Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**Expressão do gene *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens* no
estigma de *Nicotiana tabacum*: efeitos de níveis aumentados
de auxina no desenvolvimento do pistilo**

Dissertação de Mestrado

Aluno: Luís Antonio Alves de Toledo Filho

Orientadora: Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Junho - 2012

Título: “Expressão do gene *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens* no estigma de *Nicotiana tabacum*: efeitos de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento do pistilo”

Aluno: Luís Antonio Alves de Toledo Filho

Orientadora: Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação de Mestrado

apresentada ao programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética Geral

Ribeirão Preto – SP

Brasil

Junho - 2012

Ficha catalográfica

Aluno: Luís Antonio Alves de Toledo Filho

Toledo-Filho, LAA

Título: "Expressão do gene *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens* no estigma de *Nicotiana tabacum*: efeitos de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento do pistilo"

Ribeirão Preto: FMRP, 2012

Número de páginas #115#

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

As atividades apresentadas nesta dissertação foram majoritariamente realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil

À probidade, ao compromisso, ao sincero amor pela ciência: ao respeito humano.

Es war ein mal... ein Blatt...
(Era uma vez... uma folha...)

Agradecimentos/Aknowledgements

Ao meu alicerce, minha família, por todo apoio incondicional, por me proverem muito mais do que mereço. Pela vida, muito obrigado.

À querida professora, amiga e orientadora Maria Helena, por nos prover infatigavelmente todas as condições necessárias para trabalharmos; por nos ensinar a ter perseverança e atitude sem iguais, frente a todas as barreiras do caminho; pela orientação sempre presente e por nos prover a oportunidade inestimável de nos desenvolvermos pessoal e cientificamente. Imensamente, muito obrigado professora.

Aos professores membros da banca por gentilmente terem aceitado parar suas atividades para participar de minha banca de mestrado. Muito obrigado.

Ao querido Henrique Cestari de Paoli, por todo incentivo à distância e pelo inestimável apoio científico e intelectual. Muito obrigado Dom(zela ;).

À querida turma do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, por todo carinho, amizade, alegrias do cotidiano e ajudas valiosas e naturalmente espontâneas. Vivi, Andrea, Greice, Fernanda, Marcella, Samantha, Edward, Douglas, Ian, Michael, Nilton, Tamiris, Ian e Hebréia. Muito obrigado pessoal.

Ao Professor Dr. Gustavo Henrique Goldman (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo Campus de Ribeirão Preto), por sempre deixar as portas abertas para desenvolvermos boa parte de nossos projetos em seu laboratório. Muito obrigado professor.

Ao Professor Dr. Eduardo Purgatto (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Campus São Paulo) e sua aluna de mestrado e amiga Mariana Foresto, pela imensa gentileza em nos ajudar com as tentativas de medições do fitohormônio auxina. Muito obrigado.

Professor Yunde Zhao (University of California San Diego, USA) and Professor Hiroyuki Kasahara (Plant Science Center, Riken, Japan), thanks a lot for the precious help with the auxin measurements and also thanks a lot Dr. Kiyoshi Mashiguchi for being very kind and gently providing me the protocol. Thanks a lot guys.

Ao Professor Dr. Rodrigo Santinelo Pereira do Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP-USP e ao seu aluno de doutorado Fernando Farache, pela ajuda com as estéreo-microscopias dos botões florais. Muito obrigado meus amigos.

Ao técnico Paulo Rosa Júnior, por todo companheirismo e amizade e por nos prover não só motivos de alegrias, mas todo material limpo, sempre que necessário. Muito obrigado Paulão. Sem forçar a natureza.

À Dona Nina, por todo carinho e amizade e pelo inestimável cafezinho que nos dá energia para trabalhar. Muito obrigado Dona Nina.

Ao Fláuzio e ao Flávio por nos ajudarem sempre com o cultivo de plantas na casa de vegetação. Muito obrigado meus queridos.

Aos amigos da Chacrosa, por todo carinho sincero. Valeu irmãos, quero dizer, valeu irmãos. E nada mais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e, em última instância, à toda população do Estado de São Paulo e do Estado Federal Brasileiro por todo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível desenvolver este projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto e para minha formação: Muito obrigado!

Índice

Resumo	3
Abstract.....	4
1 - INTRODUÇÃO	5
1.1 - As flores como estruturas reprodutivas de Angiospermas.....	5
1.2 - O pistilo da planta modelo <i>Nicotiana tabacum</i>	6
1.3 - Auxina: um breve histórico	7
1.4 - As famílias de proteínas Aux/IAA e ARF e o modelo de sinalização nuclear por auxina	9
1.5 - Transporte Polar de Auxina: Hipótese quimiosmótica.....	11
1.6 - A auxina (AIA) como promotora e reguladora do desenvolvimento em plantas.....	12
1.7 - Desenvolvimento inicial do pistilo e sua homologia às folhas	15
1.8 - Genes envolvidos no desenvolvimento apical-basal do pistilo e sua relação com auxina	18
1.9 - Catabolismo e conjugação de auxina em plantas	33
1.10 - Vias de produção de auxina em plantas	34
1.11 - Os genes bacterianos <i>iaaM</i> e <i>iaaH</i> em plantas	34
2 - OBJETIVOS.....	37
2.1 - Objetivo geral.....	37
2.2 - Objetivos específicos	37
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 - Plasmídeos utilizados	38
3.2 - Isolamento de plasmídeos: Mini-preparação de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	39
3.3 - Quantificação da concentração de DNA.....	40
3.4 - Digestões enzimáticas de DNA	40
3.5 - Eletroforese em gel de agarose.....	40
3.6 - Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.....	41
3.7 - Construção do vetor de expressão em plantas STIG1 _{prom} :: <i>iaaM</i>	42
3.7.1 - Amplificação do promotor STIG1 e da região codificadora <i>iaaM</i>	42
3.7.2 - Reação LR para construção do cassete STIG1 _{prom} :: <i>iaaM</i>	50
3.8 - Transformação bacteriana.....	50
3.8.1 - Preparação de células eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	50
3.8.2 - Eletroporação de <i>Escherichia coli</i>	51
3.8.3 - Preparo de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
3.8.4 - Eletroporação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
3.9 - Seqüenciamento de DNA	52
3.9.1 - Preparo de DNA para seqüenciamento	52
3.9.2 - Purificação e precipitação da reação de seqüenciamento.....	54
3.10 - Comparação entre duas seqüências nucleotídicas	55
3.11 - Transformação de plantas	56
3.11.1 - Obtenção de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> em condições estéreis.....	56
3.11.2 - Obtenção dos segmentos foliares	56
3.11.3 - Infecção dos segmentos foliares.....	57
3.11.4 - Obtenção de brotos transgênicos.....	58
3.12 - Quantificações de Ácido Indol-3-Acético (AIA).....	58
3.12.1 - Tentativas de quantificação de Ácido Indol-3-Acético (AIA) no Brasil.....	58
3.12.2 - Quantificações de Ácido Indol-3-Acético (AIA) no Japão	59
3.13 - RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)	61
3.13.1 - Coleta de Material Vegetal.....	61
3.13.2 - Extração de RNA	61

3.13.3 - Checagem da quantidade e qualidade de RNA	62
3.13.4 - Preparação de RNA livre de DNA	63
3.13.5 - Síntese de cDNA	63
3.13.6 - Reação de PCR quantitativa	64
3.13.7 - Preparação de água DEPC	66
4 - RESULTADOS.....	66
4.1 - Obtenção do vetor de expressão STIG1 _{prom} ::iaaM	66
4.1.1 - Reações de PCR para adição de sítios de recombinação <i>att</i>	67
4.1.2 - Reação de recombinação, clonagem e checagem do vetor de expressão	69
4.2 - Obtenção de plantas transgênicas STIG1 _{prom} ::iaaM	70
4.2.1 - Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com a construção pLTEXPSTIG1 _{prom} ::iaaM	70
4.2.2 - Checagem da presença da construção em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
4.2.3 - Transferência do T-DNA de <i>A. tumefaciens</i> para <i>N. tabacum</i>	71
4.2.4 - Regeneração de plantas transformadas	71
4.3 - Análise dos fenótipos das plantas transgênicas STIG1 _{prom} ::iaaM	73
4.4 - Teste de segregação	79
4.5 - Quantificações de auxina em estigmas e estiletos de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> transgênicas STIG1 _{prom} ::iaaM e controle	81
4.5.1 - Quantificações de auxina no Brasil por GCMS (Gas chromatography/Mass Spectrometry)	81
4.5.2 - Quantificações de auxina no Japão por LCMS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)	83
4.6 - Análise <i>in silico</i> da sequência do promotor STIG1	85
4.7 - Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativa	86
5. - DISCUSSÃO	90
5.1 - Fenótipos observados e número de cópias de T-DNA nas plantas transgênicas	90
5.2 - Estádio 7 do desenvolvimento: um marco divisor de maturidade do pistilo?	91
5.3 - Níveis aumentados de auxina no pistilo afetam negativamente a polinização e a formação de frutos em <i>Nicotiana tabacum</i>	93
5.4 - <i>Crosstalk</i> entre auxina e outros fitohormônios	94
5.5 - Alterações no transcriptoma do pistilo de <i>Nicotiana tabacum</i> em resposta a níveis aumentados de auxina	98
6 - CONCLUSÕES	102
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

Resumo

A reprodução das plantas é um tópico de grande interesse para a ciência básica e para a agricultura. O pistilo, a estrutura reprodutiva feminina das angiospermas, é um órgão que desempenha papéis importantes no sucesso reprodutivo. É responsável por receber os grãos de pólen, fornecer as condições para a hidratação destes e a emissão de tubos polínicos que crescem em direção ao ovário. Adicionalmente, o pistilo produz frutos e sementes após a fecundação dos óvulos, contidos no interior do ovário. Há muito tempo se estuda o fito-hormônio auxina e muito se sabe sobre sua ação fisiológica e molecular. Contudo, embora avanços recentes sugiram uma grande influência deste hormônio no controle do desenvolvimento do pistilo, são escassos os dados na literatura sobre a influência de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento das partes superiores do pistilo: estigma e estilete. Para preencher esta lacuna, este projeto teve como objetivos: I) produzir plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* com níveis aumentados de auxina no pistilo, através da expressão da enzima de biossíntese de auxina triptofano-monooxigenase (iaaM), de *Agrobacterium tumefaciens*, sob controle do promotor de *N. tabacum* STIG1, o qual confere expressão específica no estigma; II) analisar o fenótipo do pistilo das plantas transgênicas obtidas, comparando-as com plantas selvagens, principalmente quanto à morfologia do pistilo e aos parâmetros reprodutivos; e III) caracterizar, através de RT-PCR quantitativa, os padrões de expressão de diferentes genes putativos de resposta a auxina nos pistilos de plantas transgênicas e controle. No total, 19 plantas transgênicas estáveis foram obtidas, das quais 13 apresentaram alterações morfológicas evidentes no pistilo. Os estiletos das plantas transgênicas STIG1_{prom::iaaM} apresentaram-se mais compridos nos estádios iniciais do desenvolvimento floral, porém mais curtos e espessos nos estádios finais. Juntos, tais fatos sugerem um modo diferencial de percepção de níveis elevados de auxina pelo pistilo ao longo de seu desenvolvimento. Na antese, observou-se nestas plantas uma diminuição da área da superfície estigmática, com concomitante redução na secreção de exudato. Adicionalmente, plantas STIG1_{prom::iaaM} apresentaram dificuldades no processo de auto-polinização e frutos, produzidos a partir de polinização manual controlada de pistilos transgênicos, apresentaram um tamanho final reduzido, evidenciando efeitos deletérios de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento do pistilo e/ou no processo de polinização. Medições de auxina via LQ-MS confirmaram um considerável incremento dos níveis endógenos deste hormônio nos pistilos de uma planta transgênica (STIG1_{prom::iaaM} 4), para os três estádios do desenvolvimento analisados. Análises de expressão gênica para 9 genes putativos de resposta a auxina, por qRT-PCR, para pistilos de três plantas transgênicas de três estádios distintos do desenvolvimento floral, revelaram significativas alterações no transcriptoma do pistilo das plantas transgênicas, sugerindo uma contribuição molecular para alguns dos genes analisados no estabelecimento dos fenótipos observados. Além de fornecerem informações relevantes sobre o papel da auxina no desenvolvimento do pistilo, as plantas transgênicas STIG1_{prom::iaaM}, obtidas neste projeto, constituem excelentes ferramentas para investigações futuras sobre os efeitos da auxina na regulação da expressão gênica em nível transcricional e pós-transcricional de genes expressos no pistilo.

Abstract

Plant reproduction is a topic of great interest for both basic science and agriculture. The pistil, the angiosperms female reproductive structure, is an organ that plays important roles on the successful reproduction. It is responsible for receiving pollen grains, providing conditions for their hydration and the emission of pollen tubes that grow towards the ovary. In addition, the pistil produces fruits and seeds after the fecundation of the ovules, contained in the ovary. Since a very long time the phytohormone auxin is studied and much is known about its physiological and molecular modes of action. Nevertheless, even though recent advances suggest a great influence of this hormone on the control of the pistil development, there are scarce data in the literature about the influence of elevated levels of auxin on the development of the upper parts of the pistil: the stigma and style. To fill this gap, this project aimed: I) to produce transgenic *Nicotiana tabacum* plants with elevated auxin levels within the pistil through the expression of the auxin biosynthesis enzyme tryptophan-monooxygenase (*iaaM*), from *Agrobacterium tumefaciens*, under the control of the *N. tabacum* STIG1 promoter, which confers stigma-specific expression; II) to analyze the pistil phenotype of the transgenic plants obtained, comparing with wild-type plants, mainly concerning the pistil morphology and reproductive parameters; and III) to characterize through quantitative RT-PCR the expression patterns of different putative auxin-responsive genes in the pistils of transgenic and control plants. A total of 19 stable transgenic plants were obtained, from which 13 presented evident morphological alterations on the pistil. The styles of the STIG1_{prom::iaaM} transgenic plants were longer at the early floral developmental stages, but shorter and thicker at the final stages. Together, these facts suggest a differential mode of perception of elevated auxin levels by the pistil along its development. At anthesis, it was observed a decrease on the stigmatic surface area, with concomitant reduction in the exudate secretion in these plants. Additionally, STIG1_{prom::iaaM} plants presented difficulties in the self-pollination process, and fruits produced by hand-controlled-pollination of transgenic pistils had a reduced final size, making evident the deleterious effects of elevated auxin levels on pistil development and/or on the pollination process. Auxin measurements via LC-MS confirmed a considerable increment in the endogenous levels of this hormone in the pistils of one transgenic plant (STIG1_{prom::iaaM} 4), for the three developmental stages analyzed. Gene expression analyses for 9 putative auxin-responsive genes through qRT-PCR, in pistils from three transgenic plants of three distinct floral developmental stages, revealed significant alterations on the pistil transcriptome of the transgenic plants, suggesting a molecular contribution for some of the analyzed genes on the establishment of the observed phenotypes. Besides providing relevant information concerning the role of auxin in pistil development, the transgenic plants STIG1_{prom::iaaM}, obtained in this project, consist excellent tools for future investigations about the effects of auxin in the regulation of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels of pistil expressed genes.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - As flores como estruturas reprodutivas de Angiospermas

Dividido em monocotiledôneas e dicotiledôneas, o filo antófitas - ou angiospermas – é, atualmente, o grupo mais abundante de plantas na superfície terrestre. Este grupo é constituído por mais de 300.000 espécies, com representantes variando de poucos centímetros a dezenas de metros de comprimento (Raven, 2007). O termo angiosperma deriva dos nomes gregos “*angeion*” (recipiente) e “*sperma*” (semente) e refere-se a uma estrutura fechada - responsável por comportar os óvulos - denominada pistilo. O termo pistilo deriva-se, historicamente pelos botânicos, de uma ferramenta utilizada pelos farmacêuticos em forma de pequeno pilão para pulverizar substâncias em um almofariz e, anatomicamente, a uma unidade morfológica que pode ser composta por uma ou mais unidades estruturais denominadas carpelos (Raven, 2007). A flor das angiospermas é normalmente dividida em quatro verticilos (Figura 1), sendo dois externos, compostos por estruturas estéreis (sépalas e pétalas) - que conjuntamente formam o perianto, e dois internos, compostos por estruturas férteis: o androceu (conjunto de estruturas masculinas ou microsporofilos - os estames) e o gineceu (conjunto de estruturas femininas ou megasporofilos - os pistilos) (Raven, 2007). Um pistilo contém regiões diferenciadas ao longo de seu eixo longitudinal: a parte superior, onde há a recepção dos grãos de polens, é denominada estigma; subjacente a esta, encontra-se o estilete, região responsável por transmitir os tubos polínicos, emitidos pelos grãos de pólen, em direção ao ovário. Espacialmente, o ovário se situa na parte inferior, sendo o responsável por comportar óvulos em uma ou mais câmaras (lóculos). O número de câmaras normalmente remete ao número de carpelos fundidos na formação do pistilo de uma dada espécie (Raven, 2007).

Figura 1: Partes de uma flor de angiospermas (Taiz & Zeiger, 2002).

1.2 - O pistilo da planta modelo *Nicotiana tabacum*

O pistilo de *Nicotiana tabacum* L. é do tipo composto, formado pela fusão de dois carpelos. Ele apresenta um estigma bilobado, cuja superfície é formada por uma epiderme com células papilares esparsamente distribuídas (Bell & Hicks, 1976). Abaixo destas células papilares encontra-se uma zona secretória do estigma que converge no estilete, de tipo sólido, como uma região central de tecido transmissor, circundado pelo córtex parenquimatoso e pela epiderme (Kandasamy & Kristen, 1987; Kandasamy *et al.*, 1990). O tecido estigmático e o transmissor são tecidos únicos do pistilo, sendo responsáveis pela captura do grão de pólen e pela facilitação da passagem do tubo polínico em direção ao óvulo, respectivamente (Gasser *et al.*, 1993). Na maturidade, as células destes tecidos em *N. tabacum* secretam um exudato viscoso que cobre o estigma, sendo este, portanto classificado como estigma úmido (Bell & Hicks, 1976).

O pistilo apresenta duas funções principais: produzir gametófitos femininos e discriminar entre os diferentes grãos de pólen recebidos (Cornish *et al.*, 1988; Steinmetz *et al.*, 1992).

Evidencia-se, portanto, que o pistilo e, principalmente, os tecidos especializados do estigma e estilete, apresentam um papel decisivo na determinação do genótipo dos futuros embriões e plantas (Linskens, 1983; Steinmetz *et al.*, 1992).

1.3 – Auxina: um breve histórico

A primeira correlação entre o transporte de moléculas químicas ao longo da planta, e o desenvolvimento destas, data da década de 1750, quando Henri Lois Duhamel du Monceau correlacionou pela primeira vez o transporte de seiva ao longo do corpo de árvores com a espessura e qualidade da madeira (revisado em Abel & Theologis, 2010). O conceito de substâncias químicas em plantas, atuando como sinalizadores, foi retomado em meados do século XIX, de forma notória com os experimentos e observações dos fenômenos de geo-, helio- e fototropismo por Theophil Ciesielski, Julius von Sachs, Martinus Beijerinck, Julius Wiesner e Charles Darwin e Francis Darwin (Pennazio, 2002). Estes dois últimos deram as primeiras contribuições ao entendimento do fototropismo, utilizando a gramínea *Phalaris canariensis* como modelo. Eles observaram que, normalmente, o coleóptilo desta planta apresentava curvatura em direção a uma fonte de luz unilateral. Porém, quando a ponta do coleóptilo era coberta com papel alumínio, o coleóptilo não mais se curvava em direção da luz. Sabia-se que a região de alongamento do coleóptilo se encontrava alguns milímetros abaixo da ponta, desta forma, eles sugeriram que alguma molécula sinalizadora, produzida na ponta do coleóptilo, de alguma forma era transportada para baixo, tendo sua ação na região de alongamento. Entretanto, em seus estudos, ambos os Darwin não obtiveram informações esclarecedoras sobre a natureza do fator indutor de curvatura (Holland *et al.*, 2009). Embora ainda sem identificar o fator indutor de curvatura em coleóptilos, no começo do século XX, Peter Boysen-Jensen, Arpad Paál e Frits Went retomam os estudos de Darwin. Estes pesquisadores utilizaram e otimizaram o uso de blocos de ágar para captação de moléculas provenientes do ápice de coleóptilos de aveia. Estes experimentos permitiram a confirmação da

natureza química (e não física ou outra qualquer) do fator indutor de curvatura. Os estudos de Went culminaram no desenvolvimento do teste quantitativo de curvatura de coleóptilo, que se tornou útil à época para quantificações aproximadas da concentração deste fator químico (Abel & Theologis, 2010). O ácido indol-3-acético (AIA) foi somente posteriormente isolado. Estudos subsequentes levaram à rápida conclusão de que o ácido indol-3-acético era a principal auxina em plantas (Abel & Theologis, 2010). Estudos sobre os efeitos de AIA em plantas progrediram rapidamente a partir de sua descoberta e caracterização química. Na década de 1950, Silberger and Skoog demonstraram os efeitos de auxina e citocinina no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, que por fim levaram ao estabelecimento das concentrações ideais de sais, vitaminas, citocinina e auxina para o cultivo *in vitro* de uma série de espécies vegetais (Abel & Theologis 2010), incluindo o meio de cultura que utilizamos até hoje para *Nicotiana tabacum* (Murashige & Skoog, 1962). Silberger e Skoog observaram que após tratamento com auxina, células de *N. tabacum* apresentavam um aumento considerável de concentração de ácido nucléicos, o que mais tarde foi observado para outras espécies (Key, 1969, *apud* Abel & Theologis 2010). O aumento na quantidade de ácidos nucléicos em células vegetais expostas à auxina levou Key a elaborar a hipótese de ativação gênica mediada por auxina, o que se supôs ser crucial para os efeitos na proliferação e expansão celulares, observadas em células vegetais em resposta a este hormônio. Entretanto, na década de 1970 houve um forte embate entre a teoria de ativação gênica, proposta por Key, e a teoria do crescimento ácido (revisado em Abel & Theologis, 2010). Na primeira teoria, auxina induziria o crescimento celular a partir da transcrição gênica e na teoria do crescimento ácido, o crescimento celular se daria a partir da acidificação do apoplasto, teoria também conhecida como “*acid growth hypothesis*”. O principal argumento contra a visão centrada em ativação da expressão gênica era devido aos efeitos de expansão celular, observados em resposta à auxina, se darem de forma mais rápida (~10 minutos) do que seria permitido pela maquinaria de expressão gênica (Jacobs, 1979). Entretanto, posteriormente, muitos grupos, utilizando uma gama de técnicas, demonstraram uma rápida indução da transcrição de genes em

resposta à auxina (~5 minutos) (Hagen & Guilfoyle 1985; revisado em Abel & Theologis 2010). Este fato logo sugeriu que a acidificação do apoplasto, com subsequente expansão celular, ocorreria em paralelo à, ou mesmo, como um efeito da indução da transcrição de RNA mensageiros específicos em resposta à auxina (Theologis 1986, revisado em Abel & Theologis 2010).

Com os avanços técnicos no campo da biologia molecular foi possível estabelecer a existência de um grande número de genes de resposta rápida à auxina (ou “*early genes*”). Os genes de indução rápida têm sua expressão ativada pela presença de fatores de transcrição pré-existent no núcleo celular, sem a necessidade da produção de novos fatores de transcrição. O tempo requerido para a expressão destes genes é curto, ocorrendo a partir de poucos minutos (Abel *et al*, 1996). Existem cinco famílias de genes de resposta rápida à auxina (Taiz & Zeiger, 2002), das quais três estão relacionadas com o controle do crescimento e do desenvolvimento vegetal (famílias Aux/IAA, GH3 e SAUR). As outras duas famílias estão relacionadas à resposta ao estresse (Glutathione-S-transferases e ACC-sintase).

1.4 - As famílias de proteínas Aux/IAA e ARF e o modelo de sinalização nuclear por auxina

O mecanismo molecular mais bem caracterizado de indução ou repressão gênica por auxina envolve a família de genes de resposta rápida à auxina Aux/IAA (Tiwari *et al*, 2004). Neste modelo também participam a proteína F-box, *Transport Inhibitor Receptor 1* (TIR1), que é a receptora nuclear de auxina (Dharmasiri *et al*, 2005), e outra família de fatores de transcrição: *Auxin Response Factor* (ARF; Guilfoyle & Hagen, 2007).

Existem 29 membros na família gênica Aux/IAA em *Arabidopsis thaliana* (Liscum & Reed, 2002). De forma geral, as proteínas Aux/IAA são reguladoras negativas da sinalização por auxina (Vanneste & Friml, 2009). As proteínas desta classe tipicamente possuem 4 domínios (I, II, III e IV) altamente conservados. O primeiro domínio (I) tem o papel de repressão transcricional de

genes de resposta à auxina (Tiwari, 2004), sendo também responsável e suficiente para recrutar o co-repressor TOPLESS (Szemenyei *et al*, 2008). O domínio II interage com o receptor de auxina TIR1, que é um componente do complexo de ubiquitinação SCF^{TIR} (Gray *et al*, 2001). A auxina, quando presente em células vegetais, aumenta a interação entre o complexo SCF^{TIR1} e o domínio II de proteínas Aux/IAA, o que resulta na ubiquitinação destas. As proteínas Aux/IAA marcadas por ubiquitina são, então, direcionadas ao 26S proteassoma, onde é realizada a sua degradação (Zenser *et al*, 2001). Os domínios carboxi-terminais III e IV das proteínas Aux/IAA possuem grande similaridade de sequência de aminoácidos com os domínios III e IV presentes em proteínas ARF (*Auxin Response Factor*). Estes domínios são responsáveis pela homo- ou hetero-dimerização entre diferentes membros da família Aux/IAA, assim como permitem a interação de Aux/IAA com proteínas ARF (Remington *et al*, 2004).

Os ARFs constituem uma classe de fatores de transcrição de planta que se ligam à região promotora de genes de resposta à auxina, promovendo a indução ou a repressão destes (Ulmasov *et al*, 1997). Existem 23 membros desta família em *Arabidopsis thaliana*, dos quais, acredita-se que 5 sejam ativadores (ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 e ARF19) e 18 sejam repressores de transcrição gênica (Guilfoyle & Hagen, 2007). A maioria dos ARFs consiste em:

- 1) um domínio N-terminal de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain*, DBD), responsável pela ligação do ARF aos elementos TGTCTC (*Auxin-Responsive-Elements*, AuxREs),

- 2) um domínio intermediário de repressão (*Repression Domain*, RD) ou de ativação (*Activation Domain*, AD), dependendo da função do ARF.

- 3) dois domínios (III e IV) na porção C-terminal, com exceção dos ARF3, ARF13 e ARF17. Estes domínios são responsáveis pela homo- ou hetero-dimerização entre diferentes membros da família ARF, ou ainda, pela dimerização com proteínas Aux/IAA (revisado em Guilfoyle & Hagen, 2007)

De forma panorâmica e resumida, a ação da auxina em nível transcricional, pela via SCF^{TIR1} - Aux/IAA - ARF, se dá da seguinte forma:

A auxina se liga ao receptor nuclear TIR1, permitindo e fortalecendo a ligação deste com membros da família Aux/IAA. A proteína TIR1 faz parte do complexo de ubiquitinação SCF^{TIR1}, que ubiquitina proteínas Aux/IAA. Esta modificação pós-traducional de Aux/IAs ocasiona o direcionamento destas para degradação. As proteínas Aux/IAA normalmente interagem com as proteínas ARF, que são fatores de transcrição que se ligam a promotores de genes de resposta à auxina. Uma vez que Aux/IAs são destinadas à degradação pelo complexo SCF^{TIR1}, devido à presença de auxina na célula, as proteínas ARF se encontram livres para agir, reprimindo ou ativando a transcrição de genes de resposta à auxina.

1.5 - Transporte Polar de Auxina: Hipótese quimiosmótica

Uma característica que difere a auxina (ácido indol-3-acético, AIA) de todas as outras moléculas sinalizadoras de plantas é sua habilidade de mover-se célula-a-célula de forma direcional (Vanneste & Friml, 2009). De acordo com a hipótese quimiosmótica (revisada em Vanneste & Friml, 2009), a auxina é transportada de forma ativa e passiva de células-fonte para célula-dreno através da membrana e do apoplasto. A forma passiva de transporte se dá devido ao apoplasto vegetal ser um ambiente ácido (~pH 5,5), que é assim mantido por próton-ATPases bombeando prótons de dentro para fora das células vegetais. Neste ambiente ácido, parte da auxina (~15%) se torna protonada. Nesta configuração, a auxina torna-se lipofílica e se difunde livremente através da membrana plasmática. Uma vez dentro da célula, em um ambiente neutro, ocorre sua desprotonação e retorno ao seu estado lipofóbico.

A entrada de auxina na célula de forma ativa se dá através do simporte H⁺/AIA-realizado pelas proteínas da família Aux1/Lax (família de 4 membros em *Arabidopsis thaliana*). Uma vez dentro da célula, a auxina pode ser transportada para fora por meio dos transportadores PIN-FORMED (PIN) e/ou por transportadores P-glicoproteínas (PGP), sendo estes últimos transportadores de auxina membros da família “ATP-binding-cassete B” (ABCB). Tem sido demonstrado que as proteínas PIN são as principais coordenadoras da distribuição

direcional e polarizada de auxina, fenômeno intimamente relacionado à formação de novos órgãos e tecidos (Vanneste & Friml, 2009).

1.6 - A auxina (AIA) como promotora e reguladora do desenvolvimento em plantas

O hormônio auxina está intimamente relacionado a diversos processos do desenvolvimento das plantas, da embriogênese ao florescimento. Nenhum mutante com ausência completa de auxina foi isolado até o momento (Zhao, 2010), indicando um papel crucial do fitohormônio auxina no desenvolvimento vegetal.

No início do desenvolvimento de angiospermas, logo após a ocorrência da fertilização da oosfera, há a formação da célula zigótica. O zigoto se divide, subseqüentemente formando uma célula apical - que irá formar cotilédones e o meristema apical - e a célula basal - que irá dar origem ao suspensor (Friml *et al.*, 2003). Até a fase de 32 células, a parte apical do embrião apresenta uma máxima de auxina comparada à porção basal (Figura 2C). Após esta fase, há um direcionamento para o acúmulo de auxina na parte basal do embrião, especificamente, na parte superior do suspensor (Figura 2D). O desenvolvimento subseqüente do embrião culmina na transição deste da fase globular para a fase triangular. Nesta fase as concentrações máximas de auxina também se dão na parte superior do suspensor. Porém, observa-se, adicionalmente, o acúmulo de auxina no ápice dos cotilédones, determinando-se desta forma a região pro-vascular do embrião (Figura 2B).

O desenvolvimento vegetal pós-embrionário não é menos dependente de auxina. Durante o desenvolvimento do corpo vegetal, a aplicação local de auxina é suficiente para disparar a formação de folha ou flor no meristema apical (Reinhardt *et al.*, 2003) e de raízes laterais na parte basal da planta (Laskowski *et al.*, 1995), o que demonstra o papel relevante deste hormônio na organogênese em plantas. O acúmulo de auxina localmente em regiões de iniciação de órgãos laterais (raízes secundárias, folha, flor) se dá pela produção *de novo* de auxina e, amplamente, pela atividade de proteínas transportadoras de membrana, responsáveis pelo transporte polar

(direcional) de auxina – TPA (Tanaka *et al.*, 2006). Além disso, o TPA determina o estabelecimento de um gradiente de auxina no corpo vegetal no sentido ápice-base, o qual é responsável pela manutenção da dominância apical no corpo vegetal, ou seja, permanência das gemas laterais em seu estado latente (Leyser, 2005).

Figura 2. Padrões de distribuição de auxina em diversos processos do desenvolvimento de *Arabidopsis*. A visualização da distribuição de auxina pode ser feita devido à atividade de genes repórteres de auxina DR5::GFP (A, C, D, F e G) e DR5::GUS (E, H e I) (Vanneste & Friml, 2009) e através de desenho esquemático do embrião na fase triangular (B) (Tanaka *et al.*, 2006). (A) ápice de órgãos florais em desenvolvimento; (B) embrião na fase triangular; (C) célula apical de um zigoto em divisão; (D) embrião em fase globular; (E) hipocótilo após tratamento com luz de forma unilateral (à direita); (F) sítio de início de formação de órgãos florais no meristema; (G) meristema apical da raiz; (H) sítio de iniciação de raiz lateral; (I) raiz lateral no início do alongamento (retirada com modificações de Tanaka *et al.*, 2006 e Vanneste & Friml, 2009).

Em plantas, o desenvolvimento das raízes consiste na formação de raiz primária e de raízes secundárias (ou laterais). O início da formação de raízes laterais se dá através do acúmulo

de auxina em células específicas do periciclo vegetal (Figura 2H), com subsequente acúmulo de auxina nas células da ponta do primórdio da raiz lateral em expansão (Figura 2I). Na formação da raiz primária, auxina apresenta um acúmulo pronunciado, tanto nas células da columela, quanto no centro quiescente (Figura 2G), apresentando uma redução nas concentrações de auxina nos tecido da raiz com maior maturidade (Vanneste & Friml, 2009).

Plantas são sensíveis a alterações no ambiente externo, como mudanças na disposição espacial do corpo vegetal ou eventual alteração na quantidade e direcionalidade da luz que a planta recebe. Ambos os fatores induzem respostas desenvolvimentais nas plantas, denominadas tropismos. O gravitropismo tem seus efeitos diretamente relacionados com a distribuição desigual de auxina nas raízes e no caule, em plantas posicionadas horizontalmente em relação ao solo. Plantas nesta disposição apresentam o redirecionamento de transportadores de auxina na membrana das células vegetais, o que, sugere-se, ser fundamental para o acúmulo de auxina na parte do corpo vegetal próxima ao solo (Esmon, 2006). Quantidades aumentadas de auxina disparam respostas diferenciais em raízes e caule: raízes são mais sensíveis, apresentando uma inibição no crescimento frente a concentrações elevadas de auxina na parte inferior, próxima ao solo, enquanto que um efeito oposto é observado em estruturas aéreas: níveis aumentados de auxina promovem o crescimento do hipocótilo e caule. Os efeitos de auxina na inibição e no estímulo do crescimento de raízes e partes aéreas, respectivamente, são responsáveis por proporcionar a capacidade apresentada pelas plantas de conseguirem, eventualmente, se re-estabelecerem no plano vertical de crescimento, com suas raízes voltadas para o solo e a parte aérea em direção à luz (Esmon *et al.*, 2006). O fototropismo ocorre em resposta a uma fonte de luz unidirecional, onde, igualmente, um gradiente de auxina é estabelecido por meio do rearranjo interno de transportadores de membrana de auxina. A auxina se acumula nas regiões de sombra, ocasionando o crescimento dos tecidos vegetais nesta região. O crescimento desigual proporcionado por auxina direciona as partes aéreas da planta em direção à fonte de luz (Figura 2E).

Na parte aérea, o meristema apical das plantas é responsável pela geração sucessiva de órgãos laterais (folhas e flores). O estabelecimento de máximas de auxina nas bordas do meristema apical é determinante para o desenvolvimento dos primórdios dos órgãos laterais (Figura 2F). A formação dos primórdios dos diferentes verticilos florais (sépalas, pétalas, estames e carpelos) também é um evento altamente dependente de quantidades elevadas de auxina. Observam-se grandes concentrações de auxina, especificamente nas células do ápice de todos os verticilos florais, incluindo carpelos, desde os estádios iniciais do desenvolvimento (Figura 2A). Qualquer interferência neste processo resulta na incapacidade parcial, ou total, de formação de órgãos florais (Okada *et al.*, 1991, Benková *et al.*, 2003).

1.7 - Desenvolvimento inicial do pistilo e sua homologia às folhas

O pistilo, como descrito previamente, é formado por um ou mais carpelos. A hipótese de longa data de J. W. von Goethe (1749 – 1832), de que os verticilos florais (sépalas, pétalas, estames e carpelos) são folhas “metamorfosadas” (von Goethe, 1790), tem sido amplamente retomada após inúmeros estudos moleculares sobre as redes gênicas envolvidas no desenvolvimento de folhas e das estruturas florais (revisado em Balanzá *et al.*, 2006). Por apresentarem a mesma ontogenia, folhas e carpelos compartilham muitos dos mecanismos genéticos básicos de desenvolvimento. Um simples e elegante argumento a favor desta teoria é a completa transformação de órgãos florais em folhas a partir da mutação em apenas três genes responsáveis pela especificação do meristema floral e redundantes entre si (triplo mutante SEPALLATA; Pelaz *et al.*, 2001) ou o oposto: a conversão de estruturas vegetativas (folhas) em estruturas florais, através da expressão ectópica de genes de identidade dos órgãos florais, como, por exemplo, triplo-transgênicas 35S::SEPALLATA/35S::PISTILLATA/35S::APETALA3 (Honma & Goto, 2001).

A maior parte dos conhecimentos sobre os processos genéticos e fisiológicos que determinam o desenvolvimento de plantas, incluindo folhas e pistilo, é proveniente dos estudos com a planta *Arabidopsis thaliana*.

Em *Arabidopsis*, assim como em todas as angiospermas, a diferenciação das células periféricas do meristema apical do caule (do inglês, “*shoot apical meristem – SAM*”) é responsável por originar folhas e inflorescências. O meristema apical é mantido na forma indiferenciada por fatores de transcrição da classe KNOX (Hake *et al.*, 2004), os quais são negativamente regulados por uma máxima de auxina (Balanzá *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, o aumento na concentração de auxina na periferia do meristema apical acarreta na determinação da zona de emergência do órgão lateral a ser formado: folha ou inflorescência (Figura 3). A manutenção da repressão da expressão dos fatores de transcrição KNOX no meristema apical é realizada pelos fatores de transcrição ASSYMETRIC LEAVES 1 e 2 (AS1 e AS2). Além da auxina, sabe-se que baixos níveis de citocinina e altos níveis de giberelina são requeridos para a indução da formação de órgãos a partir do meristema apical (Jasinski *et al.*, 2005). Os genes KNOX induzem a produção de citocinina e a redução de giberelina no meristema apical, contribuindo para a dormência deste (Balanzá *et al.*, 2006).

A assimetria dorso-ventral (eixo abaxial-adaxial) das folhas é estabelecida logo no início da diferenciação do órgão floral em formação no meristema apical (Figura 3). Este fenômeno conta com a expressão de diferentes conjuntos de genes em cada domínio (abaxial ou adaxial). Dentre os genes que conferem identidade à superfície adaxial do órgão lateral em desenvolvimento se encontram genes da família de fatores de transcrição HD-ZipIII (PHABULOSA, PHAVOLUTA e REVOLUTA; Prigge *et al.*, 2005) e a família de genes AS (AS1 e AS2), que também desempenha um papel importante na formação inicial do órgão lateral a partir do meristema apical, como mencionado anteriormente.

Figura 3: Interação entre fatores de transcrição e seus reguladores hormonais na dormência do meristema apical no início do desenvolvimento de órgãos laterais (A) (retirada de Balanzá *et al.*, 2006) e (B) (retirada de Moon & Hake 2011). GA = ácido giberélico; CK = citocinina; KNOX = fatores de transcrição da classe homeobox KNOX-I; AS = genes ASSYMETRIC LEAVES; HD-ZIP = fatores de transcrição PHABULOSA, REVOLUTA e PHAVOLUTA da classe HD-ZIP-III; miR165/166 = microRNAs 165 e 166; KAN = fatores de transcrição da classe KANADI; YABBY = fatores de transcrição da classe YABBY.

A especificação da parte abaxial é realizada pela expressão de microRNAs (miRNA 165 e miRNA166), pelos fatores de transcrição da família KANADI (KAN), pelos genes da família YABBY (YAB) e pelos fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTOR 3 e 4 (ARF3 e ARF4; Figura 3 B). Estes últimos (ARF3 e ARF4) apresentam sobreposição de função com os genes KAN e são excluídos da parte adaxial pela clivagem de seus RNA mensageiros por *trans-acting short interfering RNAs* (ta-siRNA), os quais são produzidos pela clivagem do transcrito não-codificante TAS3, pelo microRNA390 (Fahlgren *et al.*, 2006). Como esperado, a maior parte dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* para os genes envolvidos no desenvolvimento das folhas, também demonstram problemas correlatos no desenvolvimento do pistilo (revisado em Balanzá *et al.*, 2006).

1.8 - Genes envolvidos no desenvolvimento apical-basal do pistilo e sua relação com auxina

O fito-hormônio auxina é crucial não somente para o desenvolvimento inicial dos órgãos florais a partir do meristema apical, mas a produção deste hormônio ao longo do desenvolvimento dos verticilos florais é igualmente indispensável ao correto desenvolvimento destes. Mutantes de *Arabidopsis thaliana* para genes da família YUCCA, de genes de biosíntese de auxina, comprovam a importância da produção do hormônio auxina ao longo do desenvolvimento dos pistilos (Figura 4).

Figura 4: Flores de mutantes de *Arabidopsis thaliana* *yuc1/yuc4* para os genes de biossíntese de auxina YUCCA1 e YUCCA4, expressos no pistilo e a restauração de fenótipo através da expressão do gene bacteriano de biossíntese de auxina triptofano-monoxigenase (*iaaM*) sob controle do promotor do gene YUCCA1 (retirada com modificações de Cheng *et al.*, 2006).

Quando tratados de forma exógena com químicos inibidores de TPA, como ácido 2,3,5-triiodobenzóico (TIBA) ou ácido nafilftalâmico (NPA), pistilos de *Arabidopsis thaliana* apresentam problemas no desenvolvimento (Figura 5). Este fato demonstra que, além da produção, o transporte de auxina desempenha um papel crucial no desenvolvimento deste órgão floral. Devido aos fenótipos apresentados por pistilos tratados com inibidores de transporte de auxina e por mutantes de genes envolvidos na sinalização por auxina (ver abaixo), Nemhauser *et al.* (2000) propuseram um modelo no qual grandes quantidades de auxina são produzidas na parte apical do pistilo, com subsequente transporte ápice-base deste hormônio, durante o desenvolvimento do pistilo. De acordo com este modelo, altas concentrações de auxina no ápice do pistilo seriam responsáveis pela diferenciação e proliferação de estigma e estilete, níveis intermediários especificariam o desenvolvimento do ovário e baixos níveis de auxina determinariam o desenvolvimento do ginóforo na base do pistilo (Nemhauser *et al.*, 2000).

Figura 5: Pistilos de plantas selvagens sem tratamento químico (A), tratadas com solução 10 μ M de NPA (B) e com solução 100 μ M de NPA (C). Observa-se um aumento no comprimento do estilete em (B) e um pronunciado aumento em ambos estigma e estilete em (C). v = valva; r = replum; o = ovário; et = estilete e sg = estigma (retirada de Nemhauser *et al.*, 2000)

Como mencionado anteriormente, a família gênica de fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), da via de sinalização nuclear por auxina, é constituída por 23 membros em *Arabidopsis thaliana*. A caracterização fenotípica de mutantes simples e duplo-mutantes para estes genes tem sido realizada para alguns membros (revisado em Okushima *et al.*, 2005). Efeitos fenotípicos nas estruturas vegetativas, bem como nos pistilos, têm sido observados nestes mutantes (ver abaixo).

Os *loci* codificadores para os 23 ARFs estão dispostos ao longo dos 5 diferentes cromossomos de *Arabidopsis thaliana* (Figura 6). Após alinhamento e análise das seqüências dos 23 ARFs gerou-se uma árvore filogenética (Figura 7), indicadora da similaridade entre os diferentes membros desta classe de fatores de transcrição (Okushima *et al.*, 2005).

Figura 6: Disposição cromossômica dos loci dos membros da família Auxin Response Factors (ARFs) ao longo dos 5 cromossomos de *Arabidopsis thaliana* (retirada de Okushima *et al.*, 2005)

Figura 7: Análise filogenética da seqüência de proteínas dos diferentes membros da família de fatores de transcrição ARFs de *Arabidopsis thaliana* (retirada de Okushima *et al.*, 2005).

Com exceção das mutações individuais para os genes ARF2 (Schruff *et al.*, 2005), ARF3/ETTIN (Sessions & Zambryski, 1995, Nemhauser *et al.*, 2000), ARF5 (Hardtke & Berleth, 1998), ARF7 (Harper *et al.*, 2000) e ARF10 (Liu *et al.* 2007), nenhum outro mutante simples (“*arf*”) apresenta alterações fenotípicas em partes vegetativas e no pistilo, sugerindo a existência de vias paralelas (redundância) de sinalização de auxina por ARFs. De fato, a realização de cruzamentos entre mutantes individuais para membros próximos filogeneticamente (Figura 7) revelou sobreposição de função entre proteínas próximas em seqüência: apesar de mutantes *arf1* não apresentarem fenótipos óbvios, a obtenção de duplo-mutantes *arf1/arf2* resultou em plantas com fenótipos similares aos de *arf2*, porém recrudescidos (Okushima *et al.*, 2005). O gene ARF2 codifica um fator de transcrição envolvido na inibição da divisão celular e

no crescimento vegetal (Schruff *et al.*, 2005). Mutantes *arf2* apresentam diversas estruturas vegetais aumentadas, incluindo folhas e pistilos (Figura 8A).

O gene ARF4 é o membro da família ARF que apresenta maior similaridade ao membro ARF3. O mutante de ARF3 (*arf3/ettin*) apresenta severas alterações morfológicas no pistilo (Figura 8B) e tem sido amplamente referido como determinante-chave da especificação dos tecidos abaxiais do pistilo (Sessions & Zambryski, 1995; Nemhauser *et al.*, 2000). O duplo mutante *arf3/arf4* apresenta problemas adicionais na diferenciação de células abaxiais de folhas. As folhas de plantas *arf3/arf4* apresentam pronunciada adaxialização da superfície abaxial (Pekker *et al.*, 2005). Este fato evidencia uma maior redundância no programa genético por trás do desenvolvimento de folhas, como esperado, uma vez que folhas são estruturas evolutivamente mais antigas que os pistilos (Balanzá *et al.*, 2006).

A proteína ARF5 tem sido majoritariamente correlacionada com a formação do eixo principal (ápice-base) nas fases iniciais de desenvolvimento do embrião, além de estar intimamente correlacionada ao correto desenvolvimento de feixes vasculares (Hardtke & Berleth, 1998; Wenzel *et al.*, 2007). Embora o padrão de expressão de ARF5 tenha sido investigado e a expressão deste gene confirmada em pistilos de *A. thaliana* (Figura 8D), a literatura carece de informações sobre os efeitos deletérios da mutação *arf5* no desenvolvimento do pistilo. Isto, provavelmente, se deve ao fato de mutações *arf5* serem letais às plantas e, portanto, requererem outras estratégias de estudo (p.ex. por sistemas indutíveis ou silenciamento tecido-específico) para se investigar os efeitos da ausência desta proteína em pistilos.

Figura 8: Fenótipos de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para genes da via de sinalização por auxina *Auxin Response Factor* (ARFs). (A) flor de planta selvagem (*wild type* - wt; esquerda) e de planta mutante *arf2*; (B) pistilo de planta selvagem (wt; esquerda) e mutante *arf3*; (C) flores de planta selvagem (wt; esquerda) e de planta super-expressando ARF17 na forma resistente à clivagem pelo microRNA160a (35S::mARF17); (D) embrião selvagem (wt) e embrião mutante para *arf5/monopteros* e padrão de expressão de ARF5 analisado por ARF5pro::GUS; (E) pistilo de planta duplo-mutante *arf3/arf4*; (F) pistilo fertilizado de planta selvagem (wt) e de planta mutante mARF10 (com mutação sítio-específica que confere resistência a clivagem do RNAm de ARF10 pelo microRNA160).

G**ARF6 e ARF8** **Tabata *et al.*, 2010**

Figura 8 (cont.): (G) flores de planta selvagem (*wild type* - WT), de planta mutante *arf6*, de planta mutante *arf8* e de planta mutante *arf6/arf8*. Analisando-se o gráfico, observa-se redução pronunciada em todos os verticilos florais a partir do estágio 12 do desenvolvimento floral de *Arabidopsis thaliana*. Adicionalmente, observa-se uma considerável redução na superfície estigmática no pistilo das plantas *arf6/arf8*, comparado ao pistilo de planta selvagem (WT). Eixo vertical nos gráficos representam tamanho dos verticilos florais (em mm) e no eixo horizontal encontram-se os estágios do desenvolvimento floral de *A. thaliana*. vermelho escuro = flor selvagem; vermelho claro = mutante *arf8*; verde claro = mutante *arf6* e verde escuro duplo-mutante *arf6/arf8*.

As plantas de *Arabidopsis* mutantes individuais *arf6* e *arf8* apresentam alterações morfológicas sutis comparadas ao duplo mutante *arf6/arf8* (Figura 8G). Plantas duplo-mutantes *arf6/arf8* apresentam, com exceção das sépalas, acentuado atraso de desenvolvimento em todos os verticilos florais (Figura 8G). Este fenômeno é atribuído à produção reduzida de ácido jasmônico. Acredita-se que ambos ARF6 e ARF8 ativem a transcrição de DAD1 (DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE 1), um gene da via de biossíntese de ácido jasmônico (Tabata *et al.*, 2010).

O mutante simples *arf7* apresenta problemas no desenvolvimento vegetativo e ausência de fototropismo (Liscum & Briggs, 1995). Apesar de o mutante simples *arf19* apresentar fenótipo normal (selvagem), o duplo mutante *arf7/arf19* apresenta defeitos mais intensos que aqueles apresentados pelo mutante simples *arf7* (Okushima *et al.*, 2005). Análises preliminares pelos autores, entretanto, sugerem a inexistência de diferenças na fertilidade e na morfologia das flores de plantas duplo-mutantes *arf7/arf19*. Sabe-se que ARF19 faz o *cross-talk* entre auxina e etileno (Li *et al.*, 2006).

O gene ARF10 está relacionado ao desenvolvimento de raízes (Wang *et al.*, 2005), folha, flor e frutos (Liu *et al.*, 2007). Mutantes *arf10* exibem folhas serradas, reduzidas em tamanho e as plântulas *arf10* apresentam hipersensibilidade ao ácido abscísico (ABA). Os pistilos de plantas *arf10*, assim como os frutos provenientes destes, possuem problemas no desenvolvimento, apresentando aspecto ondulado (Figura 8F). O gene ARF10 é alvo do microRNA160a. Linhagens duplo-mutantes *arf10/arf16* e plantas contendo a construção 35S::MIR160a apresentam os mesmos fenótipos, que são os fenótipos intensificados de *arf10*, em adição a uma pronunciada insensibilidade ao gravitropismo (Wang *et al.*, 2005). O gene ARF17, assim como os genes AR10 e ARF16, também é clivado pelo MIR160a. ARF17 tem sido relacionado a diversos aspectos do desenvolvimento vegetal e, apesar de mutantes *arf17* não apresentarem alterações morfológicas óbvias (Okushima *et al.*, 2005), plantas de *A. thaliana* super-expressando formas ARF17 resistentes à clivagem pelo MIR160a (35S::mARF17) apresentam falhas no desenvolvimento de raízes, folhas e flores. As flores das plantas 35S::mARF17 apresentam redução no tamanho de todos verticilos florais, incluindo pistilo (Figura 8C).

Os genes ARF9, ARF11, ARF12, ARF13, ARF14, ARF15, ARF18, ARF20, ARF21, ARF22 e ARF23 ainda aguardam caracterizações moleculares e fenotípicas.

Outros fatores de transcrição, direta ou indiretamente relacionados à auxina, têm sido descritos como reguladores do desenvolvimento do pistilo de *Arabidopsis thaliana*. Dentre eles:

AINTEGUMENTA (ANT), CRABS CLAW (CRC), JAGGED (JAG), LEUNIG (LUG), SEUSS (SEU), SPATULA (SPT) e STYLISH1 (STY1) (revisado em Staldal & Sundberg, 2009).

O gene SPT, pertencente à família bHLH de fatores de transcrição, é normalmente expresso nas margens dos carpelos em desenvolvimento (Heisler *et al.*, 2001). Plantas de *Arabidopsis* mutantes para SPATULA (*spt*) apresentam ausência dos tecidos do pistilo responsáveis pela transmissão do tubo polínico em direção ao ovário: estigma, estilete e tecido transmissor (Figura 9). Apesar destes defeitos no desenvolvimento do pistilo, mutantes *spt* conseguem formar frutos e sementes, embora em quantidades reduzidas (Heisler *et al.*, 2001). Análises genéticas demonstraram que SPT age em conjunto com outros dois genes na especificação de tecidos do pistilo: AGAMOUS (AG) e CRABS CLAW (CBC) (Alvarez & Smyth, 1999). No desenvolvimento da flor, o gene homeótico AG - da classe-C do modelo ABC (para uma revisão do modelo ABC ver Causier *et al.*, 2010) -, após desempenhar sua função na especificação do terceiro e do quarto verticilos no meristema floral, age na especificação da morfologia celular dos tecidos da parede do carpelo e no desenvolvimento do estilete, na parte apical do pistilo (Alvarez & Smyth, 1999). O gene CRC atua na padronização da estrutura do carpelo em seu formato caracteristicamente alongado, diferindo-o da forma achatada e oval de folhas (Alvarez & Smyth, 1999). Plantas *crv* de *Arabidopsis*, mutantes para o gene CRC, apresentam pistilos mais curtos e largos que pistilos de plantas selvagens, com problemas adicionais na especificação dos tecidos da parte apical (Figura 9).

Plantas resultantes do cruzamento entre mutantes *spt* e *crv* foram obtidas (Alvarez & Smyth, 1999). As plantas duplo-mutantes *crv/spt* de *Arabidopsis* apresentaram fenótipos no pistilo ainda mais severos que os fenótipos apresentados por mutantes individuais *spt* e *crv*. O pistilo das plantas *crv/spt* apresenta expressiva perda da morfologia característica deste órgão, observando-se uma incapacidade de fusão dos carpelos (Figura 9).

CRABS CLAW e SPATULA

Alvarez & Smyth, 1999

Figura 9: Pistilo de plantas *Arabidopsis* selvagem (WT), mutante para o gene CRABS CLAW (*crc*), mutante para o gene SPATULA (*spt*) e duplo-mutante *crc/spt*. Observam-se alterações na formação da parte apical e na composição interna dos pistilos de plantas mutante-simples *crc* e *spt*, porém efeitos muito mais severos são observados nos pistilos onde ambos os genes SPT e CRC estão mutados (retirado com modificações de Alvarez & Smith, 1999).

Outra interessante interação alélica se dá entre *arf3* e *spt*. O gene SPT encontra-se ectopicamente expresso no pistilo de mutantes *arf3*. Além disso, plantas duplo-mutantes *arf3/spt* apresentam considerável perda do fenótipo *arf3* (Figura 10). Sugere-se, desta forma, que os fenótipos observados nos mutantes *arf3* se devem à ação ectópica do fator de transcrição SPT nas plantas *arf3* (Heiler *et al.*, 2001).

Figura 10: Pistilo de plantas *Arabidopsis* selvagem (WT), mutante para o gene SPATULA, para o gene AUXIN RESPONSE FACTOR 3 (ARF3) e para o duplo mutante *spt/arf3*. Observa-se que os defeitos fenotípicos provocados pela ausência da proteína ARF3 no pistilo (*arf3*) se encontram amplamente restaurados no duplo-mutante *spt/arf3* (retirado com modificações de Heisler *et al.*, 2001).

O fator de transcrição SEU interage fisicamente com ARF3 e ambos têm sido relacionados como reguladores do desenvolvimento do pistilo, a partir do controle transcricional de genes de resposta à auxina (Staldal & Sundberg, 2009). Mutantes *seu* de *A. thaliana* apresentam problemas na formação da parte apical do pistilo (Figura 11), além de diversos defeitos pleiotrópicos, como número e identidade de órgãos florais alterados; órgãos florais afilados, planta com estatura reduzida; aumento das ramificações laterais e redução no número de sementes por fruto (Franks *et al.*, 2002). A proteína SEUSS também interage fisicamente com a proteína LEUNIG (LUG). Duplo-mutantes *seuss/leu* apresentam um maior número de estruturas carpelóides nos verticilos 1. Este efeito é atribuído à ação conjunta de SEUSS, LUG e do gene homeótico da classe A APETALLA2, na restrição da expressão de AGAMOUS aos verticilos florais 3 e 4. Quando SEUSS e LUG estão ausentes, AGAMOUS passa a ter expressão ectópica nos outros verticilos florais.

Além de alterações na identidade dos verticilos florais, plantas provenientes do cruzamento entre *seu* e *lug* apresentam problemas morfológicos ainda maiores no pistilo, se comparadas com os mutantes simples *seu* e *lug* (Figura 11).

Figura 11: Pistilo de plantas *Arabidopsis* selvagem (WT), mutante para os genes SEUSS (SEU), LEUNIG (LUG) e duplo-mutante *seu/lug*. Ambos os mutantes simples *seu* e *lug* apresentam problemas no desenvolvimento do pistilo. Plantas duplo-mutantes *seu/lug* apresentam defeitos severos no desenvolvimento do pistilo, apresentando perda quase que total dos tecidos que compõem este órgão (retirado com modificações de Pfluger & Zambryski, 2004; Liu & Meyerowitz, 1995; Franks *et al.*, 2002).

Os fatores de transcrição AINTEGUMENTA (ANT) e LUG apresentam sobreposição parcial de função no desenvolvimento do pistilo, sendo ambos necessários para a correta formação do replum, do septo, da placenta e do estigma e estilete de *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2001). O mutante *ant* apresenta problemas moderados no desenvolvimento do pistilo (Figura 12), porém o cruzamento deste mutante com mutantes da família YABBY, incluindo o membro FILAMENTOUS FLOWER (FIL), resulta em pistilos com tamanho gradativamente reduzido (Figura 12). Este fato sugere que ANT e os genes da família YABBY atuem em vias paralelas no desenvolvimento do pistilo, desempenhando funções similares na especificação do tamanho e dos tecidos deste órgão (Nole-Wilson & Krizek, 2006).

Figura 12: Flores de plantas *Arabidopsis* selvagem (WT), mutantes para o gene AINTEGUMENTA (*ant*), para o gene da família FILAMENTOUS FLOWER (FIL); duplo-mutantes para os genes FIL/YABBY-3 (*fil/yab-3*); para os genes FIL e ANT (*fil/ant*) e flores de triplo-mutantes *fil/ant/yab-3*. Pistilos de plantas *ant* e *fil* apresentam fenótipo com defeitos leves quando comparados aos defeitos apresentados por pistilos das plantas duplo-mutantes *fil/yab-3* e *fil/ant* ou triplo-mutante *fil/ant/yab-3* (retirado com modificações de Elliot *et al.*, 1996 e Nole-Wilson & Krizek, 2006).

O gene JAGGED (JAG) também age de forma redundante no desenvolvimento do pistilo, porém o faz com o gene NUBBIN (NUB). Embora os mutantes simples *jag* e *nub* apresentem problemas moderados no desenvolvimento do pistilo, o duplo mutante *jag/nub* apresenta problemas severos na formação das valvas (paredes) do pistilo (Figura 13).

Figura 13: Flores de plantas *Arabidopsis* selvagem (WT) e duplo-mutante *jag/nub*, respectivamente, para os genes JAGGED e NUBBIN. Pronunciadas alterações na composição dos tecidos do pistilo são observadas nas plantas mutantes (retirado com modificações de Dinneny *et al.*, 2006).

Membros da família de fatores de transcrição SHI/STY apresentam pronunciada expressão na parte apical do pistilo e atuam na regulação do desenvolvimento deste órgão de uma forma dose-dependente (Figura 14). Demonstrou-se que membros da família SHI/STY ativam a transcrição de genes da família YUCCA (Sohlberg *et al.*, 2006), responsáveis por promover a biossíntese de auxina (Cheng *et al.*, 2006; Mashiguchi, 2011).

Figura 14: Pistilos de planta selvagem (a) e mutantes para genes da família gênica SHI/STY: (b) *sty1-1*. (c) *sty1-1/sty2-1*. (d) *sty1-1/shi-3*. (e) *sty1-1/lrp1*. (f) *sty1-1/srs5-1*. (g) *sty1-1/srs5-1/lrp1*. (h) *sty1-1/sty2-1/srs5-1*. (i) *sty1-1/sty2-1/lrp1* (j) *sty1-1/sty2-1/shi-3*. (k) *sty1-1/shi-3/lrp1*, (l) mutante quádruplo e (m) mutante quádruplo. Observa-se um efeito dose-dependente nos mutantes desta família gênica, indicando redundância de função entre os membros da família (retirado com modificações de Kuusk *et al.*, 2006).

Adicionalmente, observou-se que plantas duplo-mutantes para dois membros da família (*sty1/sty2*) apresentam, de fato, níveis reduzidos de auxina e a micro-aplicação de auxina é capaz de restaurar o fenótipo do pistilo destas plantas (Staldal *et al.*, 2008). Isto sugere que os fenótipos

apresentados pelas plantas mutantes para membros da família SHI/STY sejam efeitos de níveis reduzidos do fito-hormônio auxina no ápice do pistilo. A super-expressão de STY1 é capaz de restaurar o fenótipo dos mutantes *lug*, *sen*, *sen/lug*, *crc* e *spt* (Staldal & Sundberg, 2009) e o tratamento de pistilos de plantas mutantes *spt*, *sty1*, *sty1/sty2*, *ant*, *jag*, *jag/nub*, *crc*, *sen* e *lug* com inibidor do transporte polar de auxina (NPA) também ocasiona a restauração do fenótipo mutante na parte apical do pistilo destas plantas (Figura 15), mas não na parte basal deste órgão (Nemhauser et al., 2000; Sohlberg et al., 2006; Staldal et al., 2008). Conclui-se, portanto, que a auxina tem a capacidade de promover o desenvolvimento e a diferenciação dos tecidos da parte apical do pistilo (estigma e estilete) de forma independente de LUG, SEU, CRC, SPT ANT, JAB e NUB, sugerindo que estes genes atuam em uma via paralela ou *upstream* da ação de auxina no ápice do pistilo (Staldal & Sundberg, 2009).

Figura 15: Restauração do fenótipo do pistilo de planta *Arabidopsis* mutante para o gene SPATULA e de planta duplo-mutante JAGGED/NUBBIN mediante a aplicação do inibidor de transporte polar de auxina (NPA). A aplicação de NPA ocasiona a interrupção do transporte de auxina da região apical para as células da região basal do pistilo. Este fato indica que o acúmulo de auxina na parte apical é suficiente para suprir a ausência das proteínas SPT, JAG e NUB no pistilo (retirado com modificações de Nemhauser et al., 2000 e Staldal et al., 2008).

A família gênica NGATHA (NGA) atua em paralelo à família gênica SHI/STY na promoção da produção de auxina na parte apical do pistilo, através da ativação da transcrição de genes da família YUCCA (Trigueiros et al., 2009). Plantas de *Arabidopsis* duplo-mutante *nga-3/sty1*

apresentam problemas severos na formação do ápice do pistilo (estigma e estilete), apresentando estruturas tipo folhas nesta região (Figura 16)

Figura 16: Morfologia da parte apical do pistilo de plantas *Arabidopsis thaliana* duplo-mutantes *nga-3/sty1* para os genes NGATHA e STY1. Observa-se que, no lugar de estigma e estilete, plantas duplo-mutantes *nga-3/sty1* apresentam estruturas com aspecto de folhas na região apical do pistilo (Figura extraída de Trigueiros *et al.*, 2009).

1.9 - Catabolismo e conjugação de auxina em plantas

Plantas utilizam a inativação de auxina como estratégia para controlar as quantidades ativas deste fito-hormônio em células vegetais. Uma das formas de inativação de auxina é a conjugação deste hormônio a moléculas de variadas naturezas, como peptídeos, açúcares, aminoácidos e lipídeos. As conjugações reversíveis de auxina são uma forma de prover reservas deste hormônio para futura utilização pelas células vegetais, sem a necessidade de biossíntese *de novo*. Estima-se que apenas 1% de toda auxina contida em células vegetais se encontra na forma livre (Woodward & Bartel, 2005). Dentre as formas mais comuns de conjugação reversível de auxina a moléculas endógenas listam-se os conjugados: AIA-alanina, AIA-leucina e o AIA-ácido indol-3-butírico (IBA). O complexo AIA-IBA provê auxina através de sua hidrólise ou pela sua β -oxidação (Tromas & Perrot-Rechenmann, 2010). Dentre as formas irreversíveis de inativação de auxina estão as formas conjugadas: IAA-glutamato, IAA-aspartato. Outra forma de inativação

permanente de auxina é através da oxidação deste fito-hormônio por auxina-oxidases (Kowalczyk & Sandberg, 2001).

1.10 - Vias de produção de auxina em plantas

O principal precursor de auxina (ácido indol-3-acético - AIA) é o aminoácido triptofano (Zhao, 2010). As principais vias de produção de auxina em plantas, que realizam a conversão de triptofano a AIA, são realizadas por genes endógenos das plantas, tais como a via do ácido indol-pirúvico (IPA), via da triptamina (TAM) e a via da indol-acetonitrila (IAN; Zhao, 2010).

Estudos genéticos e enzimáticos demonstraram que ambas as famílias de enzimas TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE de ARABIDOPSIS (TAA) e YUCCA (YUC) são requeridas para a biossíntese de auxina durante o desenvolvimento de plantas. Porém, estas enzimas eram colocadas em duas rotas de biossíntese independentes: via do IPA e via da TAM, respectivamente (Zhao, 2010). Estudos recentes demonstraram que a família de enzimas TAA produz o intermediário ácido indol-3-pirúvico (IPA) a partir de triptofano, sendo a família de enzimas YUC responsável pela conversão de IPA à auxina (Mashiguchi *et al*, 2011). A via TAA/YUC constitui a primeira descrição de uma via completa de biossíntese de auxina por enzimas de origem exclusivamente vegetal.

Por outro lado, há muito se conhece uma via alternativa completa de produção de AIA em plantas, porém realizada por genes de bactérias. A via bacteriana de produção de auxina em plantas, denominada de via da indol-acetamida (IAM), envolve duas enzimas: a triptofano monoxigenase e a IAM hidroxilase, codificadas, respectivamente, pelos genes *iaaM* e *iaaH* (Klee *et al*, 1987).

1.11 – Os genes bacterianos *iaaM* e *iaaH* em plantas

Embora a via bacteriana completa de produção de auxina em plantas seja composta por duas enzimas, demonstrou-se que a expressão da enzima triptofano monoxigenase (gene *iaaM*) é

suficiente para causar aumentos significativos na quantidade de auxina em plantas (Klee *et al.*, 1987). Desta forma, o gene *iaaM* tem sido usado como uma importante ferramenta no estudo de processos do desenvolvimento de plantas relacionados à auxina.

Plantas de *Nicotiana tabacum* expressando o gene *iaaM* de forma constitutiva, através da fusão com o promotor viral 35S, apresentaram níveis significativamente aumentados de auxina em ambas as formas, livre e conjugada, o que resultou em plantas transgênicas com acentuadas alterações fenotípicas relacionadas à auxina, como formação de raízes adventícias, aumento da lignificação e dominância apical pronunciada (Sitbon *et al.*, 1991).

Ni *et al.* (2002) mostraram que a expressão do gene *iaaM* de forma tecido-específica em anteras de *N. tabacum* promove severas alterações morfológicas nos grãos de pólen, com conseqüente redução na taxa de fertilidade. A expressão do gene *iaaM* de forma tecido-específica em ovário de *N. tabacum* e de *Solanum lycopersicum* mostrou-se capaz de promover o desenvolvimento de frutos partenocárpicos em ambas as espécies (Rotino *et al.*, 1997; Molesini *et al.*, 2009).

Embora a expressão do gene *iaaM* seja há muito utilizada para estudar os efeitos da auxina em plantas, não existem informações na literatura sobre a expressão deste gene de forma específica nos tecidos que recebem os grãos de pólen no processo de polinização, ou seja, a região estigmática.

1.12 - O promotor STIG1

Goldman *et al.* (1994) identificaram e caracterizaram o gene STIG1 de *N. tabacum*. Experimentos de northern blot (Figura 17) e de hibridização *in situ* (Figura 18B) demonstraram que o transcrito STIG1 é expresso especificamente na zona secretória do estigma de *N. tabacum*. Plantas transgênicas de *N. tabacum* expressando o gene repórter GUS, sob o controle do promotor do gene STIG1, evidenciaram que este promotor direciona a transcrição de forma exclusiva no estigma desta planta (Figura 18A).

Figura 17: Northern blot do gene STIG1 (A) mostrando o padrão de expressão deste gene, nos estigmas/estiletes de *N. tabacum* (extraído de Goldman *et al.*, 1994), ao longo dos 12 estádios do desenvolvimento floral (B; extraído de Koltunow *et al.*, 1990).

O promotor STIG1 é regulado ao longo do desenvolvimento floral (Figura 17). Ele promove altas taxas de transcrição a partir do estágio -2 do desenvolvimento floral (estádios descritos por Koltunow *et al.*, 1990), quando a zona estigmática do pistilo inicia sua formação. Os níveis de transcrição declinam nos estádios finais de desenvolvimento do pistilo, chegando a níveis baixos de expressão no último estágio (estádio 12) do desenvolvimento (Goldman *et al.* 1994). Dessa forma, o promotor STIG1 se apresenta como uma interessante ferramenta para estudos do desenvolvimento do pistilo, uma vez que este promotor promove a transcrição de forma tecido-específica no estigma e acentuada nas fases iniciais e críticas de diferenciação e desenvolvimento do pistilo.

Figura 18: O gene STIG1 se expressa especificamente na zona secretória do estigma de *N. tabacum*. (A) O promotor STIG1 é capaz de dirigir a expressão do gene repórter GUS especificamente nas células da zona secretória do estigma; (B) Híbridização *in situ*, demonstrando a presença do transcrito STIG1 apenas na zona secretória do estigma de *N. tabacum*; P = papilas, SZ = zona secretória, VB = feixe vascular, TT= tecido transmissor, ST = estigma, SL = estilete; (extraído de Goldman *et al.*, 1994).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estudar os efeitos de níveis aumentados de auxina no desenvolvimento do pistilo, usando a planta de *Nicotiana tabacum* como modelo.

2.2 - Objetivos específicos

I) Produzir plantas transgênicas de *N. tabacum* com níveis aumentados de auxina no pistilo, por meio da expressão do gene *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens*, sob o controle do promotor específico de estigma STIG1;

II) Analisar os fenótipos das plantas transgênicas, comparando-as com as selvagens, principalmente com relação à morfologia do pistilo e aos parâmetros reprodutivos.

III) Caracterizar, através de RT-PCR quantitativa, a expressão de genes putativos de resposta à auxina, no pistilo de plantas transgênicas e selvagens (controle);

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Plasmídeos utilizados

Para os experimentos realizados neste trabalho, foram usados os seguintes plasmídeos: pCR2.1-TOPO e pk7m34GW (Figura 5).

O plasmídeo pCR2.1-TOPO é o vetor de clonagem contido no kit TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen®). Este plasmídeo possui algumas características que facilitam a clonagem de produtos de PCR: 1) é linearizado; 2) possui nucleotídeos timina (T) nas extremidades 5'; e 3) possui fisicamente acoplada às suas extremidades a enzima topoisomerase. Desta forma, um produto de PCR de interesse, que possua adenina (A) livre em suas extremidades 3', é facilmente inserido neste vetor. Além disso, este vetor confere resistência aos antibióticos ampicilina e a canamicina quando presente em células procariontes, o que facilita a seleção de linhagens bacterianas durante as clonagens.

O vetor de destino pk7m34GW é utilizado para a clonagem de fragmentos de DNA através do Sistema Gateway de Clonagem (Invitrogen®), com a finalidade de expressar genes de interesse em organismos vegetais. Entre as bordas do T-DNA deste vetor encontram-se: 1) gene que confere resistência à canamicina às células vegetais transformadas; e 2) a região de integração do inserto de interesse (Figura 19). Além disso, este vetor confere resistência à estreptomicina e à espectinomicina, quando presente em células procariontes, o que facilita a seleção de linhagens bacterianas durante as clonagens.

Figura 19: (A) Vetor de clonagem pCR2.1-TOPO (3931pb) – LacZα: gene estrutural codificador da enzima β -galactosidase de *Escherichia coli*, utilizado como repórter e indicador de clonagem - quando sua ORF é interrompida pelo inserto clonado, a bactéria aceptora forma colônia com ausência de pigmento azul em meio contendo o substrato X-gal (tal substrato torna-se azul sob a ação da enzima β -galactosidase). Ampicillin e Kanamycin: genes que conferem resistência aos respectivos antibióticos, servindo para seleção das células procariontes transformadas. pUC ori- centro de origem de replicação plasmidial em células procariontes; (B) Vetor de expressão em plantas pK7m34GW (10198pb). Sm/Sp: Marcador de resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomomicina nas células bacterianas transformadas (*E. coli* e *Agrobacterium*); LB: Borda esquerda do T-DNA de *Agrobacterium*; Kan: Marcador de resistência à canamicina nas células vegetais transformadas; attR3 e attR4: Sítios de recombinação; CmR-ccdB: CmR: Resistência à cloramfenicol; ccdB: Sequência codificadora da proteína ccdB, responsável por se ligar à DNA girase, retardando o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*; T35S: Terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor; RB: Borda direita do T-DNA de *Agrobacterium*.

3.2 - Isolamento de plasmídeos: Mini-preparação de DNA plasmidial de *Escherichia coli*

Inoculou-se uma colônia de *E. coli* em 5mL de meio LB (10g/L Tripton; 5g/L Extrato de levedura; 10g/L NaCl) líquido, contendo antibiótico apropriado. Incubou-se a 37°C, sob agitação de 220rpm, por 16 horas. Transferiu-se parte da cultura para um tubo Eppendorf de 1,5mL. Centrifugou-se por 2 minutos a 13.000rpm e descartou-se o meio de cultura. Repetiu-se essa última etapa por mais uma vez. Ressuspendeu-se o precipitado celular em 175μL de TES (10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA, pH8; 15% sacarose). Adicionou-se 20μL de solução de lisozima (10mg/mL) e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente,

incubou-se a 73°C por 15 minutos e centrifugou-se por 15 minutos a 13.000rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo Eppendorf de 1,5mL. Adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. Deixou-se a -20°C por 1 hora e centrifugou-se por 15 minutos a 13.000rpm. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se secar e ressuspendeu-se em um volume adequado de água Milli-Q autoclavada.

3.3 - Quantificação da concentração de DNA

Uma alíquota (2µL) do DNA foi utilizada para quantificação de concentração de DNA no aparelho espectrofotométrico Nanodrop (Thermo Scientific®), gentilmente cedido pelo prof. Dr. Gustavo H. Goldman, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP. Foi considerado DNA de boa qualidade quando a relação das medidas de absorbância nos comprimentos de luz 260nm/280nm se mostrou maior ou igual a 1,8 e a relação das medidas de absorbância nos comprimentos de luz 260nm/230nm se mostrou maior ou igual a 2,0, o que indica alto grau de pureza em relação a contaminantes protéicos e fenólicos, respectivamente.

3.4 - Digestões enzimáticas de DNA

As digestões de DNA, com enzimas de restrição, foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL. As reações foram realizadas em um volume final de 20µL e utilizou-se tampão adequado para cada tipo de enzima utilizada, segundo recomendado pelo fabricante (New England Biolabs®). Utilizou-se 1 unidade de enzima para cada 1µg de DNA. As amostras foram deixadas por no mínimo 2 horas à temperatura adequada. Ao final de tal período, uma alíquota foi aplicada em gel de agarose, com subsequente corrida eletroforética.

3.5 - Eletroforese em gel de agarose

As corridas eletroforéticas foram realizadas em gel de agarose 1%, em tampão 1X TBE (solução estoque 5x TBE: 54 g de Tris base, 27,5g de ácido bórico, 20mL de EDTA 0,5 M pH

8,0 e água destilada para completar 1000 mL), contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA e permite a visualização das bandas de DNA, quando exposto à luz ultravioleta. Foi adicionado a cada uma das amostras um volume adequado de tampão de carregamento (tampão 6x: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL).

A mistura agarose/tampão foi aquecida em microondas, até o completo derretimento da agarose. O gel de agarose (ainda líquido) foi colocado em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, possibilitando a formação de canaletas, onde as amostras foram aplicadas. Após solidificação, o gel de agarose ficou disposto em uma cuba eletroforética de acrílico, e esta foi preenchida com tampão 1x TBE, ligado a um gerador que polariza a cuba. Devido ao fato do DNA possuir carga elétrica negativa, após aplicação de corrente elétrica, este migra entre os poros do gel em direção ao pólo positivo da cuba. Tal fenômeno permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular do fragmento de DNA. Os padrões de digestão foram analisados em transluminador de luz UV e comparados com marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®). Os padrões de digestão obtidos foram fotografados com foto-documentador Gel Logic 100 Imaging System (Kodak®).

3.6 - Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Foi utilizado o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®). Os fragmentos do gel foram recortados e pesados (peso máximo de 300mg). Adicionou-se tampão de ligação à membrana (*DNA binding solution*) a uma taxa de 10µL para cada 10mg de gel. Colocou-se por 10 minutos a 60°C. Homogenizou-se a solução gel/*DNA binding solution* em vortex e esta foi aplicada em uma coluna. Deixou-se a temperatura ambiente por 1 minuto e, então, centrifugou-se por 1 minuto a 13.200rpm. Adicionou-se 700 µL de tampão de lavagem à coluna e centrifugou-se novamente por 1 minuto a 13.200rpm. Adicionou-se 500µL de tampão de lavagem à coluna e centrifugou-se novamente por 1 minuto a 13.200rpm. A coluna vazia foi

centrifugada por 5 minutos a 13.200rpm para a secagem do etanol remanescente do tampão de lavagem. Adicionou-se um volume adequado (15 – 50µL) de água milliQ autoclavada à coluna e deixou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se, então, a coluna por 1 minuto a 13.200rpm. O DNA eluído em água foi armazenado a -20°C.

3.7 - Construção do vetor de expressão em plantas STIG1_{prom}::iaaM

A construção do vetor de expressão em plantas STIG1_{prom}::iaaM foi realizada através de amplificação dos fragmentos de interesse (promotor STIG1 e região codificadora iaaM) por PCR, seguida de recombinação sítio-específica entre os amplicons obtidos e o vetor de destino pk7m34GW, por meio do Sistema Gateway (Invitrogen®). Tal sistema se utiliza de recombinases de ação sítio-específicas dependentes da presença sítios de recombinação do fago λ (Landy, 1989). A introdução de seqüências específicas nas extremidades das seqüências de DNA de interesse é necessária e suficiente para o reconhecimento destes sítios pelas enzimas de recombinação, garantindo a inserção sítio-dirigida dos fragmentos de interesse no vetor de destino (Sistema Gateway, Invitrogen®).

3.7.1 - Amplificação do promotor STIG1 e da região codificadora iaaM

Para a introdução do promotor STIG1 e da região codificadora da proteína iaaM no vetor de destino pK7m34GW, através do sistema Gateway (Invitrogen®), foram desenhados doze oligonucleotídeos denominados: attL4-STIG1LT, attR1-STIG1LT, attL4peqLT, attR1peqLT, attL4, attR1, attL1-iaaMLT, attL3-iaaMLT, attL1peqLT, attL3peqLT, attL1 e attL3, com as respectivas seqüências listadas abaixo.

3.7.1a - Promotor STIG1

A adição de sítios de recombinação ao promotor STIG1 foi dividida em três reações de PCR (Figura 20). A primeira reação de PCR do promotor STIG1 foi realizada a partir do vetor pMG105.2 (Goldman *et al.*, 1994), onde este promotor foi originalmente clonado.

Na reação de PCR1, para adição parcial dos sítios de recombinação attL4/attR1 ao promotor STIG1, utilizou-se o par de oligonucleotídeos: attL4-STIG1LT/attR1-STIG1LT. O oligonucleotídeo attL4-STIG1LT apresenta parte da sequência do sítio attL4 (vermelho) e parte da sequência inicial do promotor STIG1 (branco). O oligonucleotídeo attR1-STIG1LT apresenta parte da sequência attR1 (verde) e parte da região final do promotor STIG1 (branco).

Na reação de PCR2, para a adição de mais uma parte dos sítios de recombinação attL4/attR1 ao promotor STIG1, utilizou-se o par de oligonucleotídeos: attL4peqLT/attR1peqLT. O oligonucleotídeo attL4peqLT apresenta a porção intermediária e final do sítio de recombinação attL4 (vermelho). O oligonucleotídeo attR1peqLT apresenta a porção inicial e intermediária do sítio de recombinação attR1 (verde).

Figura 20: Esquema mostrando a estratégia de inserção de sítios de recombinação *att* por PCR. Amplificação do promotor STIG1, através de três reações de PCR (PCR1, PCR2 e PCR3), para adição de sítios de recombinação *attL4* e *attR1* nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

Na reação de PCR3, para a adição completa dos sítios de recombinação attL4/attR1 ao promotor STIG1, utilizou-se o par de oligonucleotídeos: attL4/attR1. O oligonucleotídeo attL4 apresenta o sítio de recombinação attL4 completo (vermelho). O oligonucleotídeo attR1 apresenta o sítio de recombinação attR1 completo (verde).

Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR1 do promotor STIG1:

attL4-STIG1LT:

5´ CAACTTTGTATAGAAAAGTTGGAATTCGACCTCGCCCCC 3´

attR1-STIG1LT:

5´ AACTTTTTTGTACAACTTGAATTTGATACTGGTGGTTTCTGCTGAG 3´

Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR2 do promotor STIG1:

attL4peqLT:

5´ AATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTATAGAAAAG 3´

attR1peqLT:

5´ TTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAACTTTTTTGTACAAAC 3´

Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR3 do promotor STIG1:

attL4:

5´
AAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTTATAATGC
CAACTTTGTATAGAAAAG 3´

attR1:

5´
CATAGTGAATGCATATGTTGTGTTTTACAGTATTATGTAAGTCTGTTTTTATGCAAAATCTAATTTAATATATTG
ATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAACTTTTTTGTACAAAC 3´

A primeira reação de PCR do promotor STIG1 foi realizada segundo o protocolo:

PCR1 – promotor STIG1:

Plasmídeo pMG105.2 (DNA – 10ng)	1,0µL
MgSO ₄ (50mM)	2,0µL
dNTPs (10mM cada)	1,0µL
Oligonucleotídeo attL4-STIG1LT (10 pmoles/µL)	1,0µL
Oligonucleotídeo attR1-STIG1LT (10 pmoles/µL)	1,0µL
Tampão High Fidelity 10x Platinum	5,0µL
Enzima Taq polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen®) 5U/µL	0,2µL
Água Milli-Q (para completar 50µL)	38,8µL

Condições da PCR1 – promotor STIG1:

Desnaturação Inicial (94°C)	2 minutos
Desnaturação (94°C)	30 segundos
Pareamento (48°C)	30 segundos
Extensão (68°C)	5 minutos
Número de ciclos	35 ciclos
Extensão após os ciclos (68°C)	10 minutos

A segunda reação de PCR do promotor STIG1 foi realizada da seguinte forma:

PCR2 – promotor STIG1:

Produto PCR1 - promotor STIG1	1,0µL
MgSO ₄ (50mM)	2,0µL
dNTPs (10mM cada)	1,0µL
Oligonucleotídeo attL4peqLT (10 pmoles/µL)	1,0µL
Oligonucleotídeo attR1peqLT (10 pmoles/µL)	1,0µL
Tampão High Fidelity 10x Platinum	5,0µL
Enzima Taq polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen®) 5U/µL	0,2µL
Água Milli-Q (para completar 50µL)	38,8µL

Condições da PCR2 - promotor STIG1:

Desnaturação Inicial (94°C)	2 minutos
Desnaturação (94°C)	30 segundos
Pareamento (40°C)	30 segundos
Extensão (68°C)	5 minutos
Número de ciclos	35 ciclos
Extensão após os ciclos (68°C)	10 minutos

A terceira reação de PCR do promotor STIG1 foi realizada da seguinte forma:

PCR3 – promotor STIG1:

Produto PCR2 - promotor STIG1	1,0µL
MgSO ₄ (50mM)	2,0µL
dNTPs (10mM cada)	1,0µL
Oligonucleotídeo attL4 (10 pmoles/µL)	1,0µL
Oligonucleotídeo attR1 (10 pmoles/µL)	1,0µL
Tampão High Fidelity 10x Platinum	5,0µL
Enzima Taq polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen®) 5U/µL	0,2µL
Água Milli-Q (para completar 50µL)	38,8µL

Condições da PCR3 - promotor STIG1:

Desnaturação Inicial (94°C)	2 minutos
Desnaturação (94°C)	30 segundos
Pareamento (55°C)	30 segundos
Extensão (68°C)	5 minutos
Número de ciclos	40 ciclos
Extensão após os ciclos (68°C)	10 minutos

3.7.1b - Região codificadora de iaaM

A adição de sítios de recombinação à região codificadora do gene iaaM foi dividida em três reações de PCR (Figura 21). A primeira reação de PCR do inserto iaaM foi realizada a partir do vetor pBJ36-iaaM (gentilmente cedido pelo Professor Doutor Yunde Zhao, University of California – San Diego, USA), o qual contém a região codificadora do gene iaaM.

Na reação de PCR1, para adição parcial dos sítios de recombinação attL1/attL3 à região codificadora do gene iaaM, utilizou-se o par de oligonucleotídeos: attL1-iaaM1LT/attL3-iaaMLT (Figura 21). O oligonucleotídeo attL1-iaaM1LT apresenta parte da sequência do sítio attL1 (azul) e parte da sequência inicial da região codificadora para a proteína iaaM (cinza). O oligonucleotídeo attL3-iaaMLT apresenta parte da sequência attR1 (rosa) e parte da região final da região codificadora para a proteína iaaM (cinza).

Na reação de PCR2, para a adição de mais uma parte dos sítios de recombinação attL1/attL3 à região codificadora para a proteína iaaM, utilizou-se o par de oligonucleotídeos: attL1peqLT/attL3peqLT. O oligonucleotídeo attL1peqLT apresenta a porção intermediária e final do sítio de recombinação attL1 (azul). O oligonucleotídeo attL3peqLT apresenta a porção inicial e intermediária do sítio de recombinação attL3 (rosa).

Figura 21: Esquema mostrando a estratégia de inserção de sítios de recombinação *att* por PCR. Amplificação da região codificadora do gene *iaaM* através de três reações de PCR (PCR1, PCR2 e PCR3) para adição de sítios de recombinação *attL1* e *attL3* nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

Na reação de PCR3, para a adição completa dos sítios de recombinação attL1/attL3 à região codificadora para a proteína iaaM, utilizou-se o par de oligonucleotídeos: attL1/attL3. O oligonucleotídeo attL1 apresenta o sítio de recombinação attL1 completo (azul). O oligonucleotídeo attL3 apresenta o sítio de recombinação attL3 completo (rosa).

Oligonucleotídeo utilizado na reação de PCR1 de iaaM:

attL1-iaaMLT:

5' TTGTACAAAAAGCAGACCATGTCAGCTTCACCTCTCC 3'

attL3-iaaMLT:

5´ CAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTAGAAATTTCTAGTGCGGTAGTTA 3´

Oligonucleotídeo utilizado na reação de PCR2 de iaaM:**attL1peqLT:**

5´ TTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCA 3´

attL3peqLT:

5´ TGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTATAATAAAGTT 3´

Oligonucleotídeo utilizado na reação de PCR3 de iaaM:**attL1:**

5´

AAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACACATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGC
CAACCTTTGTACAAAAAAGCA 3´

attL3:

5´

AAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTTATAATGC
CAACCTTTGTATAATAAAGTT 3´

A primeira reação de PCR da região codificadora para a proteína iaaM foi realizada da seguinte forma:

PCR1 – iaaM:

Plasmídeo pBJ36/iaaM (DNA – 10ng)	1,0µL
MgSO ₄ (50mM)	2,0µL
dNTPs (10mM cada)	1,0µL
Oligonucleotídeo attL1-iaaMLT (10 pmoles/µL)	1,0µL
Oligonucleotídeo attL3-iaaMLT (10 pmoles/µL)	1,0µL
Tampão High Fidelity 10x Platinum	5,0µL
Enzima Taq polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen) 5U/µL	0,2µL
Água Milli-Q (para completar 50µL)	38,8µL

Condições da PCR1 – iaaM:

Desnaturação Inicial (94°C)	2 minutos
Desnaturação (94°C)	30 segundos
Pareamento (48°C)	30 segundos
Extensão (68°C)	5 minutos

Número de ciclos	35 ciclos
Extensão após os ciclos (68°C)	10 minutos

A segunda reação de PCR da região codificadora para a proteína iaaM foi realizada da seguinte forma:

PCR2 – iaaM:

Produto PCR1 – iaaM	1,0μL
MgSO ₄ (50mM)	2,0μL
dNTPs (10mM cada)	1,0μL
Oligonucleotídeo attL1peqLT (10 pmoles/μL)	1,0μL
Oligonucleotídeo attL3peqLT (10 pmoles/μL)	1,0μL
Tampão High Fidelity 10x Platinum	5,0μL
Enzima Taq polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen) 5U/μL	0,2μL
Água Milli-Q (para completar 50μL)	38,8μL

Condições da PCR2 - iaaM:

Desnaturação Inicial (94°C)	2 minutos
Desnaturação (94°C)	30 segundos
Pareamento (40°C)	30 segundos
Extensão (68°C)	5 minutos
Número de ciclos	35 ciclos
Extensão após os ciclos (68°C)	10 minutos

A terceira reação de PCR da região codificadora para a proteína iaaM foi realizada da seguinte forma:

PCR3 – iaaM:

Produto PCR2 – iaaM	1,0μL
MgSO ₄ (50mM)	2,0μL
dNTPs (10mM cada)	1,0μL
Oligonucleotídeo attL1 (10 pmoles/μL)	1,0μL
Oligonucleotídeo attL3 (10 pmoles/μL)	1,0μL
Tampão High Fidelity 10x Platinum	5,0μL
Enzima Taq polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen) 5U/μL	0,2μL
Água Milli-Q (para completar 50μL)	38,8μL

Condições da PCR3 - iaaM:

Desnaturação Inicial (94°C)	2 minutos
Desnaturação (94°C)	30 segundos
Pareamento (55°C)	30 segundos
Extensão (68°C)	5 minutos
Número de ciclos	35 ciclos
Extensão após os ciclos (68°C)	10 minutos

3.7.2 – Reação LR para construção do cassete STIG1_{prom}::iaaM

A transferência dos insertos attL4-STIG1-attR1 e attL1-iaaM-attL3, obtidos por PCR, para o vetor de destino pK7m34GW, foi realizada via reação de recombinação LR (Sistema Gateway, Invitrogen®) segundo o protocolo:

1μL	attL4-STIG1-attR1 (50ng/μL)
1μL	attL1-iaaM-attL3 (50ng/μL)
1,0μL	pK7m34GW (150ng/μL)
2,0μL	mistura de enzima LR clonase II (Invitrogen®)
5,0μL	tampão TE (para completar 8μL)

A reação LR foi incubada à temperatura ambiente por 16 horas e, em seguida, foram adicionados 2,0μL de solução de proteinase K (2μg/μL), com incubação por 10 minutos a 37°C.

3.8 - Transformação bacteriana**3.8.1 - Preparação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli***

Estriou-se, com uma alça de platina, uma suspensão bacteriana de *E. coli*, cepa DH10B, em uma placa contendo meio LB. A placa foi incubada durante 16 horas, a 37°C. Transferiu-se uma colônia para 5mL de meio LB líquido e incubou-se durante 16 horas, a 37°C, sob agitação de 300rpm. Transferiu-se 1mL da suspensão bacteriana para 500mL de meio LB, deixou-se a 37°C, sob agitação de 300rpm até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal (A_{600} entre 0,5 e

0,8). Colocou-se a cultura no gelo durante 15 minutos. Centrifugou-se a 6.000rpm durante 15 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 500mL de água estéril a 4°C. Centrifugou-se novamente a 6.000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 250mL de água estéril a 4°C. Centrifugou-se mais uma vez a 6.000rpm durante 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e, desta vez, as células foram ressuspensas delicadamente em 10mL de glicerol 10% estéril a 4°C. Centrifugou-se a 6.000rpm durante 15 minutos, a 4°C. Nesta última etapa, as células foram ressuspensas em um volume final de 2mL de glicerol 10% estéril a 4°C. Foram feitas alíquotas de 40 µL, as quais foram estocadas a -80°C.

3.8.2 - Eletroporação de *Escherichia coli*

Adicionou-se um volume adequado da reação de ligação (ou recombinação) a 40µL de células competentes de *E. coli*, misturou-se delicadamente e deixou-se no gelo por 1 minuto. Colocou-se a mistura em uma cubeta de eletroporação previamente resfriada no gelo. Submeteu-se o conjunto a um pulso de 1,8kV/25µF (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Adicionou-se, imediatamente após a eletroporação, 500µL de meio LB líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células. Transferiu-se o conjunto para um tubo de ensaio, incubando-se durante 1 hora a 37°C, sob agitação de 200rpm. Plaqueou-se 250µL em placa de Petri com meio LB sólido, contendo os antibióticos apropriados, e deixou-se a 37°C durante 16-20 horas.

3.8.3 - Preparo de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Estriou-se, com uma alça de platina, uma suspensão bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens*, cepa C58C1RifR (pGV2260), em uma placa contendo meio MAS sólido (200 mL meio 5x A; 10mL sacarose 20%; 2mL MgSO₄ 20%; 0,5 mL tiamina 10mg/mL; agar 12 g/L. Composição do Meio 5x A = 69 g/L K₂ HPO₄.3H₂O; 22,5 g/L K₂H₂PO₄; 5 g/L (NH₄)₂SO₄; 2,5

g/L citrato de sódio). Incubou-se a 28°C durante 72 horas. Transferiu-se uma colônia para 50mL de meio LB, incubando-se a 28°C por 16 horas, sob agitação de 150 rpm. Dividiu-se o volume em 20 tubos Eppendorf de 1,5mL. Centrifugou-se a 12.000rpm, por 1 minuto. Ressuspendeu-se delicadamente as células em 0,5mL de HEPES 1mM, mantido a 4°C. Centrifugou-se a 12.000rpm, por 1 minuto. Repetiu-se esta última etapa por duas vezes. Ressuspendeu-se delicadamente as células em 0,5mL de glicerol 10%, mantido a 4°C. Centrifugou-se por 1 minuto, a 12.000rpm. Ressuspendeu-se delicadamente as células em 20μL de glicerol 10% e juntou-se o conteúdo de dois tubos em um, totalizando 40μL. As alíquotas foram estocadas a -80°C.

3.8.4 - Eletroporação de *Agrobacterium tumefaciens*

Adicionou-se 1μg de DNA plasmidial a 40μL do estoque de células competentes de *A. tumefaciens*, misturou-se delicadamente e incubou-se no gelo por 2 minutos. Transferiu-se a suspensão para uma cubeta de eletroporação, a qual foi mantida no gelo. Posicionou-se a cubeta no eletroporador e aplicou-se um pulso de 1,8kV/2,5μF. Adicionou-se, imediatamente após a eletroporação, 1mL de meio LB 2X líquido e ressuspendeu-se delicadamente as células. Transferiu-se o conjunto para um tubo de ensaio, incubando-se durante 4 horas a 28°C, sob agitação de 150rpm. Plaqueou-se 100μL da suspensão bacteriana em meio LB sólido, contendo os antibióticos apropriados. Incubou-se a 28 °C durante 48 horas.

3.9 - Seqüenciamento de DNA

3.9.1 - Preparo de DNA para seqüenciamento

Inicialmente, 1 mL de meio “Circle Grow” (“Circle Grow” Bio101 40g/L), contendo espectinomicina (60μg/mL) e estreptomicina (12,5μg/mL), foi colocado em cada poço da placa de 96 poços. Uma alíquota de 2μL de um estoque em glicerol do clone de interesse foi inoculada

por poço e a placa foi selada na parte superior com um adesivo. Em seguida, o adesivo foi furado com uma agulha, em cada poço correspondente, para permitir a aeração durante o crescimento das bactérias. As bactérias foram cultivadas por 22 horas a 37 °C, com agitação de 350rpm. Após centrifugação a 4.000rpm (rotor móvel, Centrífuga Eppendorf 5810R) por 6 minutos, foi obtido um precipitado de células. Este precipitado foi ressuspensionado em 240µL de solução GTE (glicose 20%; Tris-HCl 25mM; EDTA 10mM) e novamente centrifugado a 4000rpm (rotor móvel, Centrífuga Eppendorf 5810R) por 6 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 80µL de solução GTE e 5µL de RNase (10mg/mL) foram adicionados. Em seguida, 60µL da ressuspensão foram transferidos para um poço de uma placa receptora de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 60µL de solução de lise NaOH/SDS (NaOH 200mM; SDS 1%) e a placa receptora foi selada com um adesivo. Após inversão da placa por 10 vezes, a mesma foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. A placa foi, em seguida, centrifugada a 3000rpm (rotor móvel, Centrífuga Eppendorf 5810R). Em cada amostra foram adicionados 60µL de acetato de potássio 3M gelado e a placa selada foi invertida por 10 vezes. Após incubação por 10 minutos, a placa foi colocada a 90°C por 30 minutos e, em seguida, resfriada no gelo por 10 minutos. Após centrifugação por 4 minutos a 4.000rpm (rotor móvel, Centrífuga Eppendorf 5810R), a 20 °C, o sobrenadante foi transferido para um poço da placa de filtro Millipore-MAGV N22, a qual foi centrifugada a 4.000rpm (rotor móvel, Centrífuga Eppendorf 5810R) por 4 minutos a 20°C. Ao sobrenadante filtrado, foram adicionados 110µL de isopropanol e, em seguida, misturado por inversão. Após centrifugação por 45 minutos a 4.000rpm (rotor móvel, Centrífuga 5810R) a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200µL de etanol 70 % gelado. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 4.000rpm (rotor móvel, Centrífuga Eppendorf 5810R) a 20°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras secadas à temperatura ambiente por 60 minutos. O precipitado de DNA foi ressuspensionado em 40µL de água Milli-Q autoclavada.

As amostras a serem sequenciadas foram submetidas a reações de PCR em presença de um oligonucleotídeo apropriado, ddNTPs (dideoxinucleotídeos ou nucleotídeos terminadores) fluorescentes, conforme o método de seqüenciamento desenvolvido por Sanger *et al.* (1977), dNTPs e Taq DNA-Polimerase. As amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems). Os plasmídeos (200 - 500ng), contendo os insertos de interesse, foram submetidos a reações de PCR, em microplaca de 96 poços, de acordo com a reação a seguir:

200 - 500ng	DNA plasmidial
1µL	Oligonucleotídeo adequado (5 pmoles/µL)
1µL	<i>Big Dye</i> (Applied Biosystems®)
3µL	Tampão de diluição (Tris-HCl 200mM, pH 9,0; MgCl 5mM)

O volume final de 10µL foi completado com água Milli-Q estéril. A microplaca foi então selada, levada ao vortex por 1 minuto e centrifugada rapidamente a 1.000rpm. O programa de PCR utilizado foi:

Desnaturação – 96°C	2 minutos (passo inicial)
Desnaturação – 96°C	45 segundos;
Pareamento – 50°C	30 segundos;
Extensão – 60°C	4 minutos.
Número total de ciclos:	35 ciclos

3.9.2 - Purificação e precipitação da reação de seqüenciamento

Nesta etapa, as amostras, obtidas na PCR, foram precipitadas e limpas dos dideoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA. Estes dideoxinucleotídeos livres interferem com a leitura das bases durante o seqüenciamento. A precipitação, para a reação de seqüenciamento do DNA, ocorreu da seguinte maneira:

Acrescentou-se 80µL de isopropanol 75%, diluído na hora. A placa foi levada ao vortex e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos exatos e, depois, centrifugada a 4.000rpm por

35 minutos à temperatura ambiente. A microplaca foi vertida e centrifugada a 1.000rpm, em temperatura ambiente por 1 minuto, com a microplaca invertida em papel absorvente. Por duas vezes, foi adicionado 200µL de etanol 70 %, preparado no momento do uso e, em seguida, centrifugou-se a 3.000rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Por último, a microplaca foi centrifugada até 1.000rpm e, posteriormente, invertida em papel absorvente, onde ficou secando por 1 hora à temperatura ambiente.

Após a precipitação das reações de PCR, cada amostra foi ressuspensa em 10µL de formamida Hi-Di, levada ao vortex por 1 minuto, centrifugada e desnaturada, colocando-se as amostras a 95°C por 5 minutos. As placas foram colocadas no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), que contém 16 capilares preenchidos por poliacrilamida. A corrida eletroforética nos capilares foi realizada em aproximadamente 2 horas e meia para cada amostra (16 amostras simultaneamente). O seqüenciador reconhece as bases por meio de diferentes fluorescências. A leitura das bases foi analisada por um programa de computador, o ABI 3100 Data Collection.

Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento:

attL4-STIG1-LT: (seqüência já mencionada)

attL3-iaaMLT: (seqüência já mencionada)

iaaM-RW: 5`TGCTACCTTTCCACCAGCTGAGAT 3`

3.10 - Comparação entre duas seqüências nucleotídicas

Para se comparar as bases nucleotídicas de duas ou mais seqüências, foram utilizados os as ferramentas online: Blast (encontrado em www.ncbi.nih.gov/Blast); e ClustalW (encontrada em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Estes programas, que permitem fazer o alinhamento de seqüências nucleotídicas, foram utilizados tanto para a confirmação da seqüência correta do vetor de expressão obtido neste projeto: pEXPSTIG1_{prom}::iaaM, quanto para se analisar as seqüências das ESTs de interesse, presentes nos bancos de dados, a fim de se

confirmar a identidade destas seqüências com as seqüências de genes de interesse descritos em *A. thaliana*, para estudo de expressão gênica por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR).

3.11 - Transformação de plantas

3.11.1 - Obtenção de plantas de *Nicotiana tabacum* em condições estéreis

Sementes de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR-1, cedidas pelo *Botanical Garden* - University of Nijmegen (Holanda), foram imersas em 1 mL de etanol 70% por 1 minuto e, depois, transferidas para um tubo Eppendorf com 700 µL de hipoclorito de sódio (4-6%, Sigma), onde ficaram por exatos 40 minutos sob agitação. As sementes foram lavadas por 5 vezes com água destilada autoclavada e, posteriormente, distribuídas em placas contendo meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962). As placas foram colocadas em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28°C) até a germinação em incubadora 437 CDG (FANEM). Posteriormente, as plântulas foram transferidas para caixas Magenta, com o mesmo meio de cultura, em condições estéreis.

3.11.2 - Obtenção dos segmentos foliares

Para obtenção das plantas transgênicas, foram utilizados segmentos foliares obtidos a partir de folhas de plantas com aproximadamente seis semanas de idade, crescidas em condições estéreis, como descrito acima. Uma folha foi cortada com bisturi sobre um papel de filtro estéril, embebido em água, produzindo os segmentos foliares livres da nervura central e das bordas do limbo (Figura 22).

Figura 22: Todo o perímetro da folha foi ferido (no próprio processo de corte), para haver a liberação de moléculas-sinal (acetoseringona), que induzem a transferência do T-DNA, presente no *Agrobacterium*, para o genoma vegetal. Os cortes foram realizados como mostrado acima, gerando os segmentos foliares.

3.11.3 - Infecção dos segmentos foliares

Pelo método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, os segmentos foliares cortados foram imediatamente transferidos para placas de Petri, com a sua face abaxial em contato direto com o seguinte meio:

20mL	MS líquido
0,75mL	Suspensão bacteriana (<i>Agrobacterium</i> contendo a construção de interesse)

As placas foram seladas com Parafilm®. Após incubação a 28°C por dois dias, na ausência de luz, os segmentos foliares foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de indução de calos M300 (meio MS sólido contendo 200µg/mL de canamicina, 0,1µg/mL de NAA, 1µg/mL de BAP e 250µg/mL de cefotaxima), e mantidos em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28°C). NAA e BAP são, respectivamente, substâncias químicas, respectivamente, análogas à auxina e citocinina. A cefotaxima é um antibiótico inerte para células vegetais, porém importante para a inibição do crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* na cultura de tecidos vegetais *in vitro* em meio MS.

3.11.4 - Obtenção de brotos transgênicos

Os pequenos calos formados foram, então, separados dos segmentos foliares e distribuídos sobre uma placa contendo o meio de indução de calos (M300) e deixados por aproximadamente 15 dias, em condições adequadas de luminosidade (16 horas luz / 8 horas escuro) e temperatura (28 °C). Após esse período, os calos foram transferidos para placas contendo meio de indução da parte aérea (meio MS-250 - MS sólido contendo 200µg/mL de canamicina e 1µg/mL de BAP). Após a identificação dos brotos (maiores que 0,7cm), que foram surgindo a partir dos calos resistentes, eles foram excisados na base, procurando excluir tecidos do calo. Os brotos foram transferidos individualmente para potes Magenta, contendo meio de enraizamento sólido (meio MS), acrescido de canamicina (200µg/mL). Os brotos foram mantidos nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes. Após enraizamento, as plantas transgênicas foram transferidas para vaso com substrato para plantas (Bioplant®) e vermiculita e levadas para a casa de vegetação.

3.12 - Quantificações de Ácido Indol-3-Acético (AIA)

3.12.1 – Tentativas de quantificação de Ácido Indol-3-Acético (AIA) no Brasil

Tentou-se quantificar auxina (ácido indol-3-acético - AIA) a partir de estigmas e estiletes de plantas *N. tabacum* selvagem (nos estádios 3, 7 e 10 do desenvolvimento floral), por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), utilizando o seguinte protocolo:

Pesou-se 33, 66 ou 100mg de material vegetal, pulverizado em nitrogênio líquido, diretamente em um tubo plástico de 2mL contendo 500µL de mistura de extração composta por isopropanol:ácido acético (95:5). Adicionou-se 1µg do padrão marcado (Ácido Indol-3-acético marcado com carbono 13). Agitou-se em vórtex por cerca de 1 min e manteve-se sob agitação branda a 4°C por cerca de 2 horas. As amostras foram, então, agitadas brevemente em vórtex. Centrifugou-se por 10 minutos a 14.000g a 4°C. Coletou-se o sobrenadante com micropipeta e

transferiu-se para um novo microtubo. As amostras foram secas em fluxo de N₂, até restar apenas cerca de 20-50 µL em cada microtubo.

Adicionou-se 500µL de acetato de etila na amostra, agitou-se em vórtex por cerca de 1 minuto e centrifugou-se por 5 min. a 14.000 g a 4°C. Foi verificado se houve a separação das fases e coletou-se apenas a fase superior com uma micropipeta, evitando contaminá-la com a fase inferior. Acrescentou-se novamente 500µL de acetato de etila à fase inferior, que restou no microtubo, agitou-se em vórtex por cerca de 1 minuto. Centrifugou-se por 5 min. a 14.000g a 4°C e verificou-se a separação das fases. Coletou-se, então, apenas a fase superior. As frações coletadas foram secadas completamente, utilizando fluxo de N₂. Ressuspendeu-se cada amostra em 100 µL de metanol e transferiu-se para o frasco utilizado para a GC-MS. Adicionou-se 50µL de trimetilsilil-diazometano e fechou-se o frasco imediatamente (isto é importante, pois o diazometano é muito volátil e se perde rapidamente se o frasco não for fechado logo após a adição na amostra). Manteve-se a amostra à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos. Toda a reação de metilação ocorreu no próprio o frasco utilizado para a GC-MS, que fora utilizado para injetar a amostra no cromatógrafo. Realizou-se todo esse procedimento em capela de exaustão, pois o trimetilsilil-diazometano é tóxico. As amostras metiladas foram secas utilizando-se fluxo de N₂. Ressuspendeu-se a amostra em 20µL de acetato de etila e fechou-se o frasco utilizado para a GC-MS. As amostras foram, então, levadas para quantificação em GC-MS.

Estes experimentos foram realizados no laboratório do Professor Dr. Eduardo Purgatto (Departamento de Alimentos, FCF-USP), com o gentil auxílio de sua aluna de Mestrado Mariana Faulin Foresto (Departamento de Alimentos, FCF-USP).

3.12.2 – Quantificações de Ácido Indol-3-Acético (AIA) no Japão

Devido ao insucesso nas tentativas de quantificação de auxina livre nos estigmas e estiletes de *N. tabacum* no Brasil, foi estabelecida uma colaboração com os professores Yunde

Zhao (University of California, San Diego – EUA) e Hiroyuki Kasahara (Plant Science Center, Riken – Japão) a fim de se realizar tais quantificações. O material foi enviado ao laboratório do professor Hiroyuki Kasahara no Japão, onde o professor Yunde Zhao realizou as quantificações de auxina por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS), segundo o protocolo descrito em Mashiguchi *et al.* (2011).

Para medições das quantidades da forma ativa do fito-hormônio auxina (ácido indol-3-acético) em estigmas/estiletos e ovários de plantas transgênicas e comparar tais quantidades com aquelas observadas em estigmas/estiletos e ovários de plantas selvagens (cultivar SR1, controle), realizaram-se coletas de estigmas e estiletos e de ovários de: 1 planta transgênica (Transgênico 4) e de 1 planta selvagem (como descrito na Figura 23), para 3 diferentes estádios do desenvolvimento (estádio 3, 7 e 10, como descrito por Koltunow, 1990). As coletas foram realizadas na casa de vegetação e, após separação das partes do pistilo (estigma/estilete e ovário), o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

As amostras foram separadas em 12 tubos falcon e etiquetadas de acordo com a quantidade de material vegetal, estágio do desenvolvimento e fonte do material (planta selvagem ou transgênica), conforme a descrição seguinte:

1 - ovário, estágio do desenvolvimento 3, selvagem (SR1)	(438,5mg de peso fresco)
2 - ovário, estágio do desenvolvimento 7, selvagem (SR1)	(198,5mg de peso fresco)
3 - ovário, estágio do desenvolvimento 10, selvagem (SR1)	(170,9mg de peso fresco)
4 - stigma/estilete estágio do desenvolvimento 3, selvagem (SR1)	(138,8mg de peso fresco)
5 - stigma/estilete estágio do desenvolvimento 7, selvagem (SR1)	(55,4mg de peso fresco)
6 - stigma/estádio do desenvolvimento 10, selvagem (SR1)	(98,4mg de peso fresco)
7 - ovário, estágio do desenvolvimento 3, transgênica STIG1::iaaM	(138,8mg de peso fresco)
8 - ovário, estágio do desenvolvimento 7, transgênica STIG1::iaaM	(304mg de peso fresco)
9 - ovário, estágio do desenvolvimento 10, transgênica STIG1::iaaM	(128mg de peso fresco)
10 - stigma/estilete, estágio do desenvolvimento 3, transgênica STIG1::iaaM	(79mg de peso fresco)
11 - stigma/estilete, estágio do desenvolvimento 7, transgênica STIG1::iaaM	(128,7mg de peso fresco)
12 - stigma/estilete, estágio do desenvolvimento 3, transgênica STIG1::iaaM	(84,2mg de peso fresco)

As 12 amostras acima foram liofilizadas e enviadas para medições das quantidades de auxina neste material.

3.13 – RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

3.13.1 - Coleta de Material Vegetal

Para as análises de expressão gênica por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) ou em tempo real, foram coletados pistilos de botões florais nos estádios 3, 7 e 10 do desenvolvimento (estádios descritos por Koltunow *et al*, 1990), provenientes de 3 plantas transgênicas independentes e de 1 planta controle (SR1).

As coletas foram feitas na parte da tarde, por volta das 16 horas, a fim de se evitar qualquer influência do ciclo circadiano, uma vez que variações naturais no transcriptoma de plantas ocorrem ao longo do dia (McClung, 2004). Após coletadas, as flores foram dissecadas, sendo as pétalas, sépalas e estames descartados.

Os pistilos foram divididos em duas partes: 1) estigma e estilete e 2) ovário, segundo figura abaixo:

Figura 23: O material vegetal (pistilo) foi coletado separadamente em duas partes, uma superior: estigma e estilete (1); e uma inferior: ovário (2). O ginóforo foi descartado.

Os estigmas e estiletes e os ovários foram, então, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

3.13.2 - Extração de RNA

Para as extrações de RNA, congelou-se previamente um cadinho e um pistilo - ambos de porcelana - com nitrogênio líquido. Realizou-se a maceração e pulverização dos tecidos

vegetais no cadinho e, imediatamente, transferiu-se o pó resultante da maceração para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL, previamente congelado em nitrogênio líquido. Adicionou-se 1mL de Trizol Reagent (Invitrogen®) para cada 100mg de material vegetal. Homogenizou-se o material pulverizado em vortex por 40 segundos e incubou-se o homogenizado por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2mL de clorofórmio (Merck®) para cada 1mL de Trizol Reagent. Agitou-se o tubo vigorosamente com as mãos, por 15 segundos, e incubou-se o tubo por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra por 15 minutos a 4°C e 12.000g. Transferiu-se a fase aquosa superior, resultante da centrifugação, para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Adicionou-se 0,5mL de isopropanol 100% (Merck®) previamente resfriado (-20°C). Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se por 10 minutos a 4°C e 12.000g. Lavou-se o *pellet* de RNA com 1mL de etanol (Merck®) 75% (preparado com água milliQ-autoclavada tratada com DEPC, em tubos livres de RNase) previamente gelado (-20°C). Misturou-se as amostras brevemente em vortex, até o *pellet* de RNA se desprender do fundo do tubo. Centrifugou-se por 5 minutos a 4°C e 7500g. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o *pellet* secar a temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA total extraído foi ressuspenso em 50µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e estocado a -20°C.

3.13.3 - Checagem da quantidade e qualidade de RNA

A qualidade e a quantidade de RNA de cada extração foram verificadas utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific®), gentilmente concedido pelo prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, FCFRP-USP. Foi considerado RNA de boa qualidade quando a relação das medidas de absorbância nos comprimentos de luz a 260nm/280nm e a 260nm/230nm se mostrou maior ou igual a 2,0, o que indica alto grau de pureza em relação a contaminantes protéicos e fenólicos, respectivamente.

Para se checar a integridade das moléculas de RNA extraídas, foi feito um gel de agarose 1,2%. Para isso adicionou-se 1,8g de agarose (Sigma®) a 147mL de tampão TBE 1x. Adicionou-se 3mL de isotiocianato de guanidina (1M), sendo ambos, TBE e isotiocianato de guanidina, preparados com água miliQ-autoclavada, tratada com DEPC.

3.13.4 - Preparação de RNA livre de DNA

Para a obtenção de RNA livre de DNA, tratou-se o RNA extraído com DNase - DNaseI, RNase-Free (#EN0521 Fermentas®). Em um tubo de 200µL de microcentrífuga, adicionou-se 1µg de RNA total extraído, 1µL de tampão 10x fornecido pelo fabricante e 1µL (1 unidade) de DNaseI, RNasefree. Completou-se o volume para 10µL com água tratada com DEPC e incubou-se a reação a 37°C, por 30 minutos. Adicionou-se 1µL de EDTA (50mM), totalizando-se o volume de 11µL. Incubou-se a 65°C por 10 minutos. Este passo é importante para a desnaturação da DNase. A adição de EDTA é necessária para evitar a hidrólise de moléculas de RNA, o que ocorre a 65°C na ausência de agentes quelantes. Porém maiores concentrações de EDTA devem ser evitadas, pois acarretam a inibição de reações químicas subsequentes. Utilizou-se o RNA obtido, livre de DNA, para síntese de cDNA.

3.13.5 - Síntese de cDNA

A síntese da fita de DNA complementar às moléculas de RNA mensageiro (RNAm) extraídas do material vegetal sob estudo (estigma/estilete) foi feita com o Kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (#K1622, Fermentas®). Imediatamente após a desnaturação da DNase a 65°C, adicionou-se 1µL (500ng) de oligo (dT)₁₈ ao RNA tratado com DNase, totalizando 12µL, e colocou-se imediatamente os tubos em gelo por 2 minutos. Este passo garante uma maior eficiência de pareamento dos oligonucleotídeos com a cauda poli-A dos RNAm. Em seguida, adicionou-se 4µL do tampão de reação 10x, 1µL de inibidor de RNase Ribolock™ (20u/µL), 2µL de mix de dNTP (10mM) e, por fim, 1µL de transcriptase reversa RevertAid™ M-MuLV

(todos os componentes providos pelo Kit supra-citado), totalizando 20µL. Misturou-se a solução e incubou-se os tubos a 42°C por 60 minutos e, em seguida, a 70°C por 5 minutos. Os cDNAs obtidos desta forma foram diluídos na proporção 1:8 e, então, utilizados para PCR quantitativa (qPCR).

3.13.6 - Reação de PCR quantitativa

As reações de PCR quantitativa foram feitas em máquinas 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems®, gentilmente cedidas pelos professores Dra. Zilá Luz Paulino Simões (FFCLRP-USP) e Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP). Os cálculos das quantificações gênicas foram feitos pelo método Delta-Delta-CT (Pfaffl, 2001).

As condições de termociclagem utilizadas para todas as reações foi:

1x	50°C	2 minutos	passo inicial de desnaturação
	95°C	10 minutos	
40x	95°C	15 segundos	ciclos de amplificação
	60°C	1 minuto	
	95°C	15 segundos	
1x	60°C	1 minuto	curva de dissociação
	95°C	15 segundos	
	60°C	15 segundos	

As qPCRs foram realizadas segundo o protocolo abaixo.

Para cada poço da placa de 96 poços, adicionou-se:

5µL SYBR Mix (Go Taq qPCR Master Mix, Promega®)
1µL água MilliQ-autoclavada
1µL Primer1 (5µM)
1µL Primer2 (5µM)
2µL cDNA

As qPCR foram realizadas em microplacas de 96 poços (MicroAmp, Fast 96-Well Reaction Plate 0,1mL - Applied Biosystems®) e seladas com adesivo plástico (MicroAmp Optical Adhesive

Film Kit - Applied Biosystems®). Todas as reações foram realizadas em triplicatas técnicas e utilizou-se como controle endógeno GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

Primers utilizados:

Gene	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverso (5' - 3')
GAPDH	GCATCTTTGATGCCAAGGCTGGAA	TCGAGTGCTGTAGCCCATTTTCGTT
SCI1	TCGTCTGAGACTGCACGCGATTTA	ATATTCCAAGCGTGCGGATGACCGA
SPICE1	TCCATATTGTGGAGGGACAGTGGA	GCGTTTGAACCTCAAGCAAATGGG
ARF2	TGATGACGAGGGTGACATGATGCT	GCAGACTCTTCACTTCTTTGGCTTCTG
ARF3	TGATGACGAGGGTGACATGATGCT	TGTGCTCCGAGACAAGAACAGCTA
PIN1	TTTACTCAATGGTGGCTGGTGGGA	GTGCTGCAGCTCCATGGTTGTAAT
Aux1	CTGGCATGGTGGCTCTGTTTATGA	AGTCCAGCTTCCCATCAACCCATA
Aux/IAA19	GCTGCGAGCTTTAAGCACATTATCC	GGACGAGTGGCCTCTCATATAATC
Aux/IAA13	GCTCACAACCTACCTCTGAAGATCGCA	ACCTCACGGGTAACAAAACCTGGTCA
CycB	ACACCTTACGTATTTCTCGCCCGT	TATTGAGGGTGTGTGTCGAGCAGCAT

Nicotiana tabacum é uma planta tetraplóide. Considera-se que constituição genética desta planta seja proveniente da combinação do genoma de duas espécies diplóides do gênero *Nicotiana*: *Nicotiana silvestris* e *Nicotiana tomentosiformis* (Yukawa *et al.*, 2006). Devido ao fato de a cultivar utilizada neste projeto (Petit Havana SR1) ser uma espécie auto-compatível e mantida por inúmeras gerações por auto-fecundação, espera-se que ambos os conjuntos genômicos apresentem alto grau de homozigose. Portanto, espera-se que um dado gene, que esteja presente somente em uma cópia (um locus) no genoma das espécies progenitoras (*Nicotiana silvestris* e *Nicotiana tomentosiformis*) apresente duas variações em *Nicotiana tabacum*: uma forma homeóloga idêntica àquela presente no genoma de *Nicotiana silvestris* e uma forma homeóloga idêntica àquela presente no genoma de *Nicotiana tomentosiformis*.

Desta forma, os primers desenhados para qPCR neste projeto foram feitos para amplificar, concomitantemente, os cDNAs provenientes dos transcritos referentes às duas formas homeólogas, presentes no genoma de *N. tabacum*. Para esta finalidade, foram utilizadas etiquetas de seqüências expressas (ESTs, *Expressed Sequence Tags*) disponíveis em nossos bancos de dados (ver Quiapim *et al.*, 2009). Tais seqüências foram primeiramente alinhadas com as seqüências do banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), para confirmação de

identidade com os genes ortólogos de *A. thaliana* de nosso interesse. Após confirmação de identidade, as seqüências então foram complementadas com as informações sobre seqüências de *Nicotiana tabacum*, disponíveis em bancos de dados internacionais (p.ex. The Gene Index Project <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), definindo-se assim as melhores regiões de alinhamento de primer para amplificações das duas formas homeólogas transcritas em *N. tabacum*.

Os primers para estas análises foram desenhados de forma que o amplicon apresentasse um comprimento dentro do intervalo de 80-200pb. Para isto, e para investigar a qualidade dos oligonucleotídeos desenhados (formação de *hairpin*, homodímeros e heterodímeros de primer), foram utilizadas as ferramentas online PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) e OligoAnalyser (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

3.13.7 - Preparação de água DEPC

Para as manipulações de RNA tratou-se água milliQ-autoclavada com Dietilpirocarbonato, DEPC (LGC Biotecnologia®). Adicionou-se 0,1% de volume de DEPC para 1 volume de água, ou seja, 800µL de DEPC para 800mL de água. A mistura foi agitada, deixada em tratamento com DEPC *overnight*. No dia seguinte, a mistura foi autoclavada e estocada em temperatura ambiente.

4 - RESULTADOS

4.1 - Obtenção do vetor de expressão STIG1_{prom}::iaaM

A obtenção do vetor de expressão em plantas contendo o promotor STIG1 fusionado à seqüência codificadora da proteína triptofano-2-monoxigenase (iaaM) foi feita baseada no Sistema Gateway de Clonagem (Invitrogen®). Para isso, primeiramente foram realizadas 3 PCRs para cada um dos insertos em questão, a fim de se adicionar sítios específicos de recombinação nas extremidades destes. Tais sítios são necessários para a inserção de fragmentos de interesse

em vetores de expressão em plantas (Karimi *et al*, 2007). Os produtos de PCR (attL4-STIG1-attR1 e attL1-iaaM-attL3) foram utilizados em uma reação de recombinação LR sítio-específica (Sistema Gateway, Invitrogen®) com o vetor de destino pK7m34GW (Karimi *et al*, 2007). O vetor de expressão obtido foi denominado pLTEXPSTIG1_{prom::iaaM}.

4.1.1 - Reações de PCR para adição de sítios de recombinação *att*

As reações de PCR para as inserções dos sítios de recombinação *att* nas extremidades 5' e 3' do promotor STIG1 e da sequência codificadora *iaaM* foram realizadas de acordo com o descrito no item 3.7.1 (Materiais e Métodos).

4.1.1a – Amplificação do promotor STIG1

A primeira reação de PCR do promotor STIG1 foi realizada a partir do vetor pMG105.2 (Goldman *et al*, 1994), onde tal promotor foi originalmente clonado. O produto desta PCR1 foi o inserto STIG1, originalmente de 1573pb, com a adição parcial dos sítios attL4 e attR1 nas extremidades 5' e 3', respectivamente, totalizando um produto de 1614pb (Figura 24A).

A segunda reação de PCR de STIG1 foi realizada utilizando-se como molde o produto da PCR1, descrita acima. Desta forma, foi adicionada uma nova porção dos sítios attL4 e attR1, totalizando um produto de 1657pb (Figura 24B).

A terceira reação de PCR de STIG1 foi realizada utilizando-se o produto da PCR2. Obteve-se desta forma um produto de 1793pb (Figura 24C), contendo a sequência do promotor STIG1 flanqueada pelos sítios completos de recombinação attL4 e attR1.

Figura 24: PCRs para adição dos sítios att de recombinação em STIG1 e em iaaM. PCR1 (A), PCR2 (B) e PCR3 (C) de STIG1 e iaaM, todas apresentando bandas na altura esperada. As PCRs foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão 1X TBE; **M:** Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder – Invitrogen®)

4.1.1b – Amplificação da região codificadora de iaaM

A primeira reação de PCR do inserto iaaM foi realizada a partir do vetor pBJ36-iaaM (gentilmente cedido pelo Professor Doutor Yunde Zhao, University of California – San Diego, USA), o qual contém a região codificadora do gene iaaM. O produto desta PCR1 foi o inserto iaaM, originalmente de 2268pb, com a adição parcial dos sítios attL1 e attL3 nas extremidades 5' e 3', respectivamente, totalizando um produto de 2308pb (Figura 24A).

A segunda reação de PCR de iaaM foi realizada utilizando-se como molde o produto da PCR1, descrita acima. Desta forma, foi adicionada mais uma parte dos sítios attL1 e do sítio attL3, totalizando um produto de 2341pb (Figura 24B).

A terceira reação de PCR do inserto *iaaM* foi realizada utilizando-se como molde o produto da PCR2. Obteve-se desta forma um produto de 2463pb (Figura 24C), contendo a sequência *iaaM* flanqueada pelos sítios de recombinação *attL1* e *attL3* completos.

4.1.2 - Reação de recombinação, clonagem e checagem do vetor de expressão

Realizou-se uma reação LR (Gateway System®, Invitrogen) entre os fragmentos *attL4*-STIG1-*attR1* e *attL1-iaaM-attL3*, obtidos por PCR, e o vetor de destino pK7m34GW. O vetor de expressão em plantas pLTEXPSTIG1_{prom::iaaM}, produto desta reação LR, foi utilizado para transformar células de *E. coli*. Estas células, após crescidas em meio de cultura com os antibióticos adequados, foram submetidas a extração de DNA plasmidial. Com o DNA plasmidial obtido foram realizadas checagens por diferentes enzimas de restrição (PvuII e PstI/BamHI) para verificação da construção de interesse. Uma, dentre um total de 48 colônias analisadas, apresentou o padrão de digestão esperado (Figura 25).

Figura 25: Mini-preparação de DNA de colônia positiva oriunda da reação de recombinação entre os fragmentos *attL4*-STIG1-*attR1* e *attL1-iaaM-attL3*, obtidos por PCR, e o vetor de destino pK7m34GW. Amostra digerida com as enzimas de restrição PvuII e com PstI/BamHI. A digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão 1X TBE. **M:** Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder – Invitrogen).

Em seguida, o DNA plasmidial foi submetido a reações de seqüenciamento, que confirmaram a fusão STIG1_{prom}::iaaM esperada (Figura 26), no vetor de expressão em plantas.

Figura 26: Esquema da construção pLTEXPSTIG1_{prom}::iaaM mostrando sítio de pareamento dos três *primers* utilizados para seqüenciamento.

4.2 - Obtenção de plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM

4.2.1 – Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com a construção pLTEXPSTIG1_{prom}::iaaM

A construção obtida foi utilizada para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* competentes e plaqueadas em meio LB sólido contendo os antibióticos adequados para seleção da construção de interesse, neste caso estreptomicina (300µg/ml) e espectinomicina (60µg/ml). As placas de Petri foram incubadas a 28°C por 48 horas, até o crescimento de colônias isoladas.

4.2.2 – Checagem da presença da construção em *Agrobacterium tumefaciens*

Após obtenção de transformantes de *A. tumefaciens* em meio seletivo, colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido com os antibióticos adequados e, então, foram submetidas a agitação a 28°C por 48 horas.

Para checar a presença da construção de interesse nas colônias de *A. tumefaciens*, após 24 horas de crescimento sob agitação, retirou-se uma alíquota da cultura e realizou-se uma reação de PCR (Figura 27). Confirmou-se, desta forma, a presença da construção pLTSTIG1_{prom}::iaaM em todas as 9 colônias testadas (Figura 28).

Figura 27: Esquema da construção pLTEXPSTIG1_{prom}::iaaM mostrando sítios de pareamento dos *primers* para a PCR de checagem da presença do vetor em *A. tumefaciens*

Figura 28: PCR de 9 colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com o vetor pLTEXPSTIG1_{prom}::iaaM. *Primers* usados: attL1-iaaMLT e iaaM-RW. As PCRs foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão 1X TBE; **ct -** : controle negativo; **M**: Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder – Invitrogen)

4.2.3 Transferência do T-DNA de *A. tumefaciens* para *N. tabacum*

Uma das colônias de *A. tumefaciens* contendo a construção de interesse foi escolhida para a transformação de discos foliares de *N. tabacum*.

4.2.4 Regeneração de plantas transformadas

Discos foliares de *N. tabacum* (Figura 22) foram utilizados para transformação via *Agrobacterium tumefaciens* com a construção de interesse. Após cultura de tecido (Figura 29A, 29B, 29C e 29D), plantas transgênicas estáveis foram regeneradas. No total, 22 plantas transgênicas independentes foram obtidas.

Quando as plantas transgênicas estáveis atingiram em torno de 15cm de altura e bom enraizamento *in vitro*, estas foram transferidas para um saquinho com terra (Figura 29E) e, posteriormente, para o vaso definitivo (Figura 29F).

Figura 29: (A) Segmentos foliares de *N. tabacum*, após transformação via *Agrobacterium*, em meio sólido (contendo canamicina) para indução de calos. (B) Calos de *N. tabacum* presentes em meio M300. (C) Calos na presença de meio de indução de parte aérea M250. (D) Planta de *N. tabacum* em meio de indução de raiz MS-Can. (E) Aclimação das plantas transgênicas recém transferidas para o solo. (F) Planta transgênica no vaso definitivo.

O bom enraizamento em meio MS-Canamicina é um indicativo indireto da presença do transgene nas plantas, uma vez que as raízes de plantas selvagens são muito sensíveis a este antibiótico e normalmente não apresentam enraizamento neste meio. De qualquer forma, reações de PCR de DNA genômico foram realizadas para certificação da presença do transgene nestas plantas (Figura 30).

Figura 30: Confirmação da presença do transgene nas plantas $STIG1_{prom}::iaaM$ por PCR. Foram realizadas PCRs a partir de DNA genômico das plantas, transformantes independentes, com fenótipo mais evidente: 1, 2, 4, 7, 8, 11 e 17. Todas as plantas foram positivas, ou seja, apresentaram a presença do transgene em seu genoma. Os *primers* usados foram attL1-iaaMLT e iaaM-RW (ver Figura 12). As PCRs foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% preparado com tampão TBE 1x. **M:** Marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder – Invitrogen).

Das 22 plantas transgênicas obtidas, 19 plantas sobreviveram e tiveram seus fenótipos analisados.

4.3 – Análise dos fenótipos das plantas transgênicas $STIG1_{prom}::iaaM$

As 19 plantas transgênicas $STIG1_{prom}::iaaM$ independentes obtidas não apresentaram alterações morfológicas nas estruturas vegetativas (raízes, folhas, caules), nas estruturas reprodutivas estéreis (sépalas e pétalas), nem nas estruturas reprodutivas masculinas (estames), como esperado. Porém, foram observadas nítidas alterações na morfologia dos órgãos reprodutores femininos nestas plantas. Os pistilos das plantas $STIG1_{prom}::iaaM$ se mostraram maiores nos estádios iniciais do desenvolvimento floral (estádio 2 ao estágio 5); de mesmo tamanho no estágio 6 do desenvolvimento; e mais curtos do estágio 7 ao fim do desenvolvimento floral (estádio 12), quando comparadas às plantas selvagens (Figura 31 e Figura 32).

Figura 31: Botões florais e respectivos pistilos (abaixo) de planta selvagem (sempre à esquerda dos pares) e de planta transgênica STIG1_{prom}::iaaM 4, nos estádios de 2 ao 12 do desenvolvimento floral. Não se observam diferenças no cálice e na corola de plantas STIG1_{prom}::iaaM se comparadas com as selvagens. Porém, observa-se que pistilos STIG1_{prom}::iaaM são mais compridos que pistilos selvagens nos estádios iniciais do desenvolvimento, de 2 ao 5. A partir do estágio 7 do desenvolvimento, pistilos STIG1_{prom}::iaaM se apresentam mais curtos que pistilos de plantas selvagens.

Estes fatos foram observados para todas as 19 plantas transgênicas, que puderam ser divididas em três grupos, segundo o grau de alteração fenotípica: fenótipo pronunciado (plantas 1, 2, 4, 7, 8, 11 e 17); fenótipo intermediário (plantas 6, 10, 12, 15, 16, 18); fenótipo brando, ou seja, levemente distinto de plantas selvagens (plantas 13, 14, 19, 20, 21, 22).

Foram feitas medições do comprimento do estilete de pistilos de flores coletadas aleatoriamente de planta selvagem (SR1) e da planta transgênica STIG1_{prom}::iaaM 4 com paquímetro digital. A figura 32 mostra a comparação do tamanho dos estiletos dessas plantas nos estádios 2 ao 12 do desenvolvimento floral (estádios descritos por Koltunow *et al.*, 1990). Diferenças equivalentes foram observadas nas diversas coletas realizadas, para todos os transformantes independentes com fenótipo pronunciado. Porém, devido à necessidade de se congelar imediatamente o material coletado em nitrogênio líquido, a fim de direcioná-lo para outros experimentos (por exemplo, extração de RNA para análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa - qRT-PCR), as medições de tamanho de estiletos não foram feitas em replicatas, para uma análise estatística apropriada. Esta análise estatística será realizada futuramente, a partir

de medições de estiletos de plantas $STIG1_{prom::iaaM}$ das próximas gerações de plantas, provenientes de sementes dos transgênicos primários.

Figura 32: Medições do tamanho do estilete (parte superior do pistilo, ver figura 22) de pistilos de plantas de *N. tabacum* selvagens (SR1) e $STIG1_{prom::iaaM}$ 4, nos estádios 2 ao 12 do desenvolvimento floral (eixo y: milímetros; eixo x: estádios do desenvolvimento floral).

Outra observação interessante foi que os botões florais das plantas transgênicas no estágio 3 e início do estágio 4 do desenvolvimento apresentaram, por diversas vezes, o estigma forçando atipicamente a abertura da corola. Este fato normalmente não ocorre em botões florais de plantas selvagens nesses estádios (Figura 33A). Além disso, por vezes foram observados pistilos das plantas $STIG1_{prom::iaaM}$ ultrapassarem a altura da corola no final do estágio 4 (Figura 33B). Estas observações nos sugeriram uma maior taxa de crescimento nos pistilos das plantas transgênicas $STIG1_{prom::iaaM}$ nos estádios iniciais do desenvolvimento floral, em relação às plantas selvagens.

Figura 33: Botões florais de plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM e selvagem (ct). (A) Foto feita em Estereomicroscópio Leica (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira – Departamento de Biologia - FFCLRP-USP, com o auxílio de seu aluno de Mestrado, Fernando Henrique Farache), barra de escala: 2mm; (B) Botões florais no estágio 4 do desenvolvimento, com 17mm de comprimento. Foto feita com máquina fotográfica digital Sony 4.1 megapixels.

Curiosamente, a partir do estágio 7 do desenvolvimento floral, o pistilo das plantas STIG1_{prom}::iaaM passaram a apresentar estiletes mais curtos que os estiletes de plantas selvagens, sendo que no momento da polinização (antese, estágio 12), observa-se uma grande diferença entre o comprimento do estilete de plantas STIG1_{prom}::iaaM e de plantas controle (Figura 34). Neste estágio, a região de recepção de pólen (região estigmática) das plantas STIG1_{prom}::iaaM se encontra muito abaixo das anteras. Além disso, o estilete de plantas STIG1_{prom}::iaaM (estádio 12) mostrou pronunciado espessamento (Figura 35A) e notou-se uma considerável redução na área da superfície estigmática (Figura 35B), com concomitante redução da secreção de exudato nesta região (Figura 35C).

Figura 34: Flores de plantas transgênicas $STIG1_{prom}::iaaM$ e selvagem (ct) no último estágio do desenvolvimento floral (estádio 12), quando ocorre a antese. Foto feita com máquina fotográfica digital Sony 4.1 megapixel.

Estas alterações nos sugeriram que as plantas $STIG1_{prom}::iaaM$ apresentariam problemas de polinização, tanto auto-polinização quanto polinização cruzada – uma vez que a superfície estigmática, responsável pela captação dos grãos polínicos (Esau, 1977), e o exudato, responsável pela hidratação e nutrição dos grãos polínicos (Bell & Hicks, 1976; Linskens, 1983), se encontram ambos reduzidos nas plantas transgênicas.

Figura 35: Diferenças entre estilete e estigma de pistilos $STIG1_{prom}::iaaM$ e selvagens (controle - ct) no estágio 12 do desenvolvimento. (A) Estilete de planta $STIG1_{prom}::iaaM$ mais espesso que estilete de planta controle; (B) Região estigmática de planta $STIG1_{prom}::iaaM$ com área reduzida em relação à região estigmática de planta controle. (C) Menor secreção de exudato em plantas $STIG1_{prom}::iaaM$. Barra de escala = 2mm (A) e 3 mm (B) e (C).

De fato, plantas $STIG1_{prom}::iaaM$ apresentaram dificuldade em formar frutos por auto-polinização natural. Observou-se que, enquanto plantas selvagens (controle), de mesma idade,

formaram frutos sem problemas e iniciaram o processo de senescência, parando de produzir flores (Figura 36, controle), plantas STIG1_{prom}::iaaM continuaram dando flores incessantemente, formando frutos com raríssimas exceções (Figura 36, STIG1-iaaM).

Figura 36: Planta selvagem (controle) e transgênica STIG1_{prom}::iaaM número 4 de mesma idade. Nota-se a ausência de frutos em plantas STIG1_{prom}::iaaM, que são naturalmente formados por auto-polinização em plantas selvagens (controle).

Para se investigar a capacidade das plantas STIG1_{prom}::iaaM de produzir frutos, polinizações manuais controladas foram realizadas nestas plantas e em plantas selvagens (controle). Após polinização de pistilo de planta selvagem com pólen de planta STIG1_{prom}::iaaM, observou-se a formação de frutos com tamanho normal (Figura 37A). Isto nos sugeriu que plantas STIG1_{prom}::iaaM são normais quanto à fertilidade masculina. Contudo, quando a polinização foi realizada com pólen de planta selvagem em pistilo de plantas STIG1_{prom}::iaaM, observou-se a formação de frutos menores que o normal (Figura 37B).

Figura 37: Frutos formados após polinização cruzada controlada entre plantas $STIG1_{prom::iaaM}$ e selvagens. Fruto formado a partir de pólen de planta $STIG1_{prom::iaaM}$ e pistilo de planta selvagem apresenta-se muito maior (A) que o fruto formado a partir de pólen de planta selvagem e pistilo de planta $STIG1_{prom::iaaM}$ número 4 (B). Este fenótipo foi observado nas 3 plantas transgênicas.

4.4 - Teste de segregação

A fim de analisar a viabilidade das sementes provenientes da fertilização do pistilo das plantas transgênicas $STIG1_{prom::iaaM}$ 1, 4 e 8 com pólen de plantas selvagens (controle, SR1) e de estimar a quantidade de cópias de transgene inseridas no genoma destas três plantas, foram realizados testes de germinação e de segregação (Figura 38). No total, 400 sementes foram analisadas, sendo 100 sementes provenientes de cada um dos quatro tipos de cruzamentos realizados: pistilo controle (SR1) x pólen controle (SR1); pistilo transgênico 1 x pólen controle (SR1); pistilo transgênico 4 x pólen controle (SR1); pistilo transgênico 8 x pólen controle (SR1). Tais sementes foram germinadas em meio MS-canamicina e as taxas de germinação e de segregação foram determinadas.

A				
	Semeadas	Germinadas	Can-sensível (mortas)	F.O.
SR1 / SR1	100	100	100	100 %
T1 / SR1	100	100	0	0%
T4 / SR1	100	96	5	5,20%
T8 / SR1	100	71	5	7,04%

B			F.E.
1 cópia	Aa x aa		50%
2 cópias	AaBb x aabb		25%
3 cópias	AaBbCc x aabbcc		12,5%
4 cópias	AaBbCcDd x aabbccdd		6,25%
5 cópias	AaBbCcDdEe x aabbccdde		3,125%
6 cópias	AaBbCcDdEeFf x aabbccddeeff		1,5625%

Figura 38: Teste de germinação e de segregação de sementes. (A) Tabela contendo número de sementes semeadas, germinadas, canamicina-sensíveis (mortas) e a frequência observada de sementes can-sensíveis (F.O.). As sementes são provenientes do cruzamento entre pistilo de SR1/pólen de SR1; pistilo de transgênica 1/pólen de SR1; pistilo de transgênica 4/pólen de SR1; pistilo de transgênica 8/pólen de SR1 semeadas. (B) Tabela contendo número de cópias de transgene no genoma e frequência mendeliana esperada (F.E.) para cruzamento com planta controle. Letras maiúsculas representam presença de transgene e minúsculas, ausência de transgene.

De um total de 100 sementes provenientes do cruzamento de pistilo controle (SR1) x pólen controle (SR1), a taxa de germinação observada foi de 100/100, a taxa de mortalidade (plântulas sensíveis à canamicina) foi de 100/100, resultando em uma frequência observada (F.O.) de 100% de plantas sensíveis à canamicina.

De um total de 100 sementes provenientes do cruzamento de pistilo transgênico 1 x pólen controle (SR1), a taxa de germinação observada foi de 100/100, a taxa de mortalidade (plântulas sensíveis à canamicina) foi de 0/100, resultando em uma frequência observada (F.O.) de 0% de plantas sensíveis à canamicina.

De um total de 100 sementes provenientes do cruzamento de pistilo transgênico 4 x pólen controle (SR1), a taxa de germinação observada foi de 96/100, a taxa de mortalidade

(plântulas sensíveis à canamicina) foi de 5/96, resultando em uma frequência observada (F.O.) de 5,2% de plantas sensíveis à canamicina.

De um total de 100 sementes provenientes do cruzamento de pistilo transgênico 8 x pólen controle (SR1), a taxa de germinação observada foi de 71/100, a taxa de mortalidade (plântulas sensíveis à canamicina) foi de 5/71, resultando em uma frequência observada (F.O.) de 7,04% de plantas sensíveis à canamicina.

Aplicando o teste estatístico do *qui-quadrado* ($\chi^2 = \sum (fo - fe)^2 / fe$, onde $\alpha = 0,05$ e G.L. = 1) às frequências observadas (F.O.) e às frequências esperadas (F.E.) para sensibilidade à canamicina, de acordo com a segregação do T-DNA pela Segunda Lei de Mendel (Figura 38, B), sugere-se que o transgênico 1 possui 5 ou mais cópias do T-DNA, o transgênico 4 possui 4 ou mais cópias e o transgênico 8 possui 3 ou mais cópias.

Quanto à frequência de germinação (F.G.), observou-se germinação de 100% das sementes provenientes do cruzamento entre pistilo controle (SR1) x pólen controle (SR1) e entre pistilo transgênico 1 x pólen controle (SR1). Desta forma, sugere-se que os problemas de germinação encontrados pelas sementes provenientes do pistilo transgênico 4 x pólen controle (SR1) (F.G. = 96%) e do pistilo transgênico 8 x pólen controle (SR1) (F.G. = 71%) devam ser atribuídos ao protocolo de esterilização de sementes.

4.5 – Quantificações de auxina em estigmas e estiletes de plantas de *Nicotiana tabacum* transgênicas STIG1_{prom}::iaaM e controle

4.5.1 - Quantificações de auxina no Brasil por GCMS (Gas chromatography/Mass Spectrometry)

Com a finalidade de medir e comparar as quantidades de ácido indol-3-acético (AIA) livre no estigma e estilete de plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM e de plantas selvagens de *N. tabacum* (SR1), foram realizados experimentos-piloto na tentativa de se estabelecer um protocolo

para quantificações deste fitohormônio em pistilos de *N. tabacum*. Estes experimentos foram feitos com base no protocolo de extração de AIA, rotineiramente utilizado no laboratório do Professor Dr. Eduardo Purgatto (Departamento de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP), otimizado para quantificações de AIA a partir de, no mínimo, 10mg de tecido vegetal fresco, de *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Solanum lycopersicum*) e polpa de banana (*Musa* sp).

Foram realizadas extrações de AIA, inicialmente, a partir de 33mg de tecido fresco de estigma e estilete de *N. tabacum*. Os extratos foram posteriormente analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS). As medições realizadas a partir da extração de 33mg de tecido fresco não revelaram quantidades detectáveis de AIA. Dobrou-se, desta forma, a quantidade de material inicial para extração (66mg). Novamente, não houve níveis detectáveis de AIA após análise por GC-MS.

Utilizou-se finalmente 100mg de tecido inicial de estigma e estilete e, neste caso, embora nenhum pico significativo tenha sido observado no tempo de retenção para o ácido indol-3-acético na cromatografia gasosa (aproximadamente 16,3 minutos, Figura 39A), foram observados picos de massa/carga (m/z) referentes a este composto na subsequente espectrometria de massa (Figura 39C, circulado em vermelho). Este fato indica que foi possível detectar traços de AIA livre a partir da extração de 100mg de estigma e estilete de *N. tabacum*, porém melhorias se fazem necessárias para a obtenção de picos nítidos e isolados, a fim de possibilitar a medição e a comparação das quantidades de ácido indol-3-acético (AIA) livre no estigma e estilete de plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM e de plantas selvagens.

Figura 39: Resultados de GC/MS para quantificação de ácido indol-3-acético (AIA) em estigma e estilo de *N. tabacum* selvagem (SR1). Extratos de AIA a partir de 100mg de tecido vegetal (estigma e estilo) submetidos à GC-MS. (A) Cromatografia gasosa. Não se observa nenhum pico referente à AIA no tempo de retenção deste composto - 16,379 minutos; (B) Pico de retenção do padrão - AIA-C13, no tempo 16,379 minutos; (C) Espectrometria de massa. Picos m/z referentes ao AIA-C-13 (padrão) - 136 e 194, e picos m/z referentes ao AIA endógeno - 130 e 189 (circulado em vermelho).

4.5.2 – Quantificações de auxina no Japão por LCMS (Liquid Chromatography/Mass

Spectrometry)

Após realizadas as tentativas de medições de auxina supracitadas, estabeleceu-se uma colaboração com os professores Dr. Hiroyuki Kasahara do Plant Science Center, Riken – Japão e Dr. Yunde Zhao da University of California San Diego -EUA, afim de obtermos dados sobre as quantidades de auxina livre nos pistilos de plantas transgênicas e selvagem. Para isso, os pistilos coletados a partir de uma planta selvagem (controle) e de uma planta transgênica (transgênico 4), em três estádios distintos do desenvolvimento floral (estádios 3, 7 e 10, como descrito por Koltunow *et al.*, 1990) foram enviados para o laboratório do Professor H. Kasahara, onde o Professor Y. Zhao gentilmente mensurou as quantidades de ácido indol-3-acético (auxina) livre neste material através de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS; para protocolo utilizado favor ver Mashiguchi, 2011).

Os resultados de LC-MS evidenciaram quantidades significativamente maiores de auxina livre nos pistilos de plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM. Foram observados, por exemplo, 617 nanogramas de auxina livre por grama de peso fresco (ng/gpf) em estigmas e estiletes da planta transgênica 4 no estágio 3 do desenvolvimento. Este valor excede largamente os 3,3ng/gpf encontrados em estigmas e estiletes de planta selvagem no mesmo estágio (Figura 40). A redução das concentrações de auxina livre nos estigmas e estiletes dos estágios 7 e 10 do desenvolvimento nas plantas transgênicas pode ser atribuída tanto a mecanismos endógenos de controle das quantidades da forma ativa deste fitohormônio em células vegetais (p.ex. catabolismo, conjugação, etc), quanto aos níveis menores de transcrição de iaaM promovida pelo promotor STIG1 nos estágios finais do desenvolvimento (Figura 17).

Além de quantidades elevadas de auxina nos estigmas e estiletes, os pistilos da planta transgênica número 4 apresentaram quantidades consideravelmente elevadas de auxina na região do ovário, comparadas às plantas controle. Foram observados, por exemplo, 18,5ng/gpf em ovários da planta transgênica 4 no estágio 3 do desenvolvimento, frente a somente 1,4ng/gpf em plantas selvagens (controle, SR1; Figura 40).

Figura 40: Medições de auxina por LC-MS em ovários (Ov) e estigmas/estiletes (E/E) de plantas SR1 (controle) e STIG1_{prom::iaaM} (transgênica, T4), para 3 estádios do desenvolvimento (estádios 3, 7 e 10). Nota-se um grande aumento de auxina nos ovários de plantas transgênicas (cinza) em relação aos ovários de planta controle (laranja). Um aumento ainda mais pronunciado observou-se nos estigmas e estiletes de plantas transgênicas (roxo) comparados aos estigmas e estiletes de plantas controle (rosa). Eixo y = ng/gpf (nanograma por grama de peso fresco); Eixo x = estádios 3, 7, 10 do desenvolvimento floral.

4.6 - Análise *in silico* da sequência do promotor STIG1

Com a finalidade de investigar a presença de elementos regulatórios de transcrição na sequência do promotor STIG1, utilizou-se a ferramenta online PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>), que comporta um banco de dados de elementos cis-regulatórios de plantas. Foram encontrados vários elementos regulatórios no promotor de STIG1 (Figura 41). Dentre eles, elementos de resposta a: I) Citocinina (30

elementos); II) Giberelina (3 elementos); III) Luz (50 elementos); IV) Desidratação (13 elementos).

Elemento regulatório	sequencia consenso	quantidade	função
ARR1AT	NGATT	28	Cytokinin responsive
CPBCSPOR	TATTAG	2	Cytokinin responsive
CAREOSREP1	CAACTC	1	gibberellin responsive
EBOXBNNAPA	CANNTG	16	light-responsive and tissue-specific activation
GAREAT	TAACAAR	2	gibberellin responsive
GATABOX	GATA	14	Required for high level, light regulated, and tissue specific expression
GT1CONSENSUS	GRWAAW	13	light-regulated
GT1CORE	GGTTAA	1	light-regulated
IBOXCORE	GATAA	4	light-regulated
INRNTPSADB	YTCANTYY	2	light-regulated
MYB1LEPR	GTTAGTT	1	defence-related
MYB1AT	WAACCA	2	dehydration-responsive gene
MYB2AT	TAACGT	1	dehydration-responsive gene
MYB2CONSENSUS	YAACKG	3	dehydration-responsive gene
MYBCORE	CNGTTR	5	dehydration-responsive gene
MYCATERD1	CATGTG	1	dehydration-responsive gene
MYCATERD22	CACATG	1	dehydration-responsive gene
MYBST1	GGATA	2	CaMV 35S promoter related transcriptional activator

Figura 41: Análise *in silico* de elementos cis-regulatórios presentes no promotor STIG1.

Também foram encontrados: um elemento relacionado com defesa contra patógenos; dois elementos relacionados com expressão tecido-específica; e dois elementos responsáveis por conferir altas taxas de transcrição. Não foram encontrados elementos regulatórios de resposta à auxina no promotor STIG1.

4.7 – Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativa

Com o objetivo de investigar se níveis aumentados de auxina provocaram alterações no transcriptoma do estigma e estilete das plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM 1, 4 e 8, foram realizadas extrações de RNA (Figura 42) com a finalidade de se analisar de expressão gênica por RT-PCR quantitativa. No total foram analisados 9 genes diferentes expressos no estigma e estilete de *Nicotiana tabacum*, dentre eles: ARF2 (Auxin Response Factor 2), descrito como um repressor de divisão celular em *Arabidopsis thaliana* (Schruff *et al*, 2005); ARF3 (Auxin Response Factor 3), descrito como importante na determinação da diferenciação dos tecidos do pistilo de *Arabidopsis thaliana* (Sessions & Zambryski, 1995); Aux/IAA13 e Aux/IAA19, descritos como membros da classe Aux/IAA, que são genes altamente responsáveis à auxina (Abel & Theologis,

1996); Aux1 e PIN1, dois transportadores de auxina que são, respectivamente, o carreador de entrada e o carreador de saída de auxina em células vegetais (Vanneste & Friml, 2009); SCI1, um inibidor de ciclo celular específico do pistilo (dePaoli *et al*, 2011); SPICE1, um putativo inibidor da expansão celular (Brito, 2010); e CycB, ciclina B, marcador do ciclo celular (Setiady *et al*, 1995).

Figura 42: Eletroforese em gel de agarose (1,2%), para checagem da integridade das moléculas de RNA extraídas a partir de estigmas e estiletes de uma planta selvagem (controle) e 3 plantas transgênicas (Transgênica 1, Transgênica 4 e Transgênica 8), a partir de 3 estádios do desenvolvimento floral (3, 7 e 10).

A partir dos resultados obtidos para a expressão dos diferentes genes analisados em estigmas e estiletes em três estádios distintos do desenvolvimento (estádio 3, 7 e 10), para três diferentes plantas transgênicas (transgênicos 1, 4 e 8) e para uma planta selvagem, observaram-se:

I) quantidades muito aumentadas para o transcrito Aux/IAA13, em todos os estádios do desenvolvimento, nas 3 plantas transgênicas independentes, com um maior aumento no estágio 3 do desenvolvimento (Figura 43A);

II) quantidades muito aumentadas para o transcrito Aux/IAA19, em todos os estádios do desenvolvimento, nas 3 plantas transgênicas independentes, com um maior aumento no estágio 10 do desenvolvimento (Figura 43B);

III) quantidades aumentadas para o transcrito ARF2 nos estigmas/estiletes das 3 plantas transgênicas independentes, para todos os estádios do desenvolvimento analisados (Figura 43C), com um maior aumento deste transcrito no estágio 10 do desenvolvimento.

IV) quantidades reduzidas para o transcrito ARF3 nos estigmas/estiletes das 3 plantas transgênicas independentes, para todos os estádios do desenvolvimento analisados (Figura 43D);

Figura 43: Gráficos da análise da expressão gênica relativa em estigmas e estiletes de plantas transgênicas e selvagem. No total foram analisados 9 genes (A-I). A análise de expressão gênica se deu a partir de estigmas e estiletes de 3 plantas transgênicas independentes (T1 = Transgênico 1, T4 = Transgênico 4, T8 = Transgênico 8) e de 1 planta selvagem (SR1), para 3 estádios do desenvolvimento floral (estádios 3, 7 e 10). Em azul: nível de expressão do gene-alvo na planta selvagem, em cada um dos estádios estudados; em vermelho: o nível da expressão do gene-alvo na respectiva planta transgênica, em cada um dos estádios estudados. Eixo x = estádios do desenvolvimento floral e eixo y = unidades arbitrárias, referentes à normalização da quantificação da expressão gênica pelo método delta-delta-Ct (ddCt).

V) para o transportador Aux1 não se observou um padrão de alteração na expressão. Somente observou-se uma leve tendência para o aumento nas taxas de transcrição deste transportador no estágio 3 do desenvolvimento, para todas as plantas transgênicas (Figura 43E);

VI) para o transportador PIN1 também não foi observado um padrão de alterações nos níveis de expressão. Observou-se somente uma leve tendência para uma redução nas taxas de transcrição deste transportador nos estigmas/estiletos do estágio 7, de todas as plantas transgênicas, comparadas à planta controle (Figura 43F);

VIII) para o transcrito SPICE1 foram observadas quantidades reduzidas nos estigmas e estiletos no estágio 3 do desenvolvimento, de todas as plantas transgênicas analisadas. Curiosamente, uma inversão foi observada no estágio 10 do desenvolvimento, quando SPICE1 apresentou níveis aumentados de transcritos (Figura 43G);

IX) Níveis praticamente constantes foram observados para ciclina B (CycB) nos estágios 3 e 7 do desenvolvimento floral, para todas as plantas transgênicas analisadas. Porém, quantidades mais elevadas de ciclina B foram observadas nos estigmas e estiletos das plantas transgênicas no estágio 10 do desenvolvimento (Figura 43H).

VII) Para o transcrito SCI1, foram observadas quantidades levemente reduzidas em todos os estágios do desenvolvimento, nas 3 plantas transgênicas independentes (Figura 43I);

5. – DISCUSSÃO

5.1 – Fenótipos observados e número de cópias de T-DNA nas plantas transgênicas

Após obtenção da construção de interesse STIG1_{prom}::iaaM, transferência desta para *Agrobacterium tumefaciens* e utilização desta bactéria para transferir o T-DNA para células vegetais, um total de 19 plantas transgênicas independentes foram regeneradas. Entre os transgênicos independentes obtidos, observou-se uma variação na intensidade do fenótipo nos pistilos das plantas transgênicas entre si. Apesar de variações na intensidade, em todas as plantas transgênicas

observou-se o mesmo fenótipo: pistilo maior nos estádios iniciais do desenvolvimento (até o estágio 6) e pistilos menores nos estádios finais do desenvolvimento, comparando-se com pistilos de plantas selvagens. Sabe-se que a inserção de T-DNA no genoma de uma planta de interesse, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se dá de forma aleatória, sendo possível a inserção do T-DNA em praticamente qualquer parte do genoma vegetal (Alonso *et al.*, 2003). Desta forma, embora a mesma construção tenha sido utilizada para a obtenção dos 19 transformantes independentes de *Nicotiana tabacum*, é possível que as diferenças na intensidade do fenótipo, observadas entre os diferentes transformantes obtidos, seja devido a níveis diferentes de expressão gênica da construção de interesse, devido à inserção do T-DNA em regiões cromossômicas distintas (efeito de posição), ou seja, mais ou menos ativas transcricionalmente (Matzke & Matzke, 1998).

Adicionalmente, é possível haver diferenças no número de cópias de T-DNA inseridas no genoma de cada um dos diferentes transgênicos obtidos, resultando em diferenças no nível de expressão da enzima iaaM nos pistilos das diferentes plantas transgênicas independentes. De fato, análises de segregação com sementes produzidas nos transgênicos primários, das 3 plantas escolhidas para estudo neste projeto (transgênicos 1, 4 e 8) sugerem a presença de 3 ou mais cópias no genoma destas plantas, o que, por sua vez, pode explicar o motivo de terem sido observados fenótipos mais intensos nestas plantas. Testes de segregação, entretanto, consistem em uma análise indireta, sendo necessários experimentos mais refinados, como *Southern Blot* ou PCR quantitativa para obtermos informações precisas sobre o número de cópias de T-DNA presente no genoma das plantas transgênicas estudadas.

5.2 – Estádio 7 do desenvolvimento: um marco divisor de maturidade do pistilo?

As medições das quantidades de auxina livre em estigmas/estiletos e ovários de pistilos nos estádios 3, 7 e 10 do desenvolvimento revelaram um considerável incremento deste fito-hormônio nos pistilos da planta transgênica STIG1_{prom}::iaaM 4, comparando-se com planta

controle (SR1). Apesar de os níveis de auxinas se apresentarem de forma muito elevada em todos os estádios do desenvolvimento analisados, os pistilos de *N. tabacum* apresentaram resposta diferencial, dependente do estágio do desenvolvimento analisado. Nos estádios iniciais do desenvolvimento, os pistilos das plantas STIG1_{prom::iaaM} apresentaram um pronunciado crescimento em relação a pistilos de plantas controle. Observou-se, entretanto, pistilos reduzidos em comprimento nos estádios finais do desenvolvimento, o que indica que níveis aumentados de auxina causam uma inibição no crescimento do pistilo. A inversão de resposta de “estímulo” (“positiva”) para uma resposta de “inibição” (“negativa”) à auxina, em relação ao crescimento do pistilo, se deu no estágio 7 do desenvolvimento. Sabe-se que os níveis de auxina na parte superior do pistilo de *N. tabacum* (estigma/estilete), nos estádios finais do desenvolvimento, são relativamente baixos (Chen & Zhao, 2008), porém uma elevação abrupta das quantidades de auxina ocorre quando grãos de pólen entram em contato com o pistilo destas plantas (Chen & Zhao, 2008). Uma máxima de auxina é produzida pelos tecidos do pistilo imediatamente subjacentes à região de penetração dos grãos de pólen (Chen & Zhao, 2008). Desta forma, nos estádios finais do desenvolvimento do pistilo, quantidades elevadas de auxina são percebidas pelo pistilo como um sinal de germinação e crescimento de tubos polínicos em seus tecidos internos (Chen & Zhao, 2008). Em paralelo a este fato, sabe-se que a partir do estágio 7 do desenvolvimento, pistilos de *N. tabacum* são capazes de permitir a hidratação e o crescimento de tubos polínicos em direção ao ovário e produzir frutos com sementes (Brito *et al.*, em preparação). Este último trabalho mostra o estágio 7 do desenvolvimento como um marco divisor de maturidade do pistilo. Pistilos de *N. tabacum* em estádios inferiores ao estágio 7 do desenvolvimento são incapazes de produzir frutos (Brito *et al.*, em preparação). Somando-se a estes fatos, a observação de que plantas STIG1_{prom::iaaM} apresentam resposta diferencial ao aumento dos níveis do hormônio auxina, antes e após o estágio 7 do desenvolvimento, levanta a hipótese de que a parte superior do pistilo de *N. tabacum* (estigma/estilete) perceba o fitohormônio auxina de forma diferencial a partir do estágio 7 do desenvolvimento: não mais como

um estimulante do crescimento - como observado nos estádios iniciais do desenvolvimento, mas, talvez, como um sinalizador da presença de grãos de pólen em crescimento. Uma máxima de auxina nesta região seria traduzida como a presença de grãos de pólen em germinação, o que acarretaria a estagnação do investimento energético em crescimento do estigma/estilete, uma vez que a função destas estruturas (receber e dar suporte os grãos de pólen para que alcancem o ovário) estaria, a princípio, sendo cumprida. Porém, testar tal hipótese não é algo trivial de ser investigado.

5.3 - Níveis aumentados de auxina no pistilo afetam negativamente a polinização e a formação de frutos em *Nicotiana tabacum*

No momento da antese, observou-se nas flores das plantas STIG1_{prom}::iaaM um estilete mais curto (Figura 34), uma área estigmática reduzida e uma menor secreção de exudato (Figura 35). Estiletos mais curtos reduzem a probabilidade de grãos de pólen chegarem à superfície estigmática, devido à distância observada entre anteras e estigma nas plantas STIG_{prom}::iaaM. A redução na área estigmática e na secreção de exudato diminuem, ainda mais, a probabilidade de adesão e de germinação de tubos polínicos. Estes fatores, conjuntamente, explicam, pelo menos em parte, a dificuldade apresentada pelas plantas STIG1_{prom}::iaaM em formar frutos por autopolinização (Figura 36).

A polinização manual e controlada de pistilos de plantas STIG_{prom}::iaaM resultou em frutos menores do que o normal (Figura 37). Em angiospermas, o desenvolvimento do fruto é um fator que está intimamente ligado à fertilização dos gametas femininos pelos grãos de pólen, com subsequente formação de sementes (Raven *et al*, 2007). Neste processo, há uma intensa comunicação química entre o embrião em desenvolvimento e os tecidos do fruto (Gillaspy *et al*, 1993; Pandolfini, 2009). Sabe-se que, em muitos casos, um menor número de sementes formadas por fruto resulta em um reduzido tamanho final deste (Gustafson, 1939; Stephenson *et al*, 1988; Gillaspy *et al*, 1993). Uma área estigmática reduzida e uma menor secreção de exudato nos

pistilos das plantas STIG_{prom}::iaaM, conjuntamente, contribuem para a fertilização de um menor número de oosferas, o que resulta em menor número de sementes formadas. Sugere-se, portanto, que um menor número de sementes formadas possa explicar, pelo menos em parte, a ocorrência de frutos menores obtidos a partir da polinização controlada de pistilos de plantas STIG_{prom}::iaaM.

O fato de o estilete estar mais espesso nas plantas STIG1_{prom}::iaaM também nos sugere alterações em seus tecidos internos, o que poderia estar dificultando, de alguma forma, o crescimento dos tubos polínicos, ao longo do tecido transmissor, em direção ao ovário. Análises futuras de cortes histológicos do estilete e ensaios de dinâmica de crescimento de tubos polínicos nos pistilos das plantas STIG1_{prom}::iaaM poderão nos fornecer informações importantes a este respeito.

5.4 - *Crosstalk* entre auxina e outros fitohormônios

Os mecanismos moleculares causadores da inibição do crescimento do pistilo nos estádios finais do desenvolvimento podem ser explicados de diversas formas. Jallais & Chory (2010) explicam os mecanismos moleculares envolvidos na “síndrome de evitar sombra” (do inglês, *Shade Avoidance Syndrome*), o qual envolve a produção endógena de grandes quantidades de auxina em folhas. Plantas competem entre si com relação à qualidade de luz para a fotossíntese. A absorção de luz vermelha (~660nm) de boa qualidade por plantas ocasiona a emissão de luz vermelha longa (~730nm) por estas. Quando a relação quantidade de luz vermelha/luz vermelha longa se apresenta em uma razão inferior a 1, ou seja, quando há pouca luz vermelha (~660nm) em relação à luz vermelha longa (~730nm), é disparado o mecanismo da “síndrome de evitar sombra”. Nesta síndrome, há uma elevada produção endógena de auxina (via TAA, triptofano-dependente; Tao *et al.*, 2008) nas folhas de plantas sob condições sub-ideais de iluminação. Os níveis de auxina muito elevados nas folhas destas plantas estimulam a produção de citocinina-oxidases que, por sua vez, oxidam o fito-hormônio citocinina, levando a uma interrupção do

crescimento das folhas (Carabelli *et al.*, 2007). A auxina produzida nas folhas é subsequentemente direcionada para o caule, onde apresenta uma ação oposta: induz o crescimento vegetal, fazendo com que a planta cresça no eixo longitudinal, ultrapassando em altura as plantas competidoras ao seu redor, em busca de luz. Uma vez que folhas e carpelos são estruturas homólogas (Balanzá *et al.*, 2006), é possível que a estagnação no crescimento observada nos pistilos das plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM, em resposta a níveis elevados de auxina, se deva, pelo menos em parte, à redução das quantidades do fito-hormônio citocinina, através da produção de citocinina-oxidasas. De fato, Bavrina *et al.* (2002) observaram que plantas transgênicas de *Nicotiana glauca* com quantidades aumentadas de auxina no pistilo apresentaram pistilos menores, com níveis significativamente reduzidos de citocinina, o que corrobora esta hipótese.

Entre os genes amplamente conhecidos como de resposta à auxina, se encontra o gene codificador para a enzima ACC sintase, uma enzima de biossíntese do fito-hormônio etileno (Lin *et al.*, 2009). Sabe-se que o fito-hormônio etileno, em grandes quantidades, causa a resposta tripla do etileno (do inglês, Ethylene Triple Response – ETR) em plântulas (Figura 47). A ETR consiste no encurtamento e no aumento da espessura do caule e na intensificação da curvatura da plântula em germinação (Guzmán & Ecker, 1990). Isto, conjuntamente ao fato de o etileno causar a expansão celular no eixo radial (Jallais & Chory, 2010) e, quando em grandes concentrações, causar a inibição do crescimento (Hansen & Grossmann, 2000), sugerem que o etileno possa estar desempenhando um papel no estabelecimento do fenótipo observado nos pistilos de plantas STIG1_{prom}::iaaM no final do desenvolvimento, ou seja, estiletes mais curtos e espessos.

Figura 47: Plântulas de *Arabidopsis* crescidas sob altas concentrações de etileno. A resposta tripla do etileno (estatura reduzida, curvatura e espessura aumentadas) é observada em todas as plântulas com exceção de uma plântula mutante *etr1*, insensível ao etileno (retirada de Taiz & Zeiger, 2002).

O hormônio ácido giberélico, ou simplesmente giberelina, possui inúmeras funções no desenvolvimento vegetal, incluindo germinação de sementes, florescimento, crescimento de raízes e caules (Taiz & Zeiger, 2002). Nas décadas de 1960 e 1970, o mundo observou um aumento considerável na produção agrícola, especialmente de trigo e arroz, fenômeno que ficou conhecido como “revolução verde”. Além da introdução de novos agro-químicos, novas variedades de trigo e arroz contribuíram grandemente para este fenômeno. Estas novas variedades apresentavam sementes maiores e mais pesadas. Porém, apesar de mais produtivas, tais variedades eram amplamente suscetíveis a ventos e chuvas fortes, que ocasionavam a curvatura e a flexão das plantas no solo, prejudicando a produtividade. O cruzamento com variedades mutantes-anões proporcionou maior robustez ao corpo vegetal destas cultivares, permitindo o plantio de novas variedades de trigo e arroz mais produtivas e resistentes aos intemperismos mencionados, o que contribuiu amplamente para suprir a demanda de alimentos para uma população humana que praticamente duplicou neste período (Hedden, 2003). Estudos posteriores identificaram que o fenótipo mutante-anão de arroz se deve a uma mutação em um gene da via de biossíntese de giberelina e, em trigo, identificou-se que o fenótipo mutante-anão era atribuído à mutação em genes codificadores para proteínas DELLA (revisado em Hedden,

2003). Proteínas DELLA, pertencentes à família domínio GRAS (Hirsch & Oldroyd, 2009), são moléculas envolvidas na via de sinalização nuclear por giberelina, amplamente conhecidas por desempenharem um importante papel como repressores gerais do desenvolvimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2002).

Estudos em *Arabidopsis thaliana* demonstraram que mutantes *ga1*, um gene da via de biossíntese de giberelina, apresentam pistilos muito menores do que o normal (Figura 48, Tyler *et al.*, 2004). O cruzamento do mutante *ga1* com mutantes *rga*, *rgl1* e *rgl2* - genes codificadores para três, de um total de cinco proteínas DELLAs codificadas no genoma de *A. thaliana*, demonstraram que os efeitos observados na redução do tamanho do pistilo, devido à redução nas quantidades de giberelina no mutante *ga1*, se devem, amplamente, à ação das três proteínas DELLA mencionadas (Figura 48, Tyler *et al.*, 2004). Proteínas DELLA atuam em nível nuclear, reprimindo a expressão de genes de resposta à giberelina. A presença de giberelina em células vegetais causa o direcionamento de proteínas DELLAs, repressoras do crescimento, para degradação via 26S proteassoma, ocasionando os efeitos atribuídos ao hormônio giberelina (revisado em Thomas & Hedden, 2006).

Um *cross-talk* entre auxina e giberelina, atuando na regulação dos níveis de proteína DELLA e desencadeando o desenvolvimento de raízes, foi descrito por Fu & Harberd (2003). Os autores observaram que níveis endógenos precisos de auxina são necessários para a degradação de proteínas DELLA nas raízes, com conseqüente crescimento de órgão vegetal (Fu & Harberd, 2003). Contrastando com este efeito positivo da auxina na degradação de proteínas DELLA no crescimento da raiz, Achard *et al.* (2003) demonstraram que as proteínas DELLA atuam na repressão do crescimento da raiz em resposta a níveis aumentados do hormônio etileno e são um ponto molecular de integração dos hormônios giberelina, etileno e auxina (Achard *et al.*, 2003). Primeiramente, eles observaram que a resposta tripla do etileno é resultante, pelo menos em parte, da ação de proteínas DELLA. Segundo, eles observaram que a inibição do crescimento das raízes, ocasionado por níveis altos do fito-hormônio etileno, se dá por meio da repressão do

crescimento pelas proteínas DELLA. Por fim, os autores demonstraram que o etileno é um agente retardador da degradação de proteínas DELLA, fenômeno normalmente disparado pela presença de giberelina. Sabe-se há muito tempo que o hormônio auxina atua de forma dose-dependente, sendo que quantidades ótimas induzem a expansão e proliferação celular (Perrot-Rechenmann, 2010) e que quantidades supra-ótimas deste hormônio levam à inibição do crescimento vegetal devido, pelo menos em parte, à produção de etileno (Taiz & Zeiger, 2002). É muito provável que quantidades elevadas de auxina nos pistilos de plantas *STIG1_{prom}::iaaM* tenham acarretado a produção de etileno. Uma produção excessiva de etileno poderia estar acarretando uma ação recrudescida de proteínas DELLA no pistilo, como observado em raízes por Achard *et al.*, (2003), desencadeando, desta forma, a estagnação no crescimento deste órgão - fenômeno observado nos pistilos de plantas *STIG1_{prom}::iaaM* nos estádios finais do desenvolvimento. Porém análises moleculares e/ou de dosagens hormonais se fazem necessárias para confirmar tal hipótese.

Figura 48: Efeitos fenotípicos de mutações para diferentes genes (RGA, RGL1 e RGL2) codificadores para proteínas DELLA em mutante *ga1* de *Arabidopsis thaliana* deficiente na produção de giberelina. Observa-se a restauração do fenótipo selvagem ao passo que se retira as proteínas DELLA do *background ga1*. WT = Wild type (controle) (retirada de Tyler *et al.*, 2004).

5.5 - Alterações no transcriptoma do pistilo de *Nicotiana tabacum* em resposta a níveis aumentados de auxina

O Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP – FFCLRP) tem grande interesse na caracterização de genes expressos no pistilo de *N. tabacum* (Quiapim *et al.*, 2009,

DePaoli *et al.*, 2011). O hormônio auxina desempenha importante papel na regulação dos mais diversos processos do desenvolvimento vegetal, incluindo o pistilo (Vanneste & Friml, 2009). Além disso, sabe-se que auxina atua, majoritariamente, na regulação da expressão gênica (Abel & Theologis, 1996). Desta forma, obter plantas transgênicas estáveis com níveis endógenos aumentados de auxina no pistilo constitui uma excelente ferramenta para se investigar a resposta, de diferentes genes de interesse, expressos no pistilo de *N. tabacum*, ao hormônio auxina.

A fim de confirmarmos se a “plataforma” plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM poderia ser utilizada para investigar a resposta de diferentes genes ao hormônio auxina, foram testados os níveis de expressão de dois genes da família Aux/IAA (Aux/IAA13 e Aux/IAA19), amplamente conhecida por ser uma família gênica altamente responsável a auxina (Abel & Theologis, 1996). Os resultados obtidos para a quantificação da expressão gênica confirmaram uma alta indução na expressão de ambos os genes nos estigmas e estiletes das plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM analisadas (Figura 43A e 43B). Tal fato indica a possibilidade de se utilizar as plantas STIG1_{prom}::iaaM para se investigar a resposta de diferentes genes de interesse em nosso laboratório ao hormônio auxina.

O gene Aux/IAA19 codifica para uma proteína que interage fisicamente com a proteína Auxin Response Factor 7 (ARF7). Ambas as proteínas Aux/IAA19 e ARF7 são essenciais para os efeitos de tropismos (gravitropismo e fototropismo) relacionados à auxina, sendo que mutantes de *Arabidopsis thaliana* para estes genes são grandemente insensíveis à luz e à gravidade (Harper et al, 2000; Tatematsu et al, 2004). Com relação à função da proteína Aux/IAA19 no desenvolvimento floral, Tashiro *et al.* (2009) demonstraram que esta proteína é altamente expressa no filete dos estames e desempenha uma importante função na elongação destes. O desenvolvimento do pistilo nas plantas mutantes para Aux/IAA19 ocorre normalmente, com a única diferença que, freqüentemente, não há o desenvolvimento de sílica (frutos) nestas plantas. Porém, este fenótipo é atribuído a problemas no desenvolvimento dos estames. É relevante o fato de que, apesar de os níveis de transcrição para o gene Aux/IAA19 estarem aumentados, não

significa que os níveis da proteína Aux/IAA19 estejam aumentados, uma vez que o aumento na transcrição ocorre em paralelo à degradação protéica desta classe de genes em resposta a auxina (Dharmasiri *et al*, 2005). Com relação ao gene Aux/IAA13, ainda não há dados na literatura sobre a caracterização deste gene.

O gene ARF2, que codifica para uma proteína inibidora de divisão celular e do crescimento do pistilo (Schruff *et al*, 2005), apresentou níveis de transcrição significativamente elevados no estigma e estilete das três plantas transgênicas analisadas, especialmente no estágio 10 do desenvolvimento. Isto é especialmente interessante, uma vez que o estigma e estilete se apresentam significativamente reduzidos em tamanho neste estágio, sugerindo, portanto, uma ação da proteína ARF2 na inibição do crescimento do pistilo nos estádios finais do desenvolvimento.

O gene ARF3, que codifica para uma proteína que tem como função especificar os tecidos do pistilo (Sessions & Zambryski, 1995), apresentou níveis de transcritos reduzidos, no mínimo pela metade, em todos os estádios do desenvolvimento, em todas as plantas transgênicas analisadas. A interpretação deste dado não é trivial, devido à complexa função deste gene na coordenação do desenvolvimento do pistilo (Nemhauser *et al*, 2000). Sabe-se que os fatores de transcrição ARF são divididos entre repressores e ativadores da transcrição gênica (Guilfoyle & Hagen, 2007). Sabendo-se que quantidades elevadas de auxina permitem a ação de ARFs, devido à degradação de inibidores Aux/IAA, seria interessante analisar se a proteína ARF3, que se enquadra na classe de inibidores de transcrição (Guilfoyle & Hagen, 2007) estaria atuando em um *auto-feedback loop* inibindo sua própria transcrição, como no complexo mecanismo de *auto-feedback loop* descrito para as proteínas MONOPTEROS (ARF5) e BODENLOS (Aux/IAA12) por Lau *et al*. (2011), onde os autores levantam a possibilidade de se poder generalizar este mecanismo para outros parceiros ARF – Aux/IAA.

A análise da expressão dos transportadores Aux1 e PIN1 nas plantas transgênicas indica que não houve grandes alterações nos níveis de transcrição para estes genes, em resposta a níveis

aumentados de auxina. Este fato, conjuntamente ao grande aumento de auxina livre observado nos ovários das plantas transgênicas (Figura 40), sugere que a auxina adicional, produzida exclusivamente no estigma pela atividade restrita do promotor STIG1 nesta região (Goldman *et al*, 1994), esteja sendo normalmente transportada no sentido ápice-base (transporte polar da auxina).

As diferenças nos níveis de transcrição para o gene SCI1 não foram significativamente distintas daqueles observados para as plantas selvagens. Somente uma leve diminuição das quantidades deste transcrito foi observada nos pistilos das plantas transgênicas. Isto indica que este gene, repressor do ciclo celular (DePaoli *et al*, 2011), não é (ou é muito pouco) responsável à auxina em nível transcricional.

As diferenças nos níveis de transcrição apresentadas para o gene SPICE1 nas plantas transgênicas são particularmente interessantes. SPICE1 é um regulador da expansão celular, recentemente descoberto em nosso laboratório. Plantas de *N. tabacum* silenciadas para SPICE1 apresentam pistilos maiores devido a um considerável aumento na expansão celular (Brito, 2010). Curiosamente, os pistilos das plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM, no estágio 3 do desenvolvimento, apresentam tanto pistilos maiores que os pistilos de plantas selvagens, quanto níveis reduzidos do transcrito do inibidor de expansão SPICE1. Entretanto, no estágio 10 do desenvolvimento, os pistilos das plantas STIG1_{prom}::iaaM apresentam menor tamanho e também maiores níveis de transcrição de SPICE1, sugerindo uma possível contribuição deste para o estabelecimento dos fenótipos observados.

Os níveis de transcrição do marcador de divisão celular ciclina-B, nos pistilos das plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM, se mostraram muito próximos aos níveis de transcrição nos pistilos das plantas controle nos estádios 3 e 7 do desenvolvimento floral. Porém um aumento considerável foi observado no nível de transcritos deste gene nos pistilos das plantas transgênicas no estágio 10. Isto sugere o aumento das taxas de divisão celular no pistilo das plantas STIG1_{prom}::iaaM neste estágio. Apesar dos pistilos das plantas STIG1_{prom}::iaaM no estágio 10 do

desenvolvimento apresentarem uma estagnação da elongação do estilete, observou-se um considerável espessamento deste. É possível que este espessamento seja resultado da proliferação celular no eixo radial do estilete. Porém cortes histológicos se fazem necessário para confirmar esta hipótese.

6 – CONCLUSÕES

Plantas transgênicas estáveis STIG1_{prom}::iaaM - expressando o gene iaaM sob controle do promotor STIG1 - foram obtidas com sucesso. Os pistilos das plantas transgênicas STIG1_{prom}::iaaM apresentaram níveis endógenos aumentados de ácido indol-3-acético (auxina).

Níveis endógenos elevados de auxina estimulam o crescimento do pistilo nos estádios iniciais do desenvolvimento. Entretanto, a exposição contínua a altos níveis endógenos de auxina ocasiona a inibição no crescimento deste órgão, culminando em pistilos menores na antese, com fertilidade reduzida. Os mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta são seguramente complexos, envolvendo - provavelmente - interações (*cross-talk*) entre diversos hormônios.

As análises de expressão gênica revelaram que níveis aumentados de auxina causaram um desbalanço no transcriptoma do pistilo em todos os estádios do desenvolvimento analisados. Por este motivo, as plantas transgênicas estáveis STIG1_{prom}::iaaM, obtidas neste projeto, constituem excelentes ferramentas para investigações futuras sobre a expressão de diferentes genes expressos no pistilo de *N. tabacum*, em resposta a níveis aumentados de auxina.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, S., BALLAS, N., WONG, L-M., THEOLOGIS, A. (1996). DNA elements responsive to auxin. *Bioessays* (18): 647–654
- ABEL S & THEOLOGIS A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* (111):9-17.
- ABEL, S. & THEOLOGIS, A. (2010) Odyssey of Auxin Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2(10):a004572

- ACHARD P, VRIEZEN, VAN DER STRAETEN D, HARBERD NP (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell* (15):2816-2825
- ALONSO JM *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* (301):653-657.
- ALVAREZ J & SMYTH DR (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* (126):2377-2386.
- BALANZÁ V, NAVARRETE M, TRIGUEIROS M, FERRÁNDIZ C (2006) Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *Journal of Experimental Botany* (57):3457-3469
- BAVRINA TV, MILYAEVA EL, MACHÁCKOVÁ I, PUSTOVOITOVA TN, GURKO NA, KASUMOVA IV, ZHDANOVA NE (2002) Effect of phytohormone biosynthesis genes (IPT and *iaaM* + *iaaH*) on the sexual reproduction of transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Plant Physiology* (49):484-491.
- BELL J & HICKS G. (1976). Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. *Planta* (131):187-200
- BENKOVÁ E, MICHNIEWICZ M, SAUER M, TEICHMANN T, SEIFERTOVÁ D, JÜRGEN G, FRIML J (2003) Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Modulo for Plant Organ Formation *Cell* 115(5):591-602
- BRITO MS (2010) Caracterização do gene NtSPICE1, um putativo inibidor da expansão celular, expresso nos órgãos reprodutivos de *Nicotiana tabacum*. Tese de doutorado. Departamento de Genética – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP, Brasil.

- CARABELLI M, POSSENTI M, SESSA G, CIOLFI A, SASSI M, MORELLI G, RUBERTI I. (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* (21):1863–1868
- CHENG Y, DAI X, ZHAO Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* (20):1790–1799
- CHEN D & ZHAO J (2008) Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum*. *Physiologia Plantarum*. (134):202-215.
- CORNISH, E. C.; PETTITT, J. M.; BONING, I.; CLARKE, A. E. (1988). Molecular aspects of fertilization in flowering plants. *Ann. Rev. Cell Biol.* (4):209-228
- DEPAOLI HC, BRITO MS, QUIAPIM AC, TEIXEIRA SP, GOLDMAN GH, DORNELAS MC, GOLDMAN MHS (2011) Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that control upper pistil development. *New Phytologist* (190):882–895
- DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* (435):441–445
- DINNENY JR, WEIGEL D, YANOFSKY MF (2006) *NUBBIN* and *JAGGED* define stamen and carpel shape in *Arabidopsis* *Development* (133):1645-1655.
- ELLIOT RC, BETZNER AS, HUTTNER E, OAKES MP, TUCKER WQJ, GERENTES D, PEREZ P, SMYTHA DR (1996) *AINTEGUMENTA*, an *APETALA P*-like Gene of *Arabidopsis* with Pleiotropic Roles in Ovule Development and Floral Organ Growth *The Plant Cell*, (8):155-168.
- ESAU, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*. Edgard Blucher Ltda., New York.
- ESMON CA, TINSLEY AG, LJUNG K, SANDBERG G, HEARNE LB, LISCUM E (2006) A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *PNAS* (103):236–241

- FAHLGREN N, MONTGOMERY TA, HOWELL MD, ALLEN E, DVORAK SK, ALEXANDER AL, CARRINGTON JC. (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 16(9):939-44
- FRANKS RG, WANG C, LEVIN JZ, LIU Z (2002) SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* (129):253-263
- FRIML, J., VIETEN, A., SAUER, M., WEIJERS, D., SCHWARZ, H., HAMANN, T., OFFRINGA, R., AND JÜRGENS, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* (426):147–153
- FU X & HARBERD NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellins response. *Nature.* (421):740-743
- GASSER, C.S. & ROBINSON-BEERS, K. (1993) Pistil development. *Plant Cell* (5): 1231-1239
- GILLASPY G., BEN-DAVID H, GRUISSEM W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* (5):1439-1451
- GOLDMAN, MH, GOLDBERG, RB, MARIANI, C (1994) Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.* 1;13(13):2976-84
- GRAY, W.M., KEPINSKI, S., ROUSE, D., LEYSER, O., AND ESTELLE, M. (2001). Auxin regulates SCF TIR1-dependent degradation of Aux/IAA proteins. *Nature* 414, 271–276
- GUILFOYLE, TJ & HAGEN, G (2007). Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* (10):453–460
- GUSMÁN P & ECKER JR (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify Ethylene-related mutants. *The Plant Cell* (2):513-523

- GUSTAFSON, F. (1939). Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. *Am. J. Bot.* (26):189-194
- HAGEN G, & GUILFOYLE TJ. (1985). Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol Cell Biol* (5):1197-1203
- HAKE S, SMITH HM, HOLTAN H, MAGNANI E, MELE G, RAMIREZ J (2004) The role of knox genes in plant development. *Annual Review of Cell Development Biology* (20):125–151
- HANSEN H & GROSSMANN KLAUS (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* (124):1437-1448
- HARDTKE CS & BERLETH T (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* (17):1405–1411
- HARPER RM., STOWE-EVANS EL, LUESSE DR., MUTO H, TATEMATSU K, WATAHIKI MK, YAMAMOTO K, AND LISCUM E (2000) The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial Arabidopsis tissue. *Plant Cell* (12):757–770
- HEDDEN P (2003) The green revolution genes. *Trends in Genetics.* (19):5-9.
- HEISLER MGB, ATKINSON A, BYLSTRA YH, WALSH R, SMYTH DR (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein *Development* (128):1089-1098
- HIRSCH S & OLDROYD GED (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signaling & Behavior* (4):698-700
- HOLLAND JJ, ROBERTS D, LISCUM E (2009). Understanding phototropism: from Darwin to today. *Journal of Experimental Botany* 60(7):1969-1978

- HONMA T & GOTO K (2001) Complexes of MADS box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* (409):525–529
- JACOBS WP (1979). *Plant hormones and plant development*. Cambridge University Press.
- JALLAIS Y & CHORY J (2010) Unraveling the paradoxes of hormone signaling integration. *Nature Structural and Molecular Biology* (17):642-645
- JASINSKI S, PIAZZA P, CRAFT J, HAY A, WOOLLEY L, RIEU I, PHILLIPS A, HEDDEN P, TSIAANTIS M. 2005. KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by co-ordinate regulation of cytokinin and gibberellins activities. *Current Biology* (15):1560–1565
- KANDASAMY, M. K.; KRISTEN, U. 1987. Developmental aspects of ultrastructure histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana sylvestris*. *Ann. Bot.* (60): 427-437
- KANDASAMY, M. K.; DWYER, K. G.; PAOLILLO, D. J.; DONEY, R. C.; NASRALLAH, J. B.; NASRALLAH, M. E. (1990). *Brassica* S-proteins accumulate in the intercellular matrix along the path of pollen tubes in transgenic tobacco. *Plant Cell* (2):39-49
- KARIMI M, BLEYS A, VANDERHAEGHEN R, HILSON P (2007) Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology* (145):1183-1191
- KEY JK. 1969. Hormones and nucleic acid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* (20): 449
- KLEE HJ, HORSCH, RB, HINCHEE MA, HEIN MB, HOFFMANN NL. (1987) The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev.* (1):86-96
- KOLTUNOW AM, TRUETTNER J, COX KH, WALLROTH M, GOLDBERG RB. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* (2):1201-1224

- KOWALCZYK M & SANDBERG G (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* (127):1845–1853
- KUUSK S, SOHLBERG JJ, EKLUND DM, SUNDBERG E. (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J* 47:99–111
- LANDY, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Sitespecific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913-949
- LASKOWSKI M, WILLIAMS M, NUSBAUM H, SUSSEX I (1995) Formation of lateral root meristem is a two-stage process. *Development* (121):3303–3310
- LAU S, DE SMET I, KOLB M, MEINHARDT H, JÜRGENS G. (2011). Auxin triggers a genetic switch. *Nature Cell Biol* (13):611-5
- LEYSER O (2005) The fall and rise of apical dominance *Curr Opin Genet Dev* 15(4):468-71
- LI J, DAI X, ZHAO Y (2006) A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140(3):899-908
- LIN Z, ZHONG S, GRIERSON D (2009) Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* (12):3011-36
- LINSKENS, H. F. (1983). Pollination processes: understanding fertilization and limits to hybridization. In *Strategies of Plant Reproduction*, W. J. Meudt, ed. (Granada: Beltville Symposia in Agricultural Research) (6):35-40
- LISCUM E & BRIGGS WR (1995) Mutations in the *NPH1* Locus of *Arabidopsis* Disrupt the Perception of Phototropic Stimuli *The Plant Cell*, (7):473-485
- LIU PP, MONTGOMERY TA, FAHLGREN N, KASSCHAU KD, NONOGAKI H, CARRINGTON JC (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by

- microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages *The Plant Journal* (52):133–146
- LIU Z, FRANKS RG, KLINK VP (2001) Regulation of Gynoecium Marginal Tissue Formation by *LEUNIG* and *AINTEGUMENTA*. *The Plant Cell* (12):1879–1891
- MALLORY AC, BARTEL DP, BARTEL B (2005) MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell* (17):1360–1375
- MASHIGUCHI K, TANAKA K, SAKAI T, SUGAWARA S, KAWAIDE H, NATSUME M, HANADA A, YAENO T, SHIRASU K, YAO H, MCSTEEN P, ZHAO Y, HAYASHI K, KAMIYA Y, KASAHARA H (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis *PNAS* (45):18512-7
- MATZKE AJM & MATZKE MA (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes.
- MCCLUNG CR (2011) The Genetics of Plant Clocks *Advances in Genetics*, (74): 105-139
- MOLESINI, B. ROTINO, G.L. SPENA, A. PANDOLFINI T. (2009). Expression profile analysis of early fruit development in *iaaM*-parthenocarpic tomato plants. *BMC Res Notes*. (2): 143
- MOON J & HAKE S (2011) How a leaf gets its shape *Current Opinion in Plant Biology* (14):24–30
- MURASHIGE, T.; & SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* (15): 473-497

- NEMHAUSER JL, FELDMAN LJ, ZAMBRYSKI PC. (2000). Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* (127):3877–3888
- NI DA, YU XH, WANG LJ, XU ZH. (2002). Aberrant development of pollen in transgenic tobacco expressing bacterial *iaaM* gene driven by pollen- and tapetum-specific promoters. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* (35): 1-6
- NOLE-WILSON S & KRIZEK BA (2006) AINTEGUMENTA Contributes to Organ Polarity and Regulates Growth of Lateral Organs in Combination with YABBY Genes. *Plant Physiology* (141):977–987
- OKADA K, UEDA J, KOMAKI M, BELL C, SHIMURA Y (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*, (3):677-684
- OKUSHIMA Y, OVERVOORDE PJ, ARIMA K, ALONSO JM, CHAN A, CHANG C, ECKER JR, HUGHES B, LUI B, NGUYEN D, ONODERA C, QUACH H, SMITH A, YU G, THEOLOGIS A (2005) Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and Overlapping Functions of ARF7 and ARF19 *Plant Cell* (17):444–463
- PANDOLFINI T (2009) Seedless Fruit Production by Hormonal Regulation of Fruit Set. *Nutrients* 2009, (2):168-177
- SCHRUFF MC, SPIELMAN M, TIWARI S, ADAMS S, FENBY N, SCOTT RJ (2005) The auxin response factor 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signaling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* (133): 251-261
- PEKKER I, ALVAREZ JP, ESHED Y (2005) Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* (17):2899-2910

- PELAZ S, TAPIA-LOPEZ R, ALVAREZ-BUYLLA ER, YANOFSKY MF. (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology* (11):182–184
- PENNAZIO S. (2002). The discovery of the chemical nature of the plant hormone auxin. *Riv Biol.* (95): 289-308
- PEFAFFL MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): 45
- PFLUGER J & ZAMBRYSKI P (2004) The role of SEUSS in auxin response and florum patterning. *Development* (19):4697-707
- PRIGGE MJ, OTSUGA D, ALONSO JM, ECKER JR, DREWS GN, CLARK SE (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* (17):61–76
- QUIAPIM AC, BRITO MS, BERNARDES LA, DASILVA I, MALAVAZI I, DEPAOLI HC, MOLFETTA-MACHADO JB, GIULIATTI S, GOLDMAN GH, GOLDMAN MH. (2009). Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. *Plant Physiol.* (149):1211-1230
- RAVEN P, EVERT RF, EICHHORN SE (2007) *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan
- REINHARDT, D., PESCE, E.-R., STIEGER, P., MANDEL, T., BALTENSBERGER, K., BENNETT, M., TRAAS, J., FRIML, J., AND KUHLEMEIER, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* (426), 255–260
- REMINGTON DL, VISION TJ, GUILFOYLE TJ, REED JW (2004) Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiol* (135): 1738–1752

- ROTINO GL, PERRI E, ZOTINNI M, SOMMER H, SPENA A. (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology*. (15):1398-1401
- SCHRUFF MC, SPIELMAN M, TIWARI S, ADAMS S, FENBY N, SCOTT RJ (2005) The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs *Development* (133):251-261
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *PNAS* (74):5463-5467
- SESSIONS RA & ZAMBRYSKI PC (1995) *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* (121):1519-1532
- SETIADY YY, SEKINE M, HARIGUSHI N, YAMAMOTO T, KOUCHI H, SHINMYO A (1995) Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay. *The Plant Journal* 8(6):949-957
- SILBERGER J, SKOOG F. (1953). Changes induced by indole-acetic acid in nucleic acid content and growth of tobacco pith tissue. *Science* (118):443-444
- SITBON F, SUNDBERG B, OLSSON O, SANDBERG G (1991) Free and Conjugated Indoleacetic Acid (IAA) Contents in Transgenic Tobacco Plants Expressing the *iaaM* and *iaaH* IAA Biosynthesis Genes from *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* (95):480-485
- SOHLBERG JJ, MYRENA M, KUUSK S, LAGERCRANTZ U, KOWALCZYK M, SANDBERG G, SUNDBERG E (2006) STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium *The Plant Journal* (47):112-123
- STALDAL V, SOHLBERG JJ, EKLUND DM, LJUNG K, SUNDBERG E (2008) Auxin can act independently of CRC, LUG, SEU, SPT and STY1 in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *New Phytologist* (180):798-808

- STALDAL V & SUNDBERG E (2009) The role of auxin in style development and apical-basal patterning of the *Arabidopsis thaliana* gynoecium *Plant Signaling & Behavior* (4):83-85
- STEPHENSON AG, DEVLIN B, HORTON JB. (1988) The effects of seed number and prior fruit dominance on the pattern of fruit production in *Cucurbita pepo* (Zucchini squash). *Annals of Botany* (62):653-661
- STEINMETZ A, BALTZ R, DOMON C, DUDAREVA N, EVRARD JL, KRAUTER R. (1992). Gametophytic and sporophytic gene expression in *Helianthus annuus* L. In: *Reproductive Biology and Plant Breeding*, Y. Dattee, C. Dumas and A. Gallais, eds. (Berlin: Springer-Verlag) 59-68
- SZEMENYEI H, HANNON M, LONG JA. (2008) Topless mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* (319): 1384–1386
- TABATA R, IKEZAKI M , FUJIBE T, AIDA M , TIAN C, UENO Y, YAMAMOTO KT, MACHIDA Y, NAKAMURA K, ISHIGURO S (2010) *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 Regulate Jasmonic Acid Biosynthesis and Floral Organ Development via Repression of Class 1 KNOX Genes *Plant Cell Physiol.* 51(1): 164–175
- TANAKA H, DHONUKSHE P, BREWER PB, FRIML J (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell. Mol. Life Sci.* (63): 2738–2754
- TAIZ L, ZEIGER E. (2002). *Plant Physiology* 3rd ed. Sinauer Associates
- TAO Y, FERRER JL, LJUNG K, POJER F, HONG F, LONG JA, LI L, MORENO JE, BOWMAN ME, IVANS LJ, CHENG Y, LIM J, ZHAO Y, BALLARE CL, SANDBERG G, NOEL JP, CHORY J (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* (133):164–176

- TASHIRO S, TIAN C, WATAHIKI MK, YAMAMOTO KT (2009) Changes in growth kinetics of stamen filaments cause inefficient pollination in *massugu2*, an auxin insensitive, dominant mutant of *Arabidopsis thaliana* *Physiologia Plantarum* (137):175–187
- TATEMATSU K, KUMAGAI S, MUTO H, SATO A, WATAHIKI MK, HARPER RM, LISCUM E, YAMAMOTO KT (2004) MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell* (16):379–393
- THEOLOGIS A. (1986). Rapid gene regulation by auxin. *Ann Rev Plant Physiol* (37): 407–438.
- THOMAS S G & HEDDEN P (2006) Gibberellin metabolism and signal transduction. In *Plant Hormone Signaling*. Hedden, P. and Thomas, S. G. (eds), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 147–184
- TIWARI SB, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *The Plant Cell* (16): 533-543.
- TRIGUEROS M, NAVARRETE-GOMEZ M, SATO S, CHRISTENSEN SK, PELAZ S WEIGEL D, YANOFSKY MF, FERRANDIZ C (2009) The NGATHA Genes Direct Style Development in the Arabidopsis Gynoecium. *The Plant Cell* (21):1394–1409
- TROMAS A & PERROT-RECHENMANN C (2010) Recent progress in auxin biology. *C.R.Biol.* 333(4):297-306
- TYLER L, THOMAS SG, HU J DILL A, ALONSO JM, ECKER JR, SUN T (2004) DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *Plant Physiology* (135):1008-1019

- ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (1997) Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements Plant Cell (9):1963-1971
- VANNESTE S. & FRIML J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. Cell 136(6):1005-1026
- VON GOETHE JW: Versuch die metamorphose der pflanzen zu erklären. Gotha, Germany: C. W. Ettinger; 1790
- WENZEL CL, SCHUETZ M, YU Q, MATTSSON J. (2007). Dynamics of *MONOPTEROS* and *PIN-FORMED1* expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal (49):387–98
- WOODWARD AW & BARTEL B (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction Annals of Botany (95):707–735
- YUKAWA M, TSUDZUKI T, SUGIURA M (2006) The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. Mol Genet Genomics 275(4):367-73
- ZENSER, N., ELLSMORE, A., LEASURE, C., CALLIS, J. (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(20):11795-11800
- ZHAO Y (2010) Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development Annu. Rev. Plant Biol. 2010. (61):49–64