. 253-258, 2005.

IGIELSKI, Rafał; KEPCZYŃSKA, Ewa. Gene expression and metabolite profiling of gibberellin biosynthesis during induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. *PLoS One*, v. 12, n. 7, p. e0182055, 2017.

KAKAR, Klementina et al. A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant Methods*, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2008.

KARIM, Rezaul et al. Expression and DNA methylation of SERK, BBM, LEC2 and WUS genes in *in vitro* cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 24, n. 5, p. 741-751, 2018.

KOMAMINE, Atsushi, et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* v. 28.1, p 11-14, 1992.

KUMAR, Vijay; VAN STADEN, Johannes. Multi-tasking of SERK-like kinases in plant embryogenesis, growth, and development: current advances and biotechnological applications. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 41, n. 3, p. 1-16, 2019.

LI, Huiqiang et al. SERK receptor-like kinases control division patterns of vascular precursors and ground tissue stem cells during embryo development in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, v. 12, n. 7, p. 984-1002, 2019.

MA, Jun et al. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 30, n. 1, p. 195-203, 2012.

MAHDAVI-DARVARI, Fatemeh; NOOR, Normah Mohd. New insight into early somatic embryogenesis of Mangosteen (*Garcinia mangostana*) through de novo and comparative Transcriptome analyses. *Tropical plant biology*, v. 10, n. 1, p. 30-44, 2017.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOLAN, Kim E.; IRWANTO, Rina R.; ROSE, Ray J. Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*, v. 133, n. 1, p. 218-230, 2003.

NOLAN, Kim E.; KURDYUKOV, Sergey; ROSE, Ray J. 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*, v. 60, n. 6, p. 1759-1771, 2009.

NOLAN, Kim E.; KURDYUKOV, Sergey; ROSE, Ray J. Characterisation of the legume SERK-NIK gene superfamily including splice variants: implications for development and defence. *BMC plant biology*, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2011.

PATHANIA, Ruhi et al. An assessment of potential nutritive and medicinal properties of *Mucuna pruriens*: a natural food legume. *3 Biotech*, v. 10, p. 1-15, 2020.

Pérez-Núñez, M. T., Souza, R., Sáenz, L., Chan, J. L., Zuniga-Aguilar, J. J., & Oropeza, C. (2009). Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant cell reports*, 28(1), 11-19.

PENG, Chunxue et al. Physiological and biochemical traits in Korean pine somatic embryogenesis. *Forests*, v. 11, n. 5, p. 577, 2020.

PORRAS-MURILLO, Romano; ANDRADE-TORRES, Antonio; SOLÍS-RAMOS, Laura Y. Expression analysis of two SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) genes during in vitro morphogenesis in Spanish cedar (*Cedrela odorata* L.). *3 Biotech*, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2018.

RUYUE, J. I. N. G. et al. Histocytological Study of Somatic Embryogenesis in the Tree *Cinnamomum camphora* L.(Lauraceae). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 47, n. 4, p. 1348-1358, 2019.

SANTOS, Dulce; FEVEREIRO, Pedro. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 70, n. 2, p. 155-161, 2002.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, 1997.

SCHELLENBAUM, Paul et al. Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant cell reports*, v. 27, n. 12, p. 1799-1809, 2008.

STEWART, F. C.; MAPES, Marion O.; SMITH, Joan. Growth and organized development of cultured cells I. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany*, v. 45, n. 9, p. 693-703, 1958.

TUNGMUNNITHUM, Duangjai; HANO, Christophe. Cosmetic Potential of *Cajanus cajan* (L.) Millsp: Botanical Data, Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities. *Cosmetics*, v. 7, n. 4, p. 84, 2020.

UDOP. Óleo de Soja Dispara 66% no Ano com Maior Demanda de Biocombustíveis. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2021/06/09/oleo-de-soja-dispara-66-no-ano-com-maior-demanda-de-biocombustiveis.html>. Acesso em 05 de julho de 2021.

VASANTHAKUMARI, P.; JAGANMOHAN, R. Process development and formulation of multi-cereal and legume cookies. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, n. 12, p. e13824, 2018.

VILLALBA, Juan Jose; MACADAM, Jennifer W.; ATEŞ, Serkan. Non-Fiber Carbohydrates in Forages and their Influence on Beef Production Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, p. 71, 2021.

ZHANG, Lijie et al. CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS RELATED SERK GENE IN FRAXINUS MANDSHURICA. *FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, v. 29, n. 11, p. 9961-9971, 2020.

ZIMMERMAN, J. Lynn. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell*, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.

ZULKARNAIN, Zulkarnain; ELIYANTI, Eliyanti; SWARI, Elly Indra. Pollen viability and stigma receptivity in *Swainsona formosa* (G. Don) J. Thompson (Fabaceae), an ornamental legume native to Australia. *Ornamental Horticulture*, v. 25, p. 158-167, 2019.