**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Caracterização de um novo gene da família F-box expresso no pistilo de
Nicotiana tabacum L.**

Samantha Vieira Abbad

**Ribeirão Preto
2012**

SAMANTHA VIEIRA ABBAD

**Caracterização de um novo gene da família F-box expresso no pistilo de
Nicotiana tabacum L.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética 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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Ribeirão Preto
Junho - 2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Abbad, Samantha Vieira

Caracterização de um novo gene da família F-box expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L." / Samantha Vieira Abbad – Ribeirão Preto, 2012.

139 p. 50 il.

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

1. F-box. 2. Subfamília Kelch. 3. Ubiquitinação. 4. Complexo SCF. 5. Estigma/estilete. 6. Plantas transgênicas. 7. Duplo-híbrido. 8. Localização subcelular. 9. Proliferação celular.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À Prof. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, pela oportunidade oferecida, confiança, apoio e amizade. Obrigada pela orientação, por estar sempre presente e pelos ensinamentos passados. A você, toda a minha gratidão.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela oportunidade e por todo o suporte oferecido.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela utilização de sua estrutura e pelo apoio oferecido.

À FAPESP, agradeço pela bolsa concedida (processo nº 2010/04920-9), que permitiu o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

À CAPES, pela bolsa concedida nos seis primeiros meses de trabalho.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP por todo o suporte financeiro oferecido para o desenvolvimento da pesquisa em nosso laboratório.

À FAEPA, pelo suporte financeiro oferecido para participação em eventos científicos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, FCFRP-USP, pela utilização de sua estrutura e recursos e pelo apoio.

À Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, do Departamento de Biologia, FFCLRP-USP, pela confiança para utilização de sua estrutura.

Ao Prof. Dr. Roy Edward Larson, do Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP, pela utilização do microscópio confocal Leica TCS SP5.

Ao Prof. Dr. Max Cardoso Langer, do Departamento de Biologia, FFCLRP-USP, pelo empréstimo de máquina fotográfica utilizada para aquisição de algumas imagens deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, do Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP, por toda a ajuda, informações e conselhos para a realização dos experimentos de expressão transiente. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, da ESALQ-USP, pela contribuição e sugestões dadas a partir de observações de fotos das plantas transgênicas de silenciamento obtidas.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez Huaman, do Departamento de Biologia, FFCLRP-USP, pela ajuda e sugestões dadas sobre o fenótipo observado nas plantas transgênicas geradas.

À Dra. Andréa Carla Quiapim, técnica do laboratório e nosso braço direito. Obrigada por toda contribuição e pela amizade.

À Dra. Fernanda Andrade Silva Torres, por toda a contribuição, principalmente nos experimentos de qRT-PCR, e pela amizade.

À Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza, por toda ajuda, companheirismo, pela amizade e pela “adulação” de todos os dias.

Ao Dr. Douglas Dalle Luche, por todo o ensinamento passado, toda ajuda e amizade.

Ao Msc. Edward José Strini, pela exaustiva colaboração, principalmente nos experimentos de duplo-híbrido, pela amizade e pelas conversas diárias. Muito obrigada.

À Msc. Marcella de Francisco Amorim, pela ajuda, pelo companheirismo em todas as viagens e pela amizade.

Ao Luis Antônio Alves de Toledo Filho, que, assim como o nome, tem um coração enorme. Meu amigo, obrigada por toda ajuda, por me guiar em muitas situações, pelos ensinamentos, pelo companheirismo na vida noturna no laboratório e principalmente pela amizade.

À Greice Lubini, minha “irmãzinha do lab”. Muito obrigada pela convivência, pela ajuda, companheirismo na estufa, pelas risadas e por todos os momentos que passamos juntas. Agradeço por ter a sua amizade.

À Viviane Cossalter, por toda a contribuição, pelo solidarismo, pelas reuniões em sua casa e pela amizade.

Aos amigos do laboratório Ian, Lígia, Michael, Nilton e Tamiris, por toda ajuda, convívio e amizade.

Ao técnico Paulo Rosa Júnior, pela ajuda e pela valiosa amizade.

À técnica Marcela, do laboratório do Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP), por toda a ajuda.

À técnica Elizabete Rosa Milani, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, FMRP-USP, pela ajuda na utilização do microscópio confocal.

Ao meu pai, que sempre apoiou minha carreira acadêmica e por ser o grande responsável por tudo isso.

À minha mãe, por todo apoio, conselhos, companheirismo e amor.

Aos meus irmãos Suellen, Sophia e Lucas, alegrias da minha vida.

Ao Tiago, meu companheiro e amigo, por toda ajuda, pelos incansáveis finais de semana me acompanhando até o laboratório, por sempre me apoiar, pela força, carinho, atenção e por sempre me fazer seguir em frente. Nego, muito obrigada.

A toda a minha família que sempre me apoiou.

À Kátia Aleixo e ao Pedro Godoy, responsáveis pela aquisição de algumas fotos deste trabalho.

Aos amigos Ariany, Beatriz, Bruna, Claudinéia, Gabriel, Kátia, Letícia, Luana, Natália, Jéssica, Lívia e Daniel, pelo convívio e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A espécie <i>Nicotiana tabacum</i> L.	3
2.2 Visão geral, estrutural e funcional da flor e do pistilo	4
2.3 As proteínas F-box.....	6
2.4 Ubiquitinação de proteínas.....	7
2.5 Proteínas F-box descritas em plantas	10
2.5.1 Proteínas F-box envolvidas com a reprodução	13
2.6 Interação entre proteínas	14
2.6.1 O sistema de duplo-híbrido.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Cultivo das plantas <i>Nicotiana tabacum</i> e <i>Nicotiana benthamiana</i>	18
4.2 Preparo de células DH10B eletrocompetentes (SAMBROOCK <i>et al.</i> , 1989)	18
4.3 Transformação de bactérias por eletroporação	19
4.4 Mini-preparação de DNA plasmidial	19
4.4.1 Método da lisozima	20
4.4.2 Extração com Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (<i>Thermo Scientific</i>)	20
4.5 Digestões com enzimas de restrição	21
4.6 Eletroforese em gel de agarose	21
4.7 Purificação de fragmentos de DNA imersos em gel de agarose	22
4.8 Quantificação dos ácidos nucléicos.....	23
4.9 Reações de sequenciamento	23
4.10 Determinação da expressão gênica: RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).....	25
4.10.1 Desenho dos <i>primers</i>	25
4.10.2 Coleta de material vegetal	26
4.10.3 Extração de RNA.....	27

4.10.4 Tratamento com DNase	27
4.10.5 Detecção de contaminação com DNA genômico	28
4.10.6 Reação com a transcriptase reversa	29
4.10.7 Reações de qRT-PCR e análise dos resultados	29
4.11 Anotação manual dos clones identificados no TOBEST	30
4.12 Montagem e análise <i>in silico</i> da CDS do gene selecionado.....	30
4.13 Amplificação da CDS de S/S_F-box.....	31
4.14 Clonagem de S/S_F-box no vetor pCR®2.1-TOPO®	32
4.15 Obtenção das construções de superexpressão, RNAi e em fusão com GFP	33
4.15.1 Inserção dos sítios de recombinação <i>attB</i> para entrada no sistema Gateway	34
4.15.2 Recombinação dos fragmentos gerados com o vetor de entrada: Reações BP	36
4.15.3 Recombinação do vetor de entrada com o vetor de destino: Reações LR	37
4.16 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
4.16.1 Preparo de agrobactérias eletrocompetentes.....	41
4.16.2 Eletroporação de <i>Agrobacterium</i>	41
4.16.3 Extração de DNA plasmidial de <i>Agrobacterium</i>	42
4.16.4 Seleção das colônias positivas: checagem por PCR	42
4.17 Transformação de plantas.....	43
4.17.1 Obtenção de <i>N. tabacum</i> em condições estéreis	43
4.17.2 Obtenção dos transgênicos estáveis de superexpressão e RNAi	44
4.18 Extração de DNA genômico de folhas	45
4.19 Checagem dos transgênicos por reações de PCR.....	46
4.20 Polinizações controladas.....	47
4.21 Expressão transiente em folhas	47
4.21.1 Infiltração de folhas de <i>N. tabacum</i> e <i>N. benthamiana</i>	47
4.21.2 Análises no microscópio confocal	48
4.22 Ensaio de Duplo-híbrido	48
4.22.1 Clonagem da CDS de S/S_F-box (isca) no vetor pDEST32	49
4.22.2 Preparação de células de levedura competentes	51
4.22.3 Transformação de leveduras.....	52
4.22.4 Teste de auto-ativação	52
4.22.5 <i>Screening</i> da biblioteca	53
4.22.6 Análise do fenótipo dos transformantes para os genes repórteres	54
4.22.7 Extração de DNA plasmidial de leveduras.....	55

4.22.8 Identificação das presas	55
4.22.9 Re-transformação das leveduras com pDEST22-presas	56
4.23 Meios de cultura	56
4.24 Antibióticos utilizados	57
5. RESULTADOS	59
5.1 Identificação de genes F-box expressos no pistilo de <i>Nicotiana tabacum</i>	59
5.2 Determinação da expressão dos genes correspondentes aos clones selecionados	60
5.3 Expressão do gene referente ao clone 085H05 durante o desenvolvimento floral	62
5.4 Obtenção da CDS do gene correspondente ao clone 085H05	64
5.5 Amplificação da CDS do gene correspondente ao clone 085H05	64
5.6 Análises <i>in silico</i> da sequência de S/S_F-box	66
5.7 Checagem das construções: superexpressão, RNAi e em fusão com GFP	67
5.7.1 Obtenção dos fragmentos desejados	68
5.7.2 Recombinação dos fragmentos com o vetor de entrada	69
5.7.3 Recombinação dos vetores de entrada com os vetores de destino	72
5.8 Checagem das colônias de <i>Agrobacterium</i> contendo os vetores de expressão	74
5.9 Obtenção das plantas transgênicas estáveis: superexpressão e RNAi	76
5.10 Confirmação da transgenia das plantas obtidas	77
5.11 As plantas de RNAi	78
5.11.1 Análise da parte vegetativa	78
5.11.2 Análise da flor	80
5.11.3 Avaliação do nível de expressão de S/S_F-box nos transgênicos	82
5.11.4 Polinizações controladas	84
5.12 As plantas de superexpressão	84
5.12.1 Análise da parte vegetativa	84
5.12.2 Análise da flor	85
5.12.3 Avaliação do nível de expressão de S/S_F-box nos transgênicos	90
5.12.4 Polinizações controladas	91
5.13 S/S_F-box não é regulado, a nível transcricional, por auxina	92
5.14 Análise da localização subcelular da proteína de S/S_F-box	93
5.15 Busca por possíveis parceiros de interação de S/S_F-box	97
5.15.1 Clonagem da CDS de S/S_F-box no vetor pDEST32: obtenção da isca	97
5.15.2 Teste de auto-ativação da isca	98
5.15.3 <i>Screening</i> da biblioteca de duplo-híbrido	99

5.15.4 Transferência de pDEST22-presas para bactérias	100
5.15.5 Identificação das presas	102
6. DISCUSSÃO	103
6.1 S/S_F-box é importante para o desenvolvimento do pistilo.....	103
6.2 S/S_F-box é um componente do complexo SCF	105
6.3 O complexo SCF ^{S/S_F-box} reconhece os fatores de transcrição VOZ1 e SIP1.....	106
6.4 S/S_F-box e a dominância apical.....	107
7. CONCLUSÕES	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD (Activation Domain – domínio de ativação)

Ade (adenina)

CDS (Coding sequence – sequência codificadora)

DBD (DNA Binding Domain – domínio de ligação ao DNA)

ESTs (etiquetas de sequências expressas)

His (histidina)

Leu (leucina)

MS (Murashige e Skoog medium)

SC (Synthetic Complete medium)

SCF (SKP1, cullin, F-box)

SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1)

SSH (Suppression Subtractive Hybridization)

S/S_F-box (Stigma/Style_F-box – F-box do estigma/estilete)

TOBEST (TOBacco ESTs)

Trp (triptofano)

RESUMO

O estudo da reprodução sexual de plantas é uma área de crescente interesse devido à importância de sementes e frutos em nossa dieta diária, ambos resultantes do desenvolvimento de partes do pistilo, após fertilização. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um novo gene F-box expresso no pistilo de *N. tabacum*. Proteínas F-box atuam na interação proteína-proteína, geralmente direcionando proteínas alvo para degradação pela via ubiquitina-proteassomo. Foram identificados cinco genes de função desconhecida que codificam putativas proteínas F-box, em duas bibliotecas de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum* (DEPAOLI, 2006; QUIAPIM *et al.*, 2009) previamente construídas em nosso laboratório. A expressão de cada um destes genes foi analisada nos diferentes órgãos de *N. tabacum*, por qRT-PCR. O clone 085H05 da biblioteca TOBEST (QUIAPIM *et al.*, 2009) apresentou expressão preferencial nos órgãos florais. Este clone foi selecionado para uma caracterização funcional mais detalhada. O padrão de expressão deste gene foi avaliado no estigma/estilete durante os 12 estádios do desenvolvimento floral de *N. tabacum* (KOLTUNOW *et al.*, 1990). O resultado revelou que sua expressão é regulada durante o desenvolvimento, atingindo o maior nível de expressão na antese (estádio 12). Isto sugere que este gene esteja envolvido no desenvolvimento do estigma/estilete. A sequência codificadora do gene correspondente a 085H05 foi determinada e, após amplificação e clonagem, este gene foi denominado S/S_F-box (*Stigma/Style_F-box*). Para compreender a função da proteína de S/S_F-box, plantas transgênicas de superexpressão e de silenciamento (por RNAi) deste gene foram geradas. As plantas de RNAi apresentaram o estilete e o ovário reduzidos quando comparados ao controle SR1. Em concordância, as plantas de superexpressão produziram flores com o estilete mais alongado do que o controle, além do estigma e do ovário de maior tamanho. Altas concentrações de exudato foram observadas na superfície do estigma destas plantas, a partir do estágio 7 tardio. No controle SR1, concentrações equivalentes apenas são observadas nos estádios finais do desenvolvimento. Os fenótipos observados nas plantas transgênicas sugerem que a proteína codificada por S/S_F-box esteja envolvida com o desenvolvimento do pistilo e com o controle do tamanho deste órgão. Adicionalmente, as plantas de RNAi apresentaram o fenótipo de perda da dominância apical.

Os níveis de expressão do gene *S/S_F-box* foram avaliados em plantas que tiveram aumento na produção de auxina no estigma/estilete (plantas *STIG1_{prom}::iaaM*), revelando que este gene não é regulado, a nível transcricional, por este hormônio. Experimentos de localização subcelular, realizados por expressão transitória da sequência de *S/S_F-box* fusionada a sequência dos genes repórteres GFP e YFP (*S/S_F-box::GFP*; *S/S_F-box::YFP*), indicaram que a proteína *S/S_F-box* está localizada no citoplasma e no núcleo celular. Adicionalmente, foi realizado o *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigma/estilete, construída no sistema de duplo-híbrido, para investigar proteínas candidatas a interagirem com a proteína de *S/S_F-box*. Os resultados indicaram interação da proteína *S/S_F-box* com SKP1, confirmando a participação de *S/S_F-box* no complexo SCF, que promove a degradação de proteínas alvo pela via ubiquitina-proteassomo. Duas proteínas candidatas a alvo foram identificadas: os fatores de transcrição VOZ1 e SIP1, ambos envolvidos com a proliferação celular. Em suma, é possível propor que a proteína codificada por *S/S_F-box* tenha função relacionada à proliferação celular e ao desenvolvimento dos órgãos vegetais, incluindo o pistilo.

Palavras-chave: 1. F-box. 2. Subfamília Kelch. 3. Ubiquitinação. 4. Complexo SCF. 5. Estigma/estilete. 6. Plantas transgênicas. 7. Duplo-híbrido. 8. Localização subcelular. 9. Proliferação celular.

ABSTRACT

The study of sexual reproduction in plants is an area of increasing interest due to the importance of seeds and fruits in our daily diet, both resulting from the development of parts of the pistil, after fertilization. The aim of this study was to characterize a new F-box gene expressed in the *N. tabacum* pistil. F-box proteins act in protein-protein interactions, generally directing target proteins to degradation via ubiquitin-proteasome. Five genes of unknown function coding for putative F-box proteins were identified at two cDNAs libraries from *N. tabacum* stigmas/styles (DEPAOLI, 2006; QUIAPIM *et al.*, 2009), previously constructed in our laboratory. The expression of each of these genes was analyzed in the different *N. tabacum* organs, by qRT-PCR. The 085H05 clone from the TOBEST library (QUIAPIM *et al.*, 2009) showed preferential expression in floral organs. This clone was selected for a more detailed functional characterization. The expression pattern of this gene was evaluated in the stigma/style during the 12 *N. tabacum* flower developmental stages (KOLTUNOW *et al.*, 1990). The result revealed that its expression is regulated during development, reaching the highest expression level at anthesis (stage 12). It suggests that this gene is involved in the stigma/style development. The coding sequence of the gene corresponding to 085H05 was determined and, after amplification and cloning, the gene was named *S/S_F-box (Stigma/Style_F-box)*. To understand the *S/S_F-box* protein function, transgenic plants either overexpressing or silencing (by RNAi) the *S/S_F-box* gene were generated. The RNAi plants showed reduced style and ovary when compared to the control SR1. In accordance, the overexpressing plants produced flowers with a style more elongated than the control, besides an ovary and a stigma of larger size. High concentrations of exudate were observed on the stigma surface of these plants, since the later stage 7. In the control SR1, equivalent concentrations are only observed at the later stages of development. The phenotypes observed in the transgenic plants suggest that the protein encoded by *S/S_F-box* is involved with pistil development and with the control of pistil size. Additionally, the RNAi plants showed the phenotype of loss of apical dominance.

The expression levels of the *S/S_F-box* gene were evaluated in plants with increased auxin production in the stigma/style (plants STIG1_{prom::iaaM}), showing that this gene is not transcriptionally regulated by this hormone. Subcellular localization experiments, carried out by transient expression of the *S/S_F-box* sequence fused to the reporter genes GFP and YFP

(S/S_F-box::GFP; S/S_F-box::YFP), showed that the S/S_F-box protein is localized in the cytoplasm and in the nucleus. Additionally, the screening of a stigma/style cDNA library constructed on the yeast two hybrid system was performed, to investigate candidate proteins for S/S_F-box protein interaction. The results indicated interaction between S/S_F-box and the SKP1 protein, confirming the involvement of the S/S_F-box protein in the SCF complex, which promotes degradation of target proteins via ubiquitin-proteasome. Two candidates for target proteins were identified: the transcription factors VOZ1 and SIP1, both involved in cell proliferation. In summary, it is possible to propose that the protein encoded by S/S_F-box has functions related to cell proliferation and organ development, including the pistil.

Key-words: 1. F-box. 2. Kelch subfamily. 3. Ubiquitination. 4. SCF complex. 5. Stigma/style. 6. Transgenic plants. 7. Two-hybrid. 8. Subcellular localization. 9. Cell proliferation.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da reprodução sexual de plantas tem relevante importância em razão da grande dependência de frutos e sementes na alimentação diária de muitos grupos animais, inclusive na dieta humana. Nas angiospermas, o grupo mais diverso das plantas terrestres, a flor é a estrutura responsável pelo processo reprodutivo, onde ocorre a fertilização e posterior desenvolvimento de partes do pistilo em frutos e sementes.

O pistilo, órgão reprodutor feminino das angiospermas, geralmente formado por estigma, estilete e ovário, é essencial para a reprodução, apresentando as funções de formação dos gametófitos femininos dentro do ovário e discriminação dos diferentes tipos de grãos de pólen que o estigma recebe, selecionando aqueles congruentes e compatíveis com a planta (CORNISH *et al.*, 1988).

Vários genes são expressos exclusivamente ou preferencialmente nos diferentes tecidos e órgãos das plantas, sendo essa expressão muitas vezes associada à função determinante daquele tecido/órgão. É provável que muitos dos genes específicos ou preferenciais da flor estejam associados aos processos de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e da reprodução em si. No pistilo, é provável que os genes específicos ou preferenciais estejam associados a processos como desenvolvimento dos tecidos especializados e/ou interação pólen-pistilo. Dessa forma, o estudo de genes específicos ou preferenciais da flor e do pistilo auxilia na compreensão dos processos biológicos envolvidos com a reprodução, ainda não elucidados a nível molecular.

A partir de duas bibliotecas de cDNAs de estigmas/estiletes de *Nicotiana tabacum*, construídas em nosso laboratório (SSH – biblioteca subtrativa, DEPAOLI, 2006; TOBEST – *TOBacco ESTs*, QUIAPIM *et al.*, 2009), foram identificados, por análises *in silico*, genes que possivelmente codificam proteínas da família F-box. As proteínas F-box são assim denominadas por possuírem um domínio conservado, com cerca de 40-50 aminoácidos, que atua na interação proteína-proteína, denominado domínio F-box (TAIZ & ZEIGER, 2006). Proteínas F-box são exclusivas de eucariotos. Até o momento, já foram identificados genes que codificam proteínas dessa família em alguns organismos de estudo, tais como *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe* e o homem, com o genoma contendo respectivamente 33 (OU *et al.*, 2003), 18 (HERMAND, 2006) e 68 (JIN *et al.*, 2004) genes da família F-box, respectivamente. Em comparação, o número de genes dessa família

é muito maior em plantas, tendo sido identificados, até o momento, 692, 779 e 337 genes que codificam proteínas F-box em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (arroz) e *Populus trichocarpa*, respectivamente (XU *et al.*, 2009). O número expressivo dessas proteínas em plantas sugere que participem de uma quantidade considerável de importantes processos nas células vegetais, mas as funções de muitas das proteínas F-box ainda não foram definidas. Estudos prévios foram capazes de identificar proteínas F-box com papéis importantes na reprodução de plantas, envolvidas com fertilidade (XIE *et al.*, 1998), crescimento do meristema floral (SAMACH *et al.*, 1999) e desenvolvimento do pólen (GUSTI *et al.*, 2009). A identificação de novas proteínas F-box e o estudo de suas funções na flor e, mais especificamente no pistilo, contribuirão para o entendimento dos diversos processos que medeiam o sucesso da reprodução sexuada.

Em vista disso, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar um novo gene da família F-box, preferencialmente expresso nos órgãos florais de *N. tabacum*, a fim de se entender a função desse gene na flor e no pistilo e sua possível relação com o processo reprodutivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A espécie *Nicotiana tabacum* L.

Nicotiana tabacum L., herbácea pertencente à família Solanaceae (Angiospermas), é uma dicotiledônea tropical, originária da América do Sul Ocidental, provavelmente pela hibridação interespecífica de duas espécies diplóides ($2n = 2x = 24$), *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosiformis*, formando um alotetraplóide ($2n = 4x = 48$) (GOODSPEED, 1954; GRAY *et al.*, 1974). Trata-se de um modelo de estudo de plantas, amplamente utilizado, devido à facilidade de seu cultivo, inclusive *in vitro*, e à facilidade de transformação e regeneração de plantas transgênicas.

A espécie *N. tabacum* apresenta ciclo de vida de 4-5 meses (MCDANIEL, 1999). Diferentemente do modelo *Arabidopsis thaliana*, *N. tabacum* possui flores grandes, apresentando todos os principais órgãos florais facilmente identificáveis, o que facilita o estudo da reprodução sexuada em plantas. Em 1988, Goldberg analisou o desenvolvimento da flor de *N. tabacum* e o dividiu em 12 estádios, utilizando o tamanho do botão floral e da pétala como marcadores do desenvolvimento. Dois anos mais tarde, Koltunow e colaboradores descreveram morfológicamente cada um desses estádios, analisando parâmetros como desenvolvimento dos órgãos florais, cor e abertura da corola. A divisão do desenvolvimento da flor de *N. tabacum* em estádios permitiu a criação de pontos de referência para a uniformização de trabalhos feitos em diferentes laboratórios, assim como para a análise da expressão de genes importantes no desenvolvimento dos órgãos florais (KOLTUNOW *et al.*, 1990), facilitando o estudo do processo reprodutivo.

Apesar de *N. tabacum* ser um modelo para muitos estudos moleculares, o seu genoma, até o momento, não foi sequenciado. No entanto, existem bancos de dados que contêm sequências dessa espécie (sequências gênicas, sequências de cDNAs e/ou sequências ESTs - etiquetas de sequências expressas) que auxiliam esses estudos, sendo eles o SOL (*SOLanaceae Genomics Network*), o *The Gene Index* (conhecido por "DFCI" - *Dana-Farber Cancer Institute*), que contém todas as sequências do TOBEST, e também o *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

2.2 Visão geral, estrutural e funcional da flor e do pistilo

Os órgãos florais são subdivididos em estéreis e férteis. Os primeiros são as sépalas e as pétalas que formam, respectivamente, o cálice e a corola, localizados mais externamente, e com as funções de proteção do botão floral e/ou atração de polinizadores. A parte fértil da flor é formada pelos estames, parte masculina, e pelo pistilo, órgão feminino, ambos localizados mais internamente (Figura 1).

Figura 1. Flor esquemática de angiospermas (modificado de MAUSETH, 2003).

O pistilo (Figura 2), geralmente formado por estigma, estilete e ovário, é essencial na reprodução das angiospermas. Em *N. tabacum*, o estigma, do tipo úmido, é bilobado e sua superfície é formada por uma epiderme com células papilares esparsamente distribuídas (BELL & HICKS, 1976). Diferentemente das espécies de estigma seco, tal como o modelo *Arabidopsis*, as de estigma úmido produzem, na zona secretória localizada abaixo da epiderme, um exudato que recobre a superfície do estigma, essencial para a penetração do pólen e crescimento do tubo polínico (GOLDMAN *et al.*, 1994). Essa zona secretória do estigma converge no estilete, de tipo sólido, como uma região central de tecido transmissor, circundado pelo córtex parenquimatoso de suporte e pela epiderme (KANDASAMY *et al.*, 1990).

Figura 2. Representação de um pistilo maduro de *N. tabacum*, composto por estigma, estilete e ovário. Um grão de pólen e o tubo polínico em crescimento estão representados (modificado de KANDASAMY *et al.*, 1990).

Durante o processo reprodutivo, os grãos de pólen (gametófitos masculinos) são liberados das anteras e, através de mecanismos de polinização, são depositados na superfície do estigma, havendo adesão, hidratação, germinação e penetração no pistilo (LORD, 2003). Os gametófitos masculinos alcançam o tecido transmissor do estilete, que direciona o crescimento do tubo polínico até o ovário (QUIAPIM *et al.*, 2009). Adicionalmente, este tecido promove o reconhecimento espécie-específico (congruidade), assim como a competição entre os gametófitos masculinos e seleção daqueles que chegarão ao saco embrionário (gametófito feminino) (HISCOCK & ALLEN, 2008; SAGE *et al.*, 2009). O tecido transmissor do estilete apresenta, portanto, papel decisivo na determinação do genótipo dos futuros embriões e plantas (LINSKENS, 1986 apud GOLDMAN *et al.*, 1994).

Devido às funções restritas e bem definidas do estigma/estilete, é esperado que muitos dos genes ali expressos estejam associados a processos como desenvolvimento dos tecidos especializados e interação pólen-pistilo. Alguns estudos em larga escala identificaram genes preferenciais ou específicos do estigma/estilete nas espécies de estigma seco *Arabidopsis* (SWANSON *et al.*, 2005; TUNG *et al.*, 2005) e arroz (LI *et al.*, 2007). Para realizar estudos em larga escala em espécies de estigma úmido, como *N. tabacum*, foi construída, em nosso laboratório, uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos de *N. tabacum*, gerando o banco de dados TOBEST (QUIAPIM *et al.*, 2009). Adicionalmente, foram

construídas bibliotecas subtrativas por SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) (DEPAOLI, 2006) com o objetivo de identificar genes com expressão preferencial ou específica nessa estrutura. O estudo e a caracterização de novos genes expressos nos estigmas/estiletes de *N. tabacum* são importantes para o entendimento do processo reprodutivo das espécies de estigma úmido.

2.3 As proteínas F-box

Em 1994, Bai e colaboradores identificaram uma nova ciclina humana, denominada ciclina F. Dois anos mais tarde, o mesmo autor observou que esta ciclina compartilhava um domínio conservado, de 40-50 aminoácidos, com outras duas proteínas, CDC4 (*cell division cycle 4*) e SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*). Essa sequência conservada passou a ser chamada de domínio “F-box”, em referência à ciclina F descrita por Bai. A partir de então, muitos genes que codificam proteínas com o domínio F-box foram identificados em diversos organismos eucariotos e agrupados na “Família F-box”.

O domínio F-box, geralmente localizado na porção amino-terminal da proteína, atua na interação proteína-proteína (KIPREOS & PAGANO, 2000). Frequentemente, outros domínios, também necessários para interação proteína-proteína, são encontrados na parte carboxi-terminal das proteínas F-box, tais como sequências repetidas ricas em leucina (LRRs), domínios do tipo *kelch* e repetições WD40 (KURODA *et al.*, 2002). De acordo com o domínio presente na região carboxi-terminal da sequência protéica, as proteínas F-box podem ser divididas em subfamílias. Em leveduras, *D. melanogaster* e nos mamíferos, as subfamílias LRRs e WD40 são as predominantes (SKAAR *et al.*, 2009a, 2009b). Em *Arabidopsis*, a subfamília FBA (*F-box associated domains*) e a subfamília Kelch são as que apresentam o maior número de representantes, com 206 e 103 membros, respectivamente, em um total de 692 proteínas F-box identificadas até o momento (XU *et al.*, 2009; SCHUMANN *et al.*, 2011).

A grande maioria das proteínas F-box já descritas faz parte de um complexo de proteínas denominado SCF (CHAE *et al.*, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2012), que atua na ubiquitinação de proteínas que são degradadas no proteassomo. No entanto, algumas proteínas F-box já foram caracterizadas como não pertencentes a este complexo, como a FOG-2 (*feminization of the germ line 2*), envolvida com a determinação do sexo de

Caenorhabditis elegans (CLIFFORD *et al.*, 2000), a RCY1 (*recycling 1*) de leveduras, envolvida com a reciclagem de uma proteína de membrana que promove a fusão de vesículas celulares com a membrana plasmática (GALAN *et al.*, 2001), e a hFBH1 (*human F-box DNA helicase 1*), uma helicase humana (KIM *et al.*, 2002).

2.4 Ubiquitinação de proteínas

Na regulação pós-traducional da expressão gênica, as proteínas de eucariotos podem sofrer uma série de modificações químicas que determinam sua atividade, localização e interação com outras proteínas (SNUSTAD & SIMMONS, 2008). Tais modificações podem ocorrer por processos de metilação, fosforilação, glicosilação, sulfatação, ubiquitinação, dentre outros.

A ubiquitinação é o processo de adição de uma ou várias moléculas da proteína ubiquitina, de 76 aminoácidos, em uma proteína alvo. A marcação pela ubiquitina se dá por três reações enzimáticas, caracterizadas por uma cascata de transferência da ubiquitina (Figura 3) (SKOWYRA *et al.*, 1997). A primeira delas envolve a enzima E1, denominada enzima ativadora, que se liga covalentemente a molécula de ubiquitina, com gasto de energia. Após ativação, a ubiquitina é transferida para a enzima E2, chamada conjugadora. Posteriormente, o complexo E2-ubiquitina se liga a enzima E3, denominada ubiquitina ligase, que reconhece e se liga a proteína alvo que será marcada com a ubiquitina. Quando E2-ubiquitina se liga a E3, a molécula de ubiquitina é transferida de E2 para o alvo (POZO & ESTELLE, 2000; KURODA *et al.*, 2002). Se a proteína alvo recebe apenas uma molécula de ubiquitina, ela é marcada para regulação de diversos processos, tais como endocitose, regulação transcricional e reparo de DNA (JESENBERGER & JENTSCH, 2002). Quando a proteína alvo é marcada com várias moléculas de ubiquitina, ela é levada para degradação no proteassomo 26S, um complexo protéico que degrada proteoliticamente as proteínas marcadas com ubiquitina em pequenos peptídeos.

Figura 3. Esquema da cascata de transferência da ubiquitina. As proteínas alvo marcadas com apenas uma molécula de ubiquitina regulam diversos processos. Já aquelas marcadas com mais de uma molécula de ubiquitina são levadas para degradação no proteassomo (modificado de JESENBERGER & JENTSCH, 2002).

A enzima E3 é a responsável pelo reconhecimento da proteína alvo. Vários tipos de enzimas E3 foram descritos nos eucariotos. Em plantas, quatro deles são conhecidos: HECT, RING, U-box e cullin-RING-ligases, sendo este último dividido em quatro subtipos, que

consistem em complexos protéicos: o complexo SCF (*SKP1*, *cullin*, *F-box*), o complexo BTB (*bric-a-brac-tramtrack-broad*), o complexo DDB (*DNA-damage-binding*) e o APC (*anaphase-promoting complex*) (VIERSTRA, 2009). Dentre as enzimas E3 já descritas, o complexo SCF é o mais conhecido, melhor caracterizado e o mais abundante em plantas (MAGORI & CITOVSKY, 2011; MALDONADO-CALDERÓN *et al.*, 2011; CAPRON *et al.*, 2012). O complexo recebeu esse nome devido as suas subunidades SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), CUL (*cullin*) e uma proteína *F-box* (TAIZ & ZEIGER, 2006; SCHUMANN *et al.*, 2011). O complexo SCF (Figura 4) ainda possui uma quarta proteína, a RBX1 (*RING-box 1*), responsável pela ligação de E2-ubiquitina ao complexo SCF.

Figura 4. Representação do complexo SCF, contendo as proteínas SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), CUL (*cullin*), F-box e RBX1 (*RING-box 1*). A figura mostra a transferência da molécula de ubiquitina da enzima E1 para a enzima E2, que se liga ao complexo E3. Posteriormente, a ubiquitina é transferida para a proteína alvo (modificado de TAIZ & ZEIGER, 2010).

O complexo SCF é caracterizado por adicionar mais de uma molécula de ubiquitina à proteína alvo (STIRNBERG *et al.*, 2007). Dessa forma, as proteínas alvo, que são reconhecidas por este complexo, são poliubiquitinadas e, por consequência, levadas para degradação no proteassomo. Como representado na Figura 4, as proteínas F-box se ligam à proteína SKP1 pelo domínio F-box. Adicionalmente, as proteínas F-box se ligam à proteína alvo pelos domínios de interação proteína-proteína, localizados na porção carboxi-terminal da proteína F-box (LRRs, *kelch*, FBA, dentre outros) (KURODA *et al.*, 2002). As proteínas F-box são, dessa forma, responsáveis pela identificação e ligação com a proteína alvo, apresentando, de forma geral, importante papel na regulação da abundância e tempo de permanência das proteínas nas células e nos tecidos (TAIZ & ZEIGER, 2006).

O genoma de *Arabidopsis* apresenta cinco genes que codificam proteínas do tipo CUL, 20 genes que codificam proteínas do tipo SKP1, chamados de genes ASK (*Arabidopsis SKP1-like genes*) (RISSEEUW *et al.*, 2003) e 692 genes que codificam proteínas da família F-box (XU *et al.*, 2009). Assim, o número de combinações possíveis para formação do complexo SCF é muito grande, justificando a predominância da enzima E3 do tipo SCF em plantas.

2.5 Proteínas F-box descritas em plantas

Apesar do elevado número de genes que codificam proteínas F-box identificados até o momento em plantas, ainda pouco se sabe sobre as funções de muitos deles. No modelo *Arabidopsis*, menos de 5% das proteínas já identificadas foram funcionalmente caracterizadas (SCHUMANN *et al.*, 2011).

A primeira proteína F-box descrita em plantas, identificada em *Arabidopsis*, foi a UFO (*unusual floral organs*), a qual é necessária para o crescimento e padrão normais do meristema floral (LEVIN & MEYEROWITZ, 1995; SAMACH *et al.*, 1999). Pesquisadores observaram que os mutantes *ufo* produziam flores sem pétalas e sem estames. Adicionalmente, mutantes *ufo* superexpressando os genes *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*), essenciais para a formação das pétalas e estames, respectivamente, foram capazes de produzir estes órgãos florais. Mutantes *ufo* superexpressando apenas *AP3* também produziram pétalas e estames, no entanto mutantes *ufo* superexpressando unicamente *PI* não produziram estes órgãos. Como o gene *PI* é regulado por *AP3*, os pesquisadores demonstraram que UFO regula a expressão do gene *AP3*. Dessa forma, propõe-se que a proteína UFO, fazendo parte do complexo SCF^{UFO}, reconhece um repressor de *AP3*, que é levado para degradação via ubiquitina-proteassomo, permitindo a expressão de *AP3* e a formação normal das pétalas e estames (SAMACH *et al.*, 1999; HEPWORTH *et al.*, 2006).

Outra proteína F-box de plantas, talvez a mais conhecida e a melhor caracterizada (MALDONADO-CALDERÓN *et al.*, 2011), é a TIR1 (*transport inhibitor response 1*), um receptor de auxina (DHARMASIRI *et al.*, 2005a; KEPINSKI & LEYSER, 2005). Quando auxina está presente na célula, os fatores de resposta à auxina (ARFs) ativam ou inibem, dependendo da proteína ARF, a expressão de genes que respondem a este hormônio. Por outro lado, proteínas Aux/IAA regulam a atividade dos ARFs, inibindo aqueles que ativam a

resposta à auxina (DHARMASIRI *et al.*, 2005a), juntamente à proteína TPL (*topless*), que atua como um co-repressor da transcrição (SANTNER & ESTELLE, 2009). Estudos revelaram que a auxina se liga diretamente à TIR1. Quando isso ocorre, há interação do complexo SCF^{TIR1} com proteínas Aux/IAA, que são poliubiquitinadas e levadas para degradação no proteassomo. Aux/IAA degradadas liberam TPL e permitem a ação das ARFs ativadoras da resposta à auxina e, em consequência, ativam a expressão de genes que respondem a este hormônio. Além de TIR1, outras proteínas F-box chamadas AFB (*auxin-signaling F-box protein*) também foram descritas como receptores de auxina, apresentando a mesma atividade de TIR1 (DHARMASIRI *et al.*, 2005b) (Figura 5-A).

A sinalização de jasmonatos também é mediada por um complexo SCF, muito semelhante ao mecanismo de ação de TIR1/AFB. O gene *COI1* (*coronatine-insensitive 1*) foi identificado em um mutante de *Arabidopsis* insensível à coronatina, uma toxina produzida por algumas bactérias, similar, em estrutura, ao metil jasmonato (BENEDETTI *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 1998). Mutantes *coi1* são deficientes em todas as respostas aos jasmonatos, incluindo o desenvolvimento dos gametófitos masculinos, produzindo grãos de pólen estéreis (XIE *et al.*, 1998; THINES *et al.*, 2007). *COI1* é uma proteína F-box que faz parte do complexo SCF^{COI1} (DEVOTO *et al.*, 2002; THINES *et al.*, 2007), que reconhece repressores de genes de resposta aos jasmonatos, denominados JAZ (*jasmonate ZIM-domain*), levando-os para degradação no proteassomo (THINES *et al.*, 2007). Proteínas JAZ atuam de forma semelhante à Aux/IAA, inibindo a atividade da proteína MYC2, um ativador da transcrição de genes de resposta aos jasmonatos. Quando moléculas de jasmonato estão presentes em quantidades elevadas nas células vegetais, há a ligação COI1-JAZ, ativada por moléculas de jasmonato conjugadas à isoleucina (JA-Ile) (SANTNER & ESTELLE, 2009). A degradação de JAZ promove a liberação de MYC2 e, em consequência, a transcrição dos genes de resposta aos jasmonatos (Figura 5-B).

Além de TIR1/AFB e COI1, outras proteínas F-box também estão envolvidas com hormônios, como EBF1 e EBF2 (*EIN3-Binding F-box protein 1 e 2*), que são essenciais para a percepção do etileno (POTUSCHAK *et al.*, 2003; BINDER *et al.*, 2007), SLY1 (*sleepy 1*) e SNE (*sneezy 1*) que degradam repressores de sinalização de giberelina (DILL *et al.*, 2004; ARIIZUMI *et al.*, 2011), EDL3 (*ED1-like protein 3*), envolvida com a sinalização do ácido abscísico (KOOPS *et al.*, 2011) e AUF (*auxin up-regulated F-box protein 1*), que regula a comunicação entre o transporte de auxina e a sinalização de citocinina durante o desenvolvimento da raiz (ZHENG *et al.*, 2011).

Figura 5. Representação dos mecanismos de ação das proteínas F-box TIR1/AFB (*transport inhibitor response 1/auxin-signaling F-box protein*) e COI1 (*coronatine-insensitive 1*), dentro das células vegetais. **A)** Os receptores de auxina TIR1/AFB fazem parte do complexo SCF^{TIR1/AFB}. Quando auxina (IAA) está presente em concentrações elevadas, ela se liga ao complexo, estabilizando a ligação TIR1/AFB-Aux/IAA, resultando na degradação de Aux/IAA. A degradação de Aux/IAA permite a liberação da proteína TPL (*topless*) e a ativação das ARFs, promovendo a transcrição dos genes de resposta à auxina. **B)** A proteína COI1 é um componente do complexo SCF^{COI1}. Quando altas concentrações de jasmonatos estão presentes nas células, ocorre a ligação COI1-JAZ, ativada por moléculas de jasmonato conjugadas à isoleucina (JA-Ile – representadas por estrelas amarelas). JAZ (*jasmonate ZIM-domain*) é levada para degradação no proteassomo, liberando MYC2 e permitindo a transcrição dos genes de resposta aos jasmonatos. Figura retirada de SANTNER & ESTELLE (2009).

Proteínas F-box também foram identificadas como reguladores do ciclo circadiano. Dentre elas, a ZTL (*zeitlupe*) regula os níveis da proteína TOC1 (*timing of crab expression 1*), uma proteína do “relógio circadiano” que controla a expressão de outras duas proteínas do relógio, CCA1 (*circadian clock associated 1*) e LHY (*late elongated hypocotyl*) (HAN *et al.*, 2004; MÁŠ *et al.*, 2004). Em plantas selvagens, os níveis de expressão de ZTL são elevados durante a noite e baixos ao amanhecer. Já a expressão de TOC1 é alta durante o dia e baixa durante a noite. Esse balanço é mantido pelo complexo SCF^{ZTL}, que reconhece e ubiquitina a proteína TOC1, marcando-a para degradação no proteassomo. Durante o dia, a quantidade de proteínas TOC1 é elevada, ativando a expressão de CCA1 e LHY. No período sem luminosidade, onde ZTL é produzida em altos níveis, a quantidade de TOC1 é baixa, não

havendo ativação das outras proteínas do relógio. Esse balanço promove o ótimo funcionamento do ciclo circadiano. Outras duas proteínas F-box, envolvidas com o ciclo circadiano, são a LKP2 (*lov kelch protein 2*), que atua no oscilador do ciclo circadiano (FUKAMATSU *et al.*, 2005) e a FKF1 (*flavin-binding, kelch repeat, F-box 1*), requerida para medição do comprimento do dia (SAWA *et al.*, 2007).

Além das funções citadas, já foram identificadas proteínas F-box envolvidas com senescência (WOO *et al.*, 2001; STIRNBERG *et al.*, 2007), respostas de defesa (KIM & DELANEY, 2002) e repostas a fatores abióticos (CALDERÓN-VILLALOBOS *et al.*, 2007).

2.5.1 Proteínas F-box envolvidas com a reprodução

Além das proteínas UFO e COI1, outras proteínas F-box relacionadas à flor e ao processo reprodutivo foram identificadas.

A proteína FBL17 é uma F-box que regula a divisão celular durante o desenvolvimento dos gametófitos masculinos. O complexo SCF^{FBL17} interage com inibidores de quinases, degradando-os e permitindo a progressão da mitose. Mutantes *fb17* em *Arabidopsis* produzem grãos de pólen com um único núcleo espermático, que fertiliza o gametófito feminino, porém não produz o endosperma. Os embriões, sem a nutrição do endosperma, são abortados, não havendo produção de sementes. Dessa forma, FBL17 é uma proteína F-box essencial para a progressão da segunda mitose durante o desenvolvimento do pólen (GUSTI *et al.*, 2009).

Recentemente, foram identificadas as proteínas F-box HWS (*hawaiian skirt*), envolvida com a separação dos órgãos reprodutivos (GONZÁLEZ-CARRANZA *et al.*, 2007), a RMF (*reduced male fertility*), que regula a degeneração do tapetum e a maturação do pólen durante o desenvolvimento da antera (KIM *et al.*, 2010), a SAF1 (*secondary wall thickening-associated F-box 1*), envolvida com o espessamento da parede secundária para deiscência das anteras (KIM *et al.*, 2011), e a SFB (*S haplotype-specific F-box protein*), essencial para a parada do crescimento do tubo polínico em reações de incompatibilidade entre o pólen e o pistilo (MATSUMOTO *et al.*, 2012). A descoberta dessas proteínas F-box, assim como a descrição do modo de ação de cada uma delas na flor, contribui para o entendimento dos mecanismos envolvidos com o processo reprodutivo.

2.6 Interação entre proteínas

Interações proteína-proteína estão presentes em todos os processos celulares, como síntese de DNA, transcrição, tradução, modificações pós-traducionais, transdução de sinal e ciclo celular (PHIZICKY & FIELDS, 1995; GIETZ *et al.*, 1997). A determinação das redes de interação envolvidas em cada processo celular é fundamental para o entendimento dos mesmos. Para as proteínas F-box, a identificação de parceiros de interação é fundamental para o entendimento de sua função, uma vez que os resultados podem revelar se a proteína de estudo faz parte do complexo SCF e, também, quais as possíveis proteínas alvo que serão levadas para degradação no proteassomo. Vários métodos são utilizados para detecção de proteínas que interagem fisicamente, como os métodos físicos de cromatografia de afinidade, co-imunoprecipitação e *pull-down*, e os métodos genéticos, como o sistema de duplo-híbrido (PHIZICKY & FIELDS, 1995). Para o estudo de novas proteínas, diversos autores (PHIZICKY & FIELDS, 1995; BRÜCKNER *et al.*, 2009; GOLEMIS *et al.*, 2011) sugerem a construção de bibliotecas de cDNAs para uso no sistema de duplo-híbrido, pois o *screening* das mesmas revelará informações inéditas sobre a proteína de estudo.

2.6.1 O sistema de duplo-híbrido

Criado e descrito por Fields e Song, em 1989, o sistema de duplo-híbrido é um método *in vivo* para detecção de interações entre proteínas, geralmente realizado em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (PHIZICKY & FIELDS, 1995). O método baseia-se na propriedade de certas proteínas possuírem múltiplos domínios que agem independentemente, e que, quando aproximados por meio de ligações não covalentes, reconstituem a atividade da proteína intacta. Os fatores de transcrição apresentam essa característica: um domínio de ligação ao DNA (DNA Binding Domain – DBD) e um domínio de ativação (Activation Domain – AD), que, quando estão unidos ou aproximados, reconstituem a atividade do fator de transcrição, permitindo a transcrição do(s) gene(s) regulado(s) por ele. Fields e Song, utilizando *S. cerevisiae*, propuseram o uso dos domínios do fator de transcrição GAL4 (ativador da transcrição de genes referentes à utilização da galactose) de *S. cerevisiae*.

A idéia central do sistema é criar duas proteínas híbridas, uma fusionada ao domínio DBD e a outra ao domínio AD. As proteínas híbridas são geradas pela fusão, em fase de

leitura, da sequência codificadora (CDS) de um dos domínios do fator de transcrição GAL4 a um dos cDNAs de estudo. Assim, a CDS do domínio DBD de GAL4 é fusionado ao cDNA que codificará uma proteína X (*bait* – isca) e a CDS do domínio AD do mesmo fator de transcrição é fusionado ao cDNA que codificará uma proteína Y (*prey* – presa). Após transcrição e tradução das proteínas híbridas dentro das leveduras, se as proteínas X e Y interagirem, os domínios do fator de transcrição GAL4 se aproximarão, reconstituindo a atividade de GAL4, promovendo a transcrição dos genes regulados por ele (Figura 6) (FIELDS & SONG, 1989). Para a detecção das interações, são utilizadas linhagens de leveduras que possuem genes repórteres, como o *lacZ* e o *HIS3*, que foram introduzidos no genoma, sob o controle de um promotor regulado por GAL4.

Figura 6. Ilustração do sistema de duplo-híbrido. Se duas proteínas híbridas (*Prey*-AD e *Bait*-DBD), expressas em uma célula de levedura, não interagem, os domínios do fator de transcrição GAL4 não se aproximarão, portanto não reconstituirão este fator e, em consequência, não haverá transcrição dos genes regulados por ele. No caso de haver interação entre as duas proteínas híbridas, o fator de transcrição é reconstituído, promovendo a transcrição dos genes regulados por ele. Esquema retirado de <http://2010.igem.org/Team:Debrecen-Hungary/minimals>.

Na década de 1990, alguns autores incorporaram modificações ao sistema de Fields e Song, adaptando-o à tecnologia Gateway (CHEVRAY & NATHANS, 1992; VIDAL *et al.*, 1996). Esta tecnologia possibilita a inserção de cDNAs de interesse em vetores especiais, através de reações de recombinação. Sem a utilização de enzimas de restrição e ligases, essa adaptação possibilitou a ampliação do uso do sistema de duplo-híbrido (WALHOUT *et al.*, 2000), que passou a ser viável para a construção de bibliotecas de cDNAs para uso nesse sistema. As bibliotecas construídas para este fim são formadas pelas presas (*prey*), que são clonadas em

vetores contendo o domínio AD. A busca de parceiros de interação de uma proteína de estudo (isca – *bait*), que está fusionada ao domínio DBD, é feita por um *screening* dessa biblioteca.

Bibliotecas de cDNAs para uso no sistema de duplo-híbrido já foram utilizadas em diversos trabalhos para a detecção de parceiros de interação de proteínas F-box (SAMACH *et al.*, 1999; DEVOTO *et al.*, 2002; HARMON & KAY, 2003; POTUSCHAK *et al.*, 2003; RISSEEUW *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-CARRANZA *et al.*, 2007). Em nosso laboratório, foi construída uma biblioteca de cDNAs para uso nesse sistema, onde o RNA total de estigmas/estiletos de *N. tabacum* foi convertido em cDNAs e estes clonados, através do sistema Gateway de recombinação, em vetores contendo o domínio AD, formando-se as presas. Essa biblioteca é de grande interesse, pois, a partir dela, torna-se possível a detecção de parceiros de interação de muitas proteínas de estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar um novo gene que codifica uma proteína F-box expresso nos estigmas/estiletes de *Nicotiana tabacum* L., a fim de se entender a função que este gene exerce nestes tecidos e sua possível relação com o processo reprodutivo.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão de três novos genes que codificam putativas proteínas F-box identificados nas bibliotecas TOBEST e SSH, por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) nos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos;
- Selecionar um dos genes para caracterização e analisar, por qRT-PCR, sua expressão nos diferentes estádios do desenvolvimento do estigma/estilete;
- Obter a sequência codificadora completa do gene selecionado para clonagem e sequenciamento;
- Produzir plantas transgênicas com bloqueio na expressão do gene escolhido (silenciamento) e plantas transgênicas superexpressando este gene;
- Analisar os fenótipos das plantas transgênicas comparando com as do tipo selvagem (controle), considerando aspectos como fenótipo das flores e parâmetros reprodutivos;
- Identificar a localização subcelular da proteína codificada pelo gene selecionado, por fusão com o gene repórter GFP (Green Fluorescent Protein);
- Identificar possíveis parceiros de interação da proteína selecionada através do *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum* para uso no sistema de duplo-híbrido, utilizando a proteína F-box de estudo como isca.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo das plantas *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana*

As sementes de *Nicotiana tabacum*, cultivar *Petit Havana* SR1, cedidas pelo Jardim Botânico da *University of Nijmegen* (Holanda), e as sementes de *Nicotiana benthamiana* foram distribuídas em placas de Petri contendo substrato Bioplant[®], de fabricação comercial, e adubo natural. Após semeadura, foram mantidas em câmara de germinação com temperatura (26°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas. Após germinação, as plantas com aproximadamente 2 cm de tamanho foram transferidas para saquinhos contendo o mesmo substrato, ainda mantidas na câmara de germinação. Quando as plantas atingiram aproximadamente 10 cm de tamanho, foram transferidas para vasos com capacidade para 10 kg, contendo substrato, terra e adubo natural. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada.

4.2 Preparo de células DH10B eletrocompetentes (SAMBROOCK *et al.*, 1989)

Uma alça de platina foi imersa em uma suspensão de bactérias *Escherichia coli* da cepa DH10B e estriada em placa de Petri contendo meio de cultura LB (item 4.23) sólido. A placa foi incubada a 37°C durante 16-20 horas. Após esse período, colônias isoladas foram obtidas e foi feito pré-inóculo, em tubo de ensaio, para uma delas, em 2 ml de meio LB líquido. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação (200-250 rpm – rotações por minuto) por 16 horas. Após esse período, toda a cultura foi transferida para 200 ml de meio LB líquido (em Erlenmeyer) e incubada a 37°C a 250 rpm, até que a leitura de absorbância a 600 nm atingisse o ponto ideal (A_{600nm} entre 0.5 e 0.8). A cultura foi, então, deixada no gelo por 30 minutos e, posteriormente, transferida para quatro tubos Falcon. Centrifugou-se a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga *Eppendorf* 5810 R) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de cada tubo foi gentilmente ressuspensionado em 50 ml de água milli-Q estéril e gelada, e os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o novo precipitado de células de cada tubo foi ressuspensionado em 25 ml de água milli-Q estéril e gelada, totalizando 100 ml de células ressuspensionadas em água, sendo o volume total separado em dois novos tubos Falcon. Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células de cada tubo foi gentilmente ressuspensionado em 5 ml de glicerol 10%, a 4°C.

Centrifugou-se novamente, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido em 500 µl de glicerol 10%, a 4°C. A suspensão de células bacterianas DH10B foi aliquoteada (40 µl para cada tubo de 1,5 ml), mantendo-se as alíquotas sempre no gelo, sendo posteriormente estocadas em *freezer* -80°C.

4.3 Transformação de bactérias por eletroporação

Para introdução de DNA exógeno em bactérias por eletroporação, uma alíquota de células eletrocompetentes foi incubada no gelo até descongelar completamente. Em fluxo laminar, 1-2 µl da amostra de DNA de interesse foram adicionados ao tubo contendo os 40 µl de células DH10B eletrocompetentes (item 4.2). Misturou-se gentilmente e o tubo foi recolocado imediatamente no gelo. A mistura (células bacterianas e DNA de interesse) foi transferida para o fundo de uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm (*BioAgency*), previamente gelada. Secou-se a parte metálica da cubeta com papel absorvente, inserindo-a no eletroporador (Gene Pulser[®] II, *Bio-Rad*), regulado para as condições: resistência 200 ohms, capacitância 25 µF e voltagem de 1,8 KV. Imediatamente foi aplicado o choque elétrico, por aproximadamente 5 segundos. Após o choque, rapidamente adicionou-se 1 ml de meio LB líquido na cubeta e todo o conteúdo foi delicadamente transferido para um tubo de ensaio estéril. A cultura foi incubada a 37°C com agitação (200 rpm), por 1 hora. Em seguida, 200-500 µl da cultura foram distribuídos uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas contendo meio LB sólido, com antibiótico apropriado. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

4.4 Mini-preparação de DNA plasmidial

Colônias isoladas, obtidas em placas de Petri, foram utilizadas para mini-preparação de DNA plasmidial. Cada colônia foi inoculada em 5 ml de meio LB líquido, com antibiótico adequado, em tubo de ensaio. A cultura foi incubada a 37°C com agitação (200-250 rpm) por 16-20 horas. Após esse período, foram feitos estoques em glicerol de cada cultura, utilizando-se 300 µl da suspensão de células e 300 µl de glicerol 50% estéril, posteriormente armazenados em *freezer* -80°C. Um volume de 1,5 ml de cada cultura bacteriana foi transferido para um tubo Eppendorf. Centrifugou-se a 13200 rpm (centrífuga *Eppendorf*

5415 D) por 2 minutos para precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido mais uma vez para cada cultura.

4.4.1 Método da lisozima

Para extração do DNA plasmidial pelo método da lisozima, o precipitado de células foi ressuspensionado em 175 µl de tampão TES (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 15% Sacarose). Adicionou-se 20 µl de lisozima (estoque de 10mg/ml), agitando-se a mistura gentilmente com a mesma ponteira. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, colocada em banho-maria a 73°C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13200 rpm por 15 minutos, para precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi recuperado e transferido para novo tubo Eppendorf. Adicionou-se 1/10 do volume total da amostra de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto, para precipitação do DNA plasmidial. O tubo foi colocado em *freezer* -20°C por no mínimo 1 hora ou em *freezer* -80°C por 20 minutos. Centrifugou-se a 13200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com 500 µl de etanol 70% gelado. O tubo foi novamente centrifugado a 13200 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto para completa evaporação do etanol. O DNA foi ressuspensionado em 75 µl de água milli-Q estéril e armazenado a -20°C.

4.4.2 Extração com Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Thermo Scientific)

A extração de DNA plasmidial por kit foi feita para as amostras que foram para as reações de sequenciamento. Para tanto, o precipitado de células proveniente de 3 ml do inóculo foi ressuspensionado em 250 µl da Solução de Ressuspensão. Posteriormente, 250 µl da Solução de Lise foram adicionados, e o tubo foi invertido de 4-6 vezes para misturar as soluções. Foram adicionados 350 µl da Solução de Neutralização, mexendo-se a amostra por inversão de 4-6 vezes, sendo posteriormente centrifugada a 13200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna do próprio kit, que se encaixa em um tubo de coleta de 1,5 ml, também do kit. O conjunto coluna + tubo foi centrifugado a 13200 rpm por 1 minuto. O *flow-through* depositado no tubo de coleta foi descartado, e o mesmo tubo foi novamente encaixado na coluna. Foram adicionados 500 µl da Solução de Lavagem, centrifugando-se a amostra por 1 minuto a 13200 rpm. O *flow-through* foi descartado e a

lavagem foi repetida. Após a segunda lavagem, uma centrifugação adicional de 1 minuto foi realizada para evitar que o etanol, presente na última solução, fosse eluído juntamente ao DNA plasmidial. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e 50 µl do Tampão de Eluição foram adicionados no centro da mesma. Após incubação por 2 minutos a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a 13200 rpm. A coluna foi descartada e o tubo, contendo o DNA plasmidial, foi armazenado em *freezer* -20°C.

4.5 Digestões com enzimas de restrição

As amostras provenientes de mini-preparações de DNA plasmidial foram checadas por digestões com enzimas de restrição. Para escolha das enzimas apropriadas, foi utilizado o programa *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) que determina todos os sítios de restrição encontrados nas sequências de interesse. Cada reação foi montada com 1-10 µg de DNA plasmidial, enzimas e tampão apropriados e água milli-Q estéril em quantidades suficientes para 20-50 µl de reação final. As reações foram incubadas na temperatura adequada (geralmente 37°C) por algumas horas ou *overnight*, dependendo das características de cada enzima utilizada.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Os DNAs digeridos, produtos de PCR e amostras de RNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão TBE 0,5X (Solução estoque 5X: 54 g Iris base; 27,5 g ácido bórico; 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8.0), adicionando-se 0,5µg/ml de brometo de etídeo (SAMBROOCK *et al.*, 1989), um agente intercalante de DNA que permite a visualização das bandas de DNA quando o gel é exposto à luz ultravioleta. Para as corridas eletroforéticas, os géis foram imersos em TBE 0,5X. As amostras foram preparadas com quantidades apropriadas de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL). Para os géis de checagem da integridade do RNA extraído, a água utilizada para o tampão TBE e para o tampão de carregamento foi água destilada tratada *overnight* com DEPC (Dietil Pirocarbonato) a 0,1% e, posteriormente, autoclavada. Para os géis de RNA, foram adicionados, ainda antes de solidificar, 20 µl de isotiocianato de guanidina 1 M, para cada 1 ml de tampão TBE. Foi aplicado 1 µg de RNA de cada amostra nas canaletas do gel.

A voltagem utilizada (geralmente ao redor de 100 volts) e o tempo das corridas variaram de acordo com o tamanho do gel preparado (em comprimento), tamanho da cuba e tamanho do fragmento esperado. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram inferidos por comparação com a migração dos fragmentos do Marcador de Peso Molecular 1 kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*). As bandas foram visualizadas em fotodocumentador, quando os géis eram expostos à luz ultravioleta.

4.7 Purificação de fragmentos de DNA imersos em gel de agarose

A porção do gel de agarose onde se encontrava o fragmento de DNA de interesse foi excisada do gel com o auxílio de um bisturi. Uma membrana Millipore, tipo GV, poro de 22 µm, foi umedecida em tampão TE, dobrada em forma de cone e colocada dentro de um tubo de 1,5 ml cortado na parte superior e com um furo na parte inferior, feito com uma agulha quente. O pedaço de gel foi colocado dentro do cone formado pela membrana. Outro tubo de 1,5 ml, sem tampa, foi encaixado embaixo do tubo contendo a membrana e o pedaço de gel. O material foi centrifugado a 10000 rpm (centrífuga *Eppendorf* 5415 D) por 10 minutos. Após centrifugação, o líquido recuperado no tubo inferior foi transferido para novo tubo de 1,5 ml. O volume da amostra foi ajustado para 200 µl com água milli-Q estéril. Foi adicionado 1 volume de fenol tamponado (pH 8,0) para retirada de proteínas e restos celulares, agitando-se os tubos vigorosamente em vortex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13200 rpm por 3 minutos. Ao final da centrifugação, duas fases foram formadas, sendo que a fase superior foi recuperada e transferida para novo tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 0,5 volume de fenol e 0,5 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), para retirada de proteínas e início da retirada do fenol, agitando-se os tubos vigorosamente em vortex. Centrifugou-se por 3 minutos e a fase superior foi novamente recuperada e transferida para novo tubo. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), para retirada do fenol, e as amostras foram mais uma vez centrifugadas por 3 minutos. A fase superior foi recuperada e transferida para novo tubo de 1,5 ml. Para precipitação do DNA, foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Os tubos foram mantidos em *freezer* -20°C por no mínimo 1 hora ou a -80°C por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% gelado.

Centrifugou-se por 1 minuto e os tubos foram deixados abertos para secagem do etanol. O DNA foi ressuspenso em 20 µl de água milli-Q estéril.

4.8 Quantificação dos ácidos nucleicos

A quantificação das amostras de DNA e de RNA foi realizada em NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*), cedido gentilmente pela Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões (FFCLRP-USP), e em NanoDrop™ 2000 (*Thermo Scientific*), cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP). Para as dosagens, foram utilizados 2 µl de cada amostra. O grau de pureza das amostras foi considerado e analisado pelas razões $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$, sendo que os ácidos nucleicos absorvem a luz no comprimento de onda de 260 nm. Para a razão 260/280, as amostras foram consideradas “puras” quando o valor era próximo a 1,8 e 2,0, para amostras de DNA e RNA, respectivamente. Razões menores do que estes valores podem indicar presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem a luz em 280 nm. Para a razão $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$, valores entre 2,0 – 2,2, tanto para DNA quanto para RNA, indicam amostras livres de outros contaminantes que absorvem a luz próximo ao comprimento de 230 nm, como EDTA e fenol. Dessa forma, valores menores aos geralmente aceitáveis indicam amostras impuras para serem utilizadas (<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>).

4.9 Reações de sequenciamento

O método de sequenciamento utilizado baseia-se na síntese interrompida de DNA (SANGER *et al.*, 1977), realizada em reações de PCR, seguida de purificação por precipitação das amostras e posterior eletroforese em capilares (sequenciador ABI 3100 – *Applied Biosystems*). As reações de sequenciamento foram preparadas com o kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready (*Applied Biosystems*), utilizando-se microplacas de 96 poços. Para cada reação utilizou-se 500-1000 ng de DNA (1 a 4 µl), 2 µl de *primer* específico (5 µM), 2 µl de Big Dye (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes e enzima Taq DNA-Polimerase), 2 µl de tampão Big Dye (2,5X) e água milli-Q estéril em quantidades suficientes para 10 µl de volume final. Os *primers* utilizados para as reações de sequenciamento realizadas no presente trabalho estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas reações de sequenciamento, de acordo com o vetor utilizado para cada construção. **Legenda:** T_m = temperatura de *melting*.

Construção	Vetor	Primer	Sequência (5' → 3')	T _m
TOBEST	pSPORT1	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	47,5°C
		SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TA	40°C
		oligo-dTV	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV	42°C
SSH	pCR [®] 2.1-TOPO [®]	M13 Fw	GTA AAA CGA CGG CCA GT	42°C
		M13 Rv	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50°C
Clonagem de S/S_F-box	pCR [®] 2.1-TOPO [®]	M13 Fw M13 Rv	GTA AAA CGA CGG CCA GT CAG GAA ACA GCT ATG AC	42°C 50°C
Entrada no sistema Gateway	pDONR221	S/S_F-BOX_RV_qPCR	AGA ATC AGC CCT CAC AGG AAG TCT	59,6°C
Superexpressão	pK7WG2	Prom35S	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC C	57,1°C
		Term35S	CCC TAT AAG AAC CCT AAT TCC C	52,1°C
		S/S_F-BOX_RV_qPCR	AGA ATC AGC CCT CAC AGG AAG TCT	59,6°C
Silenciamento	pK7GWIWG2(I)	Prom35S	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC C	57,1°C
		Term35S	CCC TAT AAG AAC CCT AAT TCC C	52,1°C
Fusão com GFP	pK7FWG2	Prom35S	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC C	57,1°C
Fusão com YFP	pK7YWG2	S/S_F-BOX_FW_qPCR	GCA CCT CCT CTT GTT GCA GTT GTT	60,0°C
Duplo-híbrido	pDEST32	DEST32-Fw	AAC CGA AGT GCG CCA AGT GTC TG	62,2°C
		DEST22-32-Rv	AGC CGA CAA CCT TGA TTG GAG AC	59,4°C
	pDEST22	DEST22-AD502-Fw DEST22-32-Rv	TAT AAC GCG TTT GGA ATC ACT AGC CGA CAA CCT TGA TTG GAG AC	52,1°C 59,4°C

As microplacas foram seladas, levadas ao vortex e rapidamente centrifugadas até 1000 rpm. O programa de PCR utilizado foi: desnaturação a 96°C por 2 minutos (passo inicial), desnaturação a 96°C por 45 segundos, pareamento dos *primers* a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, num total de 35 ciclos. Após o término da reação, as amostras foram precipitadas para retirada dos dideoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese das moléculas de DNA, pois estes interferem na leitura das bases durante o sequenciamento. A precipitação foi feita com 80 µl de isopropanol 75%. Depois de adicionado o álcool, as amostras foram levemente agitadas em vortex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugou-se por 45 minutos, a 4000 rpm (centrífuga *Eppendorf* 5810 R), e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 200 µl de etanol 70% e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O etanol

foi removido completamente por centrifugação (*spin* até 1000 rpm), com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora e, posteriormente, ressuspensionado em 10 µl de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e a placa foi levada ao sequenciador, que contém 16 capilares. O sequenciador reconhece as bases por meio de diferentes fluorescências.

As sequências geradas pelo *software* do sequenciador (*ABI 3100 Data Collection*) foram analisadas no programa *Phred/Phrap* (sistema Linux), que determina a qualidade e a validade das bases geradas através dos cromatogramas originados do sequenciamento. Além disso, o programa *Consed* gera um consenso entre diferentes reações de sequenciamento de um mesmo clone, permitindo determinar as regiões da sequência de boa qualidade e as regiões que necessitavam de sequenciamento adicional.

4.10 Determinação da expressão gênica: RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

4.10.1 Desenho dos *primers*

Para o desenho dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR, foram utilizadas as regiões das sequências de nucleotídeos, de cada clone selecionado, onde não havia nenhum domínio conservado, para que o alvo durante as reações fosse apenas o gene de interesse. A presença ou não de domínios foi analisada no programa *Motif Scan* (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), colocando-se a sequência traduzida de cada clone (tradução feita utilizando-se a ferramenta *ExPASyTranslate*, que pode ser encontrada no site <http://web.expasy.org/translate/>). Os *primers* foram desenhados através do programa *PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) da *Integrated DNA Technologies*. Os *primers* utilizados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Pares de *primers* (*forward* + *reverse*) utilizados para as reações de qRT-PCR para os clones selecionados. O nome de cada clone e seus respectivos pares de *primers* estão apresentados.

Legenda: pb = pares de base; Tm = temperatura de *melting*; %CG = porcentagem das bases C e G encontradas em cada *primer*.

Clone	Primer	Sequência (5' → 3')	pb	Tm	%CG
030H09	030H09FW_qPCR	GCA CTT GTG GCT ATT GCT GAA GGT	24	59,7°C	50%
	030H09RV_qPCR	GGG CAT CCT CTT GCT ATG GCT ATT	24	58,7°C	50%
055B08	055B08FW_qPCR	AAC TAG CCT CCC TCC TCT TGA AGT	24	58,9°C	50%
	055B08RV_qPCR	TCC TTG ACA TGC AGA TCC TTG AGT GC	26	60,3°C	50%
130H05	130H05FW_qPCR	GAG CCA TGT TTG TCT GCA AGC CAT	24	60,1°C	50%
	130H05RV_qPCR	TAA CCC GGA CTG TAG TAA GAG ACC CA	26	59,9°C	50%
SSH-002E09	SSHA-002E09FW_qPCR	AAA GGA GTC GTT GAG TCG AGC CTA	24	59,2°C	50%
	SSHA-002E09RV_qPCR	TGG CTG CTT GTG TCT GCA TTT GAG	24	60,0°C	50%
085H05	S/S_F-BOX_FW_qPCR	GCA CCT CCT CTT GTT GCA GTT GTT	24	60,0°C	50%
	S/S_F-BOX_RV_qPCR	AGA ATC AGC CCT CAC AGG AAG TCT	24	59,6°C	50%

4.10.2 Coleta de material vegetal

Para os experimentos de determinação do padrão de expressão nos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos, foram coletados, a partir de plantas controle SR1, 500 mg de cada um dos tecidos. Foi feito um *pool* de cada tecido em diferentes estádios do desenvolvimento. Para os órgãos vegetativos (raiz, caule e folha) foram feitas coletas em três estádios diferentes: plantas com aproximadamente seis semanas após germinação, plantas de aproximadamente três meses após germinação e plantas adultas, já com flores. Para os tecidos florais (sépalas, pétalas, estame, estigma/estilete e ovário), foi feito um *pool* dos 12 estádios do desenvolvimento floral (KOLTUNOW *et al.*, 1990) para cada tecido.

No experimento de determinação da expressão de S/S_F-box no estigma/estilete ao longo dos estádios do desenvolvimento floral, foram separadamente coletados 100 mg de estigmas/estiletos de cada um dos 12 estádios, a partir de plantas controle SR1. Para o experimento de avaliação dos níveis de expressão de S/S_F-box nas plantas transgênicas de superexpressão e de silenciamento, foram coletados estigmas/estiletos no estágio 11 do desenvolvimento de cada um dos transformantes e também de plantas SR1 utilizadas como controle nos experimentos. Para o experimento de determinação da expressão de S/S_F-box nas plantas STIG1_{prom}::iaaM, foram coletados 100 mg de estigmas/estiletos para cada um dos estádios 3, 7 e 10 de três transformantes distintos, e também de plantas controle SR1

deste experimento. Estas coletas foram realizadas pelo aluno de mestrado Luís Antônio Alves de Toledo Filho, responsável pela construção das plantas STIG1_{prom::iaaM}.

Após coleta, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C.

4.10.3 Extração de RNA

Cada amostra (100-500 mg) foi macerada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofarizes e pistilos previamente tratados a 180°C, por 4 horas. O material macerado foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 ml (experimentos com 100 mg de tecido) ou para um tubo Falcon de 15 ml (experimentos com 500 mg de tecido). A extração do RNA total de cada amostra foi feita pelo método do TRIzol (*Invitrogen*). Para isso, 1 ml de TRIzol foi adicionado, para cada 100 mg de tecido, ao tubo contendo o material macerado. A amostra foi homogeneizada em vortex e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio por 100 mg de tecido, e o tubo foi agitado por inversão por 15 segundos. A amostra foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 12000 x g por 15 minutos, a 4°C (centrífuga *Eppendorf* 5810 R). A fase aquosa (fase superior, que contém o RNA) foi removida e transferida para novo tubo. Foram adicionados 0,5 ml de isopropanol 100% por 100 mg de tecido, e o tubo foi agitado por inversão. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 12000 x g por 10 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75%, preparado com água DEPC 0,1%. A amostra foi colocada rapidamente em vortex e centrifugada a 7500 x g por 5 minutos, a 4°C. O tubo foi mantido aberto por 10 minutos para evaporação do etanol e secagem do precipitado. Ao final da extração, o RNA de cada amostra foi ressuspendido em 30-50 µl de água DEPC 0,1%. As amostras foram quantificadas em NanoDrop e armazenadas a -80°C. Foi feito um gel de agarose para checagem da integridade do RNA, como descrito no item 4.6.

4.10.4 Tratamento com DNase

Todas as amostras de RNA foram tratadas com a enzima DNase para a degradação de eventuais moléculas de DNA genômico, que possam ter sido transferidas juntamente com o

RNA durante a extração com o TRIzol. Para isso, 5 µg (experimentos com 100 mg de tecido) ou 10 µg (experimentos com 500 mg de tecido) de cada amostra foram transferidos para tubos de 0,2 ml, completando-se o volume para 25 µl e 50 µl, respectivamente, com água DEPC 0,1%. O tratamento foi feito seguindo-se o protocolo do kit DNA-freeTM (*Applied Biosystems*). Para isso, adicionou-se 0,1 volume de 10X DNase I Buffer e 1 µl de rDNase I (2U/µl) em cada amostra, sendo incubadas a 37°C por 30 minutos, em termociclador. Após esse período, foram adicionados 0,1 volume de DNase Inactivation Reagent em cada tubo, sendo incubados por 2 minutos a temperatura ambiente, sob agitação por inversão. Cada amostra foi centrifugada a 13200 rpm por 1,5 minutos e o RNA (sobrenadante) foi transferido para novo tubo, sendo armazenado em freezer -80°C.

4.10.5 Detecção de contaminação com DNA genômico

Após tratamento com a DNase, foi feita checagem, através de reações de qRT-PCR, para verificar se as amostras de RNA ainda continham DNA genômico, pois se houver amplificação, o resultado indica a presença de DNA dupla-fita que está sendo amplificado durante a reação. Utilizando-se microplacas de 96 poços, as reações-teste foram feitas, para cada poço, com 1 µl de cada *primer* (5 µM), *forward* e *reverse*, do gene de referência *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), 5 µl do mix GoTaq[®] qPCR Master Mix (*Promega*), 2 µl de água milli-Q estéril e 1 µl de RNA tratado de cada amostra, totalizando 10 µl de reação para cada poço. As condições da termociclagem foram: um passo inicial de 50°C por 2 minutos, passando a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System – *Applied Biosystems*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, FCFRP-USP). As amostras que apresentaram amplificação indicaram presença de DNA genômico. Dessa forma, foram re-tratadas como indicado no kit DNA-freeTM, adicionando-se 0,15 volume de 10X DNase I Buffer e 1-2 µl de rDNase I (2U/µl), seguindo-se o procedimento descrito no item 4.10.4. Após re-tratamento, uma nova reação-teste foi realizada para confirmação da completa degradação de todo o DNA genômico presente na amostra de RNA.

4.10.6 Reação com a transcriptase reversa

As amostras de RNA, livres de DNA genômico, foram convertidas a cDNA por tratamento enzimático com a transcriptase reversa (SuperScriptTM III - 200U/μl, *Invitrogen*). Para cada reação, foram utilizados 1 μg (experimentos com 5 μg de RNA tratado) ou 5 μg (experimentos com 10 μg de RNA tratado) de RNA tratado, 1 μl de oligo dTV (50 μM) e 1 μl de mistura de dNTPs (10 mM cada), completando-se o volume para 12 μl com água DEPC 0,1%. As amostras foram aquecidas em termociclador a 65°C por 5 minutos, sendo imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos. Foram adicionados em cada tubo 4 μl de tampão 5X First-Strand Buffer, 1 μl de DTT (0,1 M), 1 μl de RNaseOUTTM (40U/μl) e 2 μl da enzima SuperScriptTM III, totalizando um volume de 20 μl. As amostras foram colocadas em termociclador e aquecidas a 50°C por 40 minutos, seguido por 20 minutos a 55°C e, por fim, a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram armazenados em *freezer* -20°C.

4.10.7 Reações de qRT-PCR e análise dos resultados

Para determinação dos níveis de expressão do gene de estudo, foram feitas reações de qRT-PCR utilizando-se o reagente SYBR[®] *Green*, um intercalante de DNA dupla-fita. As reações foram feitas utilizando-se 50 ng de RNA convertido em cDNA para cada poço (o cDNA foi diluído apropriadamente para utilização de 2 μl contendo o correspondente a 50 ng de RNA), em um total de 10 μl de volume de reação. Dessa forma, as reações foram feitas, para cada poço, com 1 μl de cada *primer* (5 μM), *forward* e *reverse*, do gene de interesse, 5 μl do mix GoTaq[®] qPCR Master Mix (*Promega*), 1 μl de água milli-Q estéril e 2 μl de cDNA de cada amostra (50 ng de RNA convertido em cDNA). As condições da termociclagem foram as mesmas descritas no item 4.10.5. Como referência interna, foram utilizados dois genes, previamente determinados em nosso laboratório, de expressão constitutiva em *N. tabacum*: um gene de uma proteína ribossomal (*RPL2 – ribosomal protein L2*) e o gene da enzima GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Para cada amostra, foram feitas reações em duplicatas técnicas, permitindo a detecção de possíveis erros. As curvas de dissociação também foram adicionadas ao término das reações. Foram utilizados controles negativos (NTC = *no template control*), sem a adição de cDNA, para confirmar ausência de possíveis contaminantes nos reagentes utilizados na reação.

Os resultados de cada placa foram analisados no programa *7500 Software – Version 2.0.4*. Este programa permite analisar a qualidade das duplicatas técnicas, bem como o padrão das curvas de dissociação. Além disso, permite manipulações na escolha do valor do *cycle threshold* (número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência cruzar o limiar escolhido) e também do número de genes de referência a serem usados como controle interno. No caso dos valores das duplicatas técnicas apresentarem uma variação maior que 0,5 ciclo, o valor foi omitido e, se necessário, a reação da placa foi repetida para garantir a validade dos resultados. Foram gerados gráficos de expressão relativa utilizando-se o método delta-delta Ct, normalizando a expressão de cada gene de estudo aos dois genes de referência.

4.11 Anotação manual dos clones identificados no TOBEST

Os clones da biblioteca TOBEST (QUIAPIM *et al.*, 2009) correspondentes a genes da família F-box (previamente identificados por anotação automatizada) foram anotados manualmente no presente trabalho. Para isso, as sequências de cada clone foram utilizadas como molde na busca de sequências similares no banco de dados *GenBank*, encontrado no site NCBI (*National Center of Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa utilizado para as buscas foi o *tblastx* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), que traduz a sequência de nucleotídeos que é fornecida nas seis possíveis fases de leitura, assim como as sequências de nucleotídeos que estão depositadas no banco, comparando as sequências de aminoácidos geradas do material de estudo com todas as sequências de nucleotídeos traduzidas que estão depositadas no banco de dados.

Os clones confirmados no *GenBank* como correspondentes a genes F-box foram analisados no banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, denominado TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* - <http://www.arabidopsis.org/>), para busca dos respectivos genes ortólogos nessa espécie. Para tanto, o programa *tblastx* deste banco de dados foi utilizado (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

4.12 Montagem e análise *in silico* da CDS do gene selecionado

A CDS (sequência codificadora) do gene, referente ao clone selecionado para estudo, foi montada a partir de análises *in silico*. Para isso, foram utilizados os programas *blast*

(ALTSCHUL *et al.*, 1997) dos bancos de dados SOL (*SOLanaceae Genomics Network* - <http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>) e DFCI (The Gene Index - *Dana-Farber Cancer Institute* - <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>), onde a sequência nucleotídica do clone de estudo foi usada como *query sequence* na busca de sequências similares que pudessem complementar e aumentar o tamanho da CDS do seu gene correspondente. As sequências encontradas foram alinhadas à sequência do clone de estudo, utilizando-se a ferramenta *bl2seq* do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para alinhamento de duas sequências, e o programa *ClustalW2 – Multiple Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), para o alinhamento de duas ou mais sequências. A sequência teórica completa gerada foi traduzida com a ferramenta *ExPASyTranslate* (<http://web.expasy.org/translate/>) para observar se não havia códons de terminação no interior da sequência criada. Para auxiliar as análises e tornar a sequência teórica criada mais confiável, foram feitas análises por *blastp* (busca por similaridade entre sequências de aminoácidos) no banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), para determinação da similaridade da proteína gerada com a proteína codificada pelo ortólogo do gene de estudo em *Arabidopsis*.

A sequência de aminoácidos do gene de estudo foi analisada no programa *Motif Scan* (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). Este programa mostra os domínios presentes na proteína de estudo, assim como a posição de cada um ao longo da sequência de aminoácidos. Adicionalmente, buscas foram realizadas no banco de dados SOL para identificação da sequência genômica da CDS de estudo. Este banco possui sequências genômicas parciais de *N. tabacum* depositadas. Para a busca, a CDS do gene de estudo foi utilizada como molde. Para tanto, o programa *blastN* deste banco foi utilizado, que busca sequências de nucleotídeos similares à sequência utilizada como molde.

4.13 Amplificação da CDS de S/S_F-box

Partindo-se da CDS teórica criada, para o gene referente ao clone 085H05, foram desenhados *primers* (Tabela 3) flanqueando a sequência codificadora do gene, para amplificação do mesmo.

Tabela 3. *Primers (forward e reverse)* utilizados na reação de PCR para amplificação da CDS de S/S_F-box. **Legenda:** pb = pares de base; Tm = temperatura de *melting*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	pb	Tm
085H05FW	ATG GCT TCT GAA ACC CAC AAG	21	55,6°C
085H05RV	TCA ACA ACC CAT CAC AGC AC	20	55,7°C

A reação de PCR foi feita com o kit Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (*Invitrogen*). Para a reação, utilizou-se como molde 10 ng de um *pool* de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum* nos diferentes estádios do desenvolvimento, 5 µl de tampão 10X High Fidelity PCR Buffer, 2 µl de sulfato de magnésio 50 mM, 1 µl de mistura de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) a 10 µM, 0,2 µl da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity e quantidades suficientes de água milli-Q estéril para volume final de 50 µl. A reação de PCR se baseou em um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 1 minuto (pareamento dos *primers*) e 68°C por 2 minutos (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 68°C por 10 minutos para completa adição de nucleotídeos e mantida a 10°C. O produto da PCR foi colocado em gel de agarose ultrapura a 1% e, após corrida eletroforética, a banda esperada foi recortada para purificação.

4.14 Clonagem de S/S_F-box no vetor pCR® 2.1-TOPO®

O fragmento gerado pela PCR e já purificado foi clonado no vetor pCR® 2.1-TOPO® do kit TOPO TA Cloning® (*Invitrogen*) (Figura 7). A clonagem permite maior estabilidade do fragmento de interesse em DNA circular, em comparação ao DNA dupla fita com as extremidades expostas. A reação de clonagem foi feita com 4 µl do produto da PCR purificado, 1 µl da solução de sal presente no kit do vetor (1,2 M de NaCl e 0,06 M MgCl₂) diluída 4X e 1 µl do vetor pCR® 2.1-TOPO®. A ligação foi mantida por, no mínimo, 30 minutos a temperatura ambiente. Bactérias DH10B eletrocompetentes foram transformadas com 1-2 µl da ligação. Após eletroporação, o material resultante foi cuidadosamente espalhado em placas contendo meio LB sólido suplementado com canamicina (50µg/ml), para seleção dos transformantes, e incubadas a 37°C por 16-20 horas.

Figura 7. Estrutura do plasmídeo pCR®2.1-TOPO® do kit TOPO TA Cloning® (*Invitrogen*), evidenciando a região do sítio múltiplo de clonagem. O vetor apresenta os genes que conferem resistência à ampicilina e à canamicina para seleção em bactérias.

4.15 Obtenção das construções de superexpressão, RNAi e em fusão com GFP

As construções de superexpressão e de silenciamento do gene de estudo, assim como a construção de fusão com a proteína GFP, foram realizadas utilizando-se o sistema Gateway de recombinação (*Invitrogen*). Este sistema é baseado na reação de recombinação sítio-específica do fago λ. Sequências de DNA contendo sítios de recombinação (*att*) podem ser transferidas para vetores contendo sítios compatíveis (KARIMI *et al.*, 2002). A primeira reação de recombinação para entrada no sistema Gateway é a reação BP, onde há recombinação dos sítios *attB1* e *attB2*, que flanqueiam a sequência de DNA de interesse, com os sítios *attP1* e *attP2* presentes no vetor de entrada (*attB1* X *attP1*; *attB2* X *attP2*). Após reação, os sítios de recombinação que flanqueiam o DNA de interesse, clonado no vetor de entrada, passam a ser chamados de *attL1* e *attL2*. Sequências de DNA de interesse clonadas em um vetor de entrada podem, facilmente, ser transferidas para diversos vetores de expressão construídos para uso no sistema Gateway, os chamados vetores de destino. Neste caso, uma nova reação de recombinação é realizada, a reação LR. Os sítios *attL1* e *attL2* que flanqueiam o DNA de interesse recombinam com os sítios *attR1* e *attR2* presentes

nos vetores de destino (*attL1* X *attR1*; *attL2* X *attR2*), transferindo a sequência de interesse para o vetor de expressão específico.

4.15.1 Inserção dos sítios de recombinação *attB* para entrada no sistema Gateway

Os sítios *attB1* e *attB2* possuem tamanho de 31pb e 30pb, respectivamente. Em nosso laboratório, já existem *primers* para ambos os sítios, contendo a sequência completa de cada um. Partindo-se disso, a inserção destes sítios nos fragmentos de interesse foi feita através de duas reações de PCR: a primeira (PCR1) com um par de *primers* que cobrem parte da sequência de interesse e parte dos sítios *attB*, e a segunda (PCR2) utilizando-se os *primers attB* já presentes em nosso laboratório, para complementação da sequência dos sítios de recombinação. Os conjuntos de *primers* utilizados para as reações de PCR para cada construção estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. *Primers* utilizados nas reações de PCR1 e PCR2 para inserção dos sítios *attB1* e *attB2* nos fragmentos a serem clonados no vetor de entrada do sistema Gateway. A parte sublinhada equivale às bases de pareamento dos *primers* com cada fragmento de interesse a ser amplificado. **Legenda:** pb = pares de base; Tm = temperatura de *melting*.

PCR	Construção	Primer	Sequência (5' → 3')	pb	Tm
1	Superexpressão	S/S_F-BOX_attB1-FW	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC <u>ATGGCTTCTGAAAC</u>	38	65,7°C
		S/S_F-BOX_attB2-RV	GTACAAGAAAGCTGGGTCTCAACA <u>ACCCATCACAGCAC</u>	38	66,1°C
	Fusão com GFP	S/S_F-BOX_attB1-FW	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC <u>ATGGCTTCTGAAAC</u>	38	65,7°C
		S/S_F-BOX_attB2ss-RV	GTACAAGAAAGCTGGGT <u>CACAACCCATCACAGCAC</u>	35	65,7°C
	RNAi	S/S_F-BOX_attB1-RNAi	GCAGGCTTCCCAAATGTCAATAG	23	56,4°C
		S/S_F-BOX_attB2ss-RV	GTACAAGAAAGCTGGGT <u>CACAACCCATCACAGCAC</u>	35	65,7°C
2	Todas	BP-1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC	31	61,7°C
		BP-2	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	30	63,8°C

O DNA proveniente de uma colônia positiva (S/S_F-box clonado no vetor pCR[®] 2.1-TOPO[®]), já checado por digestões enzimáticas e sequenciado, foi utilizado como molde para as reações de PCR1. O DNA molde para as reações de PCR2 foi o produto gerado pela reação de PCR1. As reações de PCR foram feitas com o kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Para cada reação foram utilizados 10 ng de DNA molde, 1 µl de dNTPs (10 mM), 2 µl de MgSO₄ (50 mM), 5 µl de tampão 10X High Fidelity PCR Buffer, 0,2 µl da enzima Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity, 1 µl de *primer forward* (10 µM), 1 µl de *primer reverse* (10 µM) e água milli-Q autoclavada em quantidades suficientes para 50 µl de

volume final. O programa de PCR utilizado foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 1 minuto para pareamento dos *primers* (temperaturas de pareamento utilizadas para cada construção indicadas abaixo; para as reações de PCR2, a temperatura de pareamento estabelecida foi de 57°C) e 68°C por 30-90 segundos (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 68°C por 10 minutos e mantida a 10°C. Uma alíquota (40 µl) de cada reação foi aplicada em gel de agarose (ultrapura) 1% e, após corrida, as bandas esperadas foram recortadas e purificadas.

Superexpressão:

Para a construção de superexpressão, o fragmento desejado para expressão em plantas abrange toda a região codificadora (do códon ATG para a metionina inicial até o códon de terminação) (Figura 8-A). A temperatura de pareamento dos *primers* estabelecida para a PCR1 foi de 60°C.

Fusão com GFP:

Na construção para fusão da sequência de S/S_F-box com a sequência do gene que codifica a proteína GFP, o fragmento de interesse para expressão em plantas abrange toda a região codificadora, exceto o códon de terminação (Figura 8-A), para que a fusão com a GFP seja realizada na porção 3' de S/S_F-box (fusão S/S_F-box::GFP). Para a PCR1, a temperatura de pareamento dos *primers* estabelecida foi de 60°C.

RNAi:

De acordo com Helliwell e Waterhouse (2003), o tamanho do fragmento selecionado para uma maior eficiência no silenciamento de plantas varia de 300 a 600pb. Fragmentos entre esses valores parecem ser mais estáveis e efetivos nas construções de *hairpin* de RNA com íntron. Além disso, fragmentos muito grandes aumentam a probabilidade de perda de especificidade no silenciamento de um único transcrito alvo. Neste trabalho, o fragmento para construção do vetor de silenciamento em plantas foi escolhido em uma região sem a presença de domínios conservados, de tamanho de 360pb, após o segundo domínio *kelch* da proteína de S/S_F-box até o códon de terminação (Figura 8-B). A temperatura de pareamento estabelecida para os *primers* utilizados na PCR1 foi de 56°C.

(A)

(B)

Figura 8. Representação das PCRs 1 e 2 para inserção dos sítios *attB* nas extremidades dos fragmentos de interesse. A sequência de *S/S_F-box*, de 1203pb, está representada, com os domínios F-box, *kelch 1* e *kelch 2*. Os retângulos abaixo da sequência do gene representam os *primers* da PCR1 (em cinza), que cobrem parte da sequência de interesse e parte dos sítios *attB*, e da PCR2 (em branco), que complementam a sequência dos sítios *attB*. As caixas pretas representam os sítios *attB*, flanqueando os fragmentos de interesse. **A)** Esquema da PCR1 e da PCR2 para inserção dos sítios *attB* nos fragmentos para as construções de superexpressão e de fusão com GFP. O produto final das reações de PCR é a CDS completa de *S/S_F-box* (exceto o códon de terminação para a construção de fusão com GFP) flanqueada pelos sítios *attB1* e *attB2*. **B)** Esquema das reações de PCR1 e PCR2 para inserção dos sítios *attB* no fragmento de interesse para a construção de RNAi. O produto final das reações de PCR é a sequência de 360pb, escolhida após o domínio *kelch 2* da proteína de *S/S_F-box* até o códon de terminação, flanqueada pelos sítios *attB1* e *attB2*.

4.15.2 Recombinação dos fragmentos gerados com o vetor de entrada: Reações BP

O vetor de entrada pDONR221 (*Invitrogen*) (Figura 9) é utilizado para clonagem de fragmentos com extremidades *attB*, pela recombinação entre os sítios *attB*, presentes no fragmento de interesse, e os sítios *attP*, presentes neste vetor. Para as reações BP foi utilizado o kit BP Clonase (*Invitrogen*). Foram utilizados 300 ng do produto da PCR2 já

purificado, 150 ng do vetor pDONR221, 2 µl do tampão 5X BP Clonase™, 1 µl do mix de enzimas BP Clonase™ e tampão TE (pH 8,0) em quantidade suficiente para um volume final de 10 µl. A reação foi mantida a temperatura ambiente por no mínimo 1 hora e, após esse período, adicionou-se 1 µl de proteinase K (2µg/µl), para parada da reação de recombinação, e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Uma alíquota de 1,5 µl da reação BP de cada construção foi utilizada na transformação de células *E. coli* DH10B, via eletroporação. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com canamicina (50µg/ml) e o DNA plasmidial de oito colônias obtidas para cada construção foi extraído. Após confirmada a presença do inserto desejado, por digestões enzimáticas, uma das colônias foi sequenciada e selecionada para as reações de recombinação com os vetores de expressão em plantas, adequados para cada construção.

Figura 9. Mapa do vetor pDONR221 (*Invitrogen*), de entrada no sistema Gateway de recombinação. O vetor, de 4761pb, apresenta o gene que confere resistência à canamicina para seleção em bactérias. Os sítios M13-Forward e M13-Reverse são utilizados para sequenciamento. Os sítios attP1 e attP2 flanqueiam o gene ccdB, que inibe o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*, e o gene de resistência ao cloranfenicol (Cm^R). Após reação BP, os genes ccdB e Cm^R são substituídos pelo fragmento de interesse.

4.15.3 Recombinação do vetor de entrada com o vetor de destino: Reações LR

A) Os vetores de expressão utilizados

Os vetores de expressão em plantas utilizados foram o pK7WG2 (Figura 10), o pK7GWIWG2(I) (Figura 11) e o pK7FWG2 (Figura 12), para as construções de superexpressão, de RNAi e de fusão com GFP, respectivamente. Além disso, foi utilizado o vetor pK7YWG2

(Figura 13) para a construção de fusão com YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), utilizada para confirmação da localização subcelular da proteína de S/S_F-box. Tais vetores foram construídos para uso no sistema Gateway, por Karimi e colaboradores (2002). Todos eles apresentam os sítios de recombinação *attR* clonados entre o promotor 35S e o terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S). Esse promotor constitutivo garante uma elevada taxa de transcrição, apresentando alta atividade na maioria das células da planta transgênica. Todo o cassete de expressão, assim como o gene que confere resistência à canamicina em plantas, está clonado entre as bordas direita e esquerda do T-DNA (DNA de transferência).

Figura 10. Mapa do vetor pK7WG2 (KARIMI *et al.*, 2002), destinado à superexpressão de sequências de DNA. O vetor apresenta os genes de resistência à estreptomicina e à espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias, além do gene de resistência à canamicina (Kan) para seleção em plantas. O gene *ccdB* está clonado entre os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*. Fonte: VIB - <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Figura 11. Mapa do vetor pK7GWIWG2(I), utilizado para os experimentos de silenciamento gênico por RNAi (KARIMI *et al.*, 2002). Este vetor possui um íntron clonado entre duas sequências de recombinação, as quais estão dispostas de maneira invertida entre si. Tal configuração permite dois eventos independentes de recombinação, de maneira a resultar em duas sequências idênticas e complementares separadas por um íntron, o que permite (após a transcrição) a formação de um RNA em forma de “grampo”, que desencadeia um eficiente processo de silenciamento gênico pós-transcricional (KARIMI *et al.*, 2002). O vetor apresenta os genes de resistência à estreptomicina e à espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias, além do gene de resistência à canamicina (Kan) para seleção em plantas. Dois genes *ccdB* estão clonados entre os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*. Fonte: VIB - <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Figura 12. Mapa do vetor pK7FWG2, utilizado para fusão em fase de leitura do gene de interesse na porção 5' da sequência do gene repórter GFP (KARIMI *et al.*, 2002). A sequência de eGFP (*enhanced GFP*) está posicionada entre o sítio *attR2* e o terminador 35S. O vetor apresenta os genes de resistência à estreptomicina e à espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias, além do gene

de resistência à canamicina (Kan) para seleção em plantas. O gene *ccdB* está clonado entre os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*. Fonte: VIB - <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Figura 13. Mapa do vetor pK7YWG2, utilizado para fusão em fase de leitura do gene de interesse na porção 5' da sequência do gene repórter YFP (KARIMI *et al.*, 2002). A sequência de eYFP (*enhanced* YFP) está posicionada entre o sítio *attR2* e o terminador 35S. O vetor apresenta os genes de resistência à estreptomicina e à espectinomomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias, além do gene de resistência à canamicina (Kan) para seleção em plantas. O gene *ccdB* está clonado entre os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*. Fonte: VIB - <http://gateway.psb.ugent.be/>.

B) Reações LR

Os vetores de expressão selecionados foram utilizados para recombinação com o vetor de entrada pDONR221, contendo o fragmento de interesse de cada construção. A transferência dos fragmentos de interesse para os vetores de expressão se dá pela recombinação dos sítios *attL*, presentes no vetor de entrada, com os sítios *attR*, presentes no vetor de destino. Para as reações LR foi utilizado o kit LR Clonase (*Invitrogen*). Para cada uma das reações, foram utilizados 150 ng do vetor de entrada contendo o fragmento de interesse, 300 ng do respectivo vetor de expressão, 2 µl do tampão 5X LR ClonaseTM, 1 µl do mix de enzima LR ClonaseTM e tampão TE (pH 8,0) em quantidade suficiente para um volume final de 10 µl. A reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e, logo após, foi adicionada proteinase K (2 µg/µl), deixando-se a 37°C por 10 minutos. Após isso, 1,5 µl da reação de recombinação foram utilizados para transformação da linhagem DH10B de *E. coli*, via eletroporação. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com

estreptomicina (12,5µg/ml) e espectinomicina (50µg/ml) e o DNA plasmidial foi extraído de algumas colônias obtidas para cada construção. Para verificar a presença do inserto desejado, o DNA plasmidial foi analisado por digestões enzimáticas e o DNA de uma das colônias de cada construção foi sequenciado e selecionado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.

4.16 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

4.16.1 Preparo de agrobactérias eletrocompetentes

Uma alça de platina foi imersa em uma suspensão bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens* da cepa C58C1Rif^R (pGV2260), mantida como estoque em glicerol a -80°C, e estriada em uma placa contendo meio MAS sólido (item 4.23). A placa foi incubada a 28°C por 48 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em 50 ml de meio LB 2X líquido e incubada a 28°C por 16 horas com agitação de 150 rpm. O volume foi dividido em tubos de 1,5 ml e centrifugados a 12000 rpm (centrífuga *Eppendorf* 5810 R) por 1 minuto. As células foram gentilmente ressuspensas em 500 µl de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 1 mM a 4°C. Os tubos foram novamente centrifugados por 1 minuto. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao final, as células foram ressuspensas em 20 µl de glicerol 10%. Juntou-se o conteúdo de dois tubos para que o volume final de cada alíquota fosse de 40 µl, sendo estas guardadas em freezer -80°C.

4.16.2 Eletroporação de *Agrobacterium*

A transformação de *A. tumefaciens* foi feita com 1 µg do DNA plasmidial de interesse, por eletroporação (ver item 4.3). Cada transformação foi incubada por 4 horas a 28°C, sob agitação de 200 rpm. Plaqueou-se 25-100 µl da suspensão bacteriana em meio LB sólido, contendo os antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 28°C durante 48 horas. Após esse período, colônias isoladas foram obtidas e foram feitos inóculos para colônias selecionadas de cada construção, em 5 ml de meio LB líquido com os mesmos antibióticos utilizados nas placas. Os inóculos foram incubados a 28°C, sob agitação de 200 rpm, por 48 horas para infecção de discos foliares e por 24 horas para infiltração de folhas para experimentos de expressão transiente.

4.16.3 Extração de DNA plasmidial de *Agrobacterium*

Para confirmar a presença do vetor de interesse em *A. tumefaciens*, foram feitas preparações de DNA plasmidial (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998), para posterior checagem por reações de PCR. Para mini-preparação de DNA plasmidial de *A. tumefaciens*, foram utilizados 1,5 ml dos inóculos, após 24 horas de incubação. O volume foi centrifugado a 13200 rpm por 2 minutos (centrífuga *Eppendorf* 5415 D) e o precipitado de células foi ressuspenso em 1 ml de Tampão 1 (NaCl 0,2 M em 10 ml de TE) para lavagem e retirada do meio LB líquido. Em seguida, o volume foi novamente centrifugado e o sobrenadante foi descartado, repetindo-se o passo por mais uma ou duas vezes. Após a lavagem, ressuspendeu-se as células em 200 µl do Tampão 1 e, em seguida, foram adicionados 200 µl da Solução 1 (NaOH 0,2 N e SDS 1%), incubados em gelo por 15 minutos. Após, foram adicionados 150 µl de acetato de potássio 3 M e o tubo foi incubado em gelo por 30 minutos. O sobrenadante, obtido após centrifugação a 13200 rpm por 5 minutos, foi transferido para um novo tubo e, em seguida, fez-se limpeza com fenol/clorofórmio, como indicado no item 4.7. Para precipitação do DNA, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto, mantendo-se as amostras a -20°C por pelo menos 1 hora. Foi obtido um precipitado de DNA após centrifugação a 13200 rpm por 30 minutos, o qual foi ressuspenso em 20 µl de água milli-Q estéril.

4.16.4 Seleção das colônias positivas: checagem por PCR

Para checagem de cada construção, foi utilizado um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) e um *primer* externo, que parecia na sequência do respectivo vetor de expressão. As reações de PCR foram feitas com 1 µl de DNA plasmidial extraído de cada uma das colônias de cada construção, 5 µl de tampão 5X da reação (*Biotoools*), 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de *primer forward* e 1 µl de *primer reverse* (10 µM cada), 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl da enzima BIOTOOLS DNA Polymerase (concentração da enzima: 1U/µl – temperatura de extensão: 72°C) e quantidades suficientes de água milli-Q estéril para volume final de 50 µl. O conjunto de *primers* utilizados para cada checagem está representado na Tabela 5.

Tabela 5. *Primers* utilizados nas reações de PCR de *Agrobacterium* para checagem da transformação.**Legenda:** FW = *primer forward*; RV: *primer reverse*.

Construção	Primer	Sequência (5'→3')	Tm
superexpressão	FW: S/S_F-BOX_attB1-RNAi (interno)	GCAGGCTTCCCAAATGTCAATAG	56,4°C
	RV: Term35S (externo)	CCCTATAAGAACCCTAATTCCC	52,1°C
GFP e YFP	FW: S/S_F-BOX_attB1-RNAi (interno)	GCAGGCTTCCCAAATGTCAATAG	56,4°C
	RV: seq-hGFP-RV (externo)	CAGCTTGCCGTAGGTGGCATC	60,9°C
RNAi	FW: 085H05RV (interno)	TCAACAACCCATCACAGCAC	55,7°C
	RV: Term35S (externo)	CCCTATAAGAACCCTAATTCCC	52,1°C

O programa estabelecido foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 1 minuto de pareamento dos *primers* (a 52°C para as construções de superexpressão e de RNAi e a 56°C para as construções de fusão com GFP e YFP) e 72°C por 1 minuto (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 72°C por 10 minutos e mantida a 10°C. Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1%.

4.17 Transformação de plantas

4.17.1 Obtenção de *N. tabacum* em condições estéreis

Em um tubo de 1,5 ml, sementes de *Nicotiana tabacum* (cultivar *Petit Havana* SR1) foram imersas em 1 ml de etanol 70% (preparado com água milli-Q autoclavada) por 1 minuto. O etanol foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, foram adicionados 700 µL de hipoclorito de sódio (4-6%, *Sigma*), deixando-se as sementes por exatos 40 minutos sob agitação em vortex. As sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril e, posteriormente, distribuídas em placas de Petri contendo meio MS sólido (item 4.23). As placas foram mantidas em condições adequadas de temperatura (28°C) e luminosidade (16 horas de luz e 8 horas de escuro), até a germinação das sementes. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para potes de vidro estéreis, contendo o mesmo meio de cultura, e mantidas nas mesmas condições até obtenção de folhas de tamanho adequado para transformação.

4.17.2 Obtenção dos transgênicos estáveis de superexpressão e RNAi

As plantas crescidas em condições estéreis foram utilizadas para obtenção das plantas transgênicas estáveis. Com aproximadamente seis semanas após semeadura em cultura de tecido, as folhas de *N. tabacum* (SR1) foram cortadas em pequenos discos foliares, machucando-se toda a borda com uma lâmina de bisturi, permitindo assim a liberação de moléculas-sinal (acetoseringona) das células foliares, que induzem a transferência do T-DNA de interesse, presente em *Agrobacterium*, para o genoma vegetal (STACHEL *et al.*, 1985). Os discos foram colocados em contato com 20 ml de meio MS líquido em placas de Petri (Figura 14-A). Para cada transformação (superexpressão e RNAi), foram utilizadas as colônias de *Agrobacterium* que continham a construção de interesse, consideradas positivas através de checagem por PCR. Um inóculo (meio LB líquido) de cada colônia positiva foi deixado por 48 horas sob agitação. Uma alíquota de 750 µl de cada inóculo, contendo *Agrobacterium* transformado com cada construção, foi separadamente acrescentada aos 20 ml de meio MS contidos nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 28°C por dois dias, na ausência de luz, e, posteriormente, os discos foram lavados com água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio M-300 sólido (item 4.23) de indução de calos (Figura 14-B), sendo mantidas em câmara de germinação (16 horas de luz e 8 horas de escuro, a 28°C). Após aproximadamente 15 dias, os calos foram isolados dos discos e distribuídos sobre uma placa contendo novamente meio M-300, para maior crescimento dos calos, deixando-se por aproximadamente 15 dias. Após crescimento, os calos foram transferidos para o meio M-250 sólido (item 4.23) de indução de parte aérea (Figura 14-C) e deixados na câmara de germinação (16 horas de luz e 8 horas de escuro, a 28°C) até a formação de brotos. De cada calo, foram transferidos no mínimo dois brotos, para ocasional perda de um dos brotos nas manipulações durante a cultura de tecido (contaminação com fungos e bactérias, ou ausência de enraizamento). Dessa forma, foram geradas plântulas de diversas transformações independentes (cada calo representa um evento de transformação) e, também, representantes de um mesmo evento de transformação (brotos originados no mesmo calo). Os brotos formados foram, então, transferidos para placas de Petri contendo meio MS com o antibiótico canamicina (200µg/ml), para indução da formação de raiz. Após início do crescimento das raízes, as plântulas foram transferidas, uma a uma, para potes maiores de vidro, contendo meio MS +

canamicina (Figura 14-D), ainda mantidos na câmara de germinação para crescimento até aproximadamente 10 cm. Após cultura *in vitro*, as plantas já enraizadas foram transferidas para saquinhos contendo terra, substrato Bioplant® de fabricação comercial e adubo natural, cobertas por saco umedecido para aclimação (Figura 14-E). Os saquinhos foram mantidos em câmara de germinação com temperatura (26°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas, até serem então transplantadas para vasos de 10 kg e mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada (Figura 14-F). Plantas SR1 foram utilizadas como controle para os experimentos. Para tanto, sementes estéreis (item 4.17.1) de SR1 foram distribuídas em placas de Petri contendo meio MS sólido, apenas, no mesmo período em que as plantas transformadas estavam produzindo calos, para que plantas transgênicas e plantas controle crescessem ao mesmo tempo.

Figura 14. Obtenção das plantas transgênicas. **A)** Discos foliares estéreis de *N. tabacum* (cultivar SR1) foram infectados com agrobactéria contendo a construção de interesse. **B)** Calos originados das bordas dos discos foliares foram transferidos para meio de indução de broto. **C)** Brotos originados a partir dos calos em meio de indução de parte aérea; cada calo representa um transformante independente, sendo que brotos originados do mesmo calo são considerados iguais. **D)** Planta em meio de indução de raiz. **E)** As plantas foram transferidas para saquinhos contendo substrato e adubo natural, cobertas por saco umedecido para aclimação. **F)** Planta transgênica adulta, em vaso contendo substrato, terra e adubo, mantida em casa de vegetação com irrigação controlada.

4.18 Extração de DNA genômico de folhas

A extração do DNA genômico de folhas de *N. tabacum* foi feita de acordo com EDWARDS *et al.* (1991). Para tanto, o tecido foliar de cada planta foi coletado utilizando-se a tampa de um tubo Eppendorf estéril, de 1,5 ml. Um pedaço de folha foi colocado entre a

tampa e o corpo do tubo. Posteriormente, a tampa foi pressionada para baixo até fechar o tubo. Com isso, forma-se um disco foliar com tamanho uniforme para todas as extrações das diferentes plantas. O tecido foi macerado dentro do mesmo tubo, utilizando-se pistilos estéreis, durante 15 segundos. Foram adicionados 400 µl do tampão de extração (200 mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) e as amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto (centrífuga *Eppendorf* 5415 D) e 300 µl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo. Foram adicionados 300 µl de isopropanol e as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuscitado em 100 µl de água milli-Q autoclavada. As amostras foram deixadas no gelo, pois as reações de PCR, para confirmação da presença do inserto nos transgênicos, foram feitas no mesmo dia. Depois, foram armazenadas na geladeira, a 4°C.

4.19 Checagem dos transgênicos por reações de PCR

Para confirmação das plantas transgênicas, foram feitas reações de PCR para cada um dos transformantes das duas construções (superexpressão e RNAi). Para ambas, foi utilizado um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) e um *primer* externo, que reconhece uma sequência externa à sequência de interesse, porém pertencente à região do T-DNA. Os *primers* utilizados para amplificação de cada construção foram os mesmos representados na Tabela 5 (item 4.16.4).

As reações de PCR foram feitas com 2,5 µl de cada extração de DNA genômico de folhas, 2,5 µl de 10X PCR Buffer minus Mg, 0,5 µl de mistura de dNTPs (10 mM cada), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de *primer forward* e 0,5 µl de *primer reverse* (10 µM cada), 0,2 µl da enzima *Taq* DNA Polymerase – 5U/µl (*Invitrogen*) e quantidades suficientes de água milli-Q autoclavada para volume final de 25 µl. O programa estabelecido foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, passando para 39 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 45 segundos a 50,5°C (pareamento) e 72°C por 1 minuto (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 72°C por 10 minutos e mantida a 10°C até serem retiradas do termociclador. As amostras foram armazenadas em *freezer* -20°C.

4.20 Polinizações controladas

Polinizações controladas de três tipos foram feitas para as plantas de superexpressão e de RNAi: 1) pólen de cada uma das plantas transgênicas em pistilos de uma planta SR1, para observar se há problema com o grão de pólen dos transgênicos; 2) pólen de SR1 no pistilo das plantas transgênicas, para observar se há possíveis falhas no pistilo destas; e 3) autopolinização das plantas transgênicas, para confirmar se estas plantas eram capazes de produzir frutos por autopolinização. Para tanto, com o auxílio de uma pinça histológica, as pétalas e os estames foram retirados das flores do estágio 11 (com anteras ainda fechadas), com cuidado para não destacá-las dos ramos. Com o pistilo exposto, os grãos de pólen foram colocados na superfície do estigma, por contato entre os estames da flor de interesse com o estigma da flor a ser polinizada. Após, um canudo foi encaixado no pistilo de forma a cobri-lo, e a extremidade oposta do canudo foi fechada com uma fita adesiva. As flores foram identificadas por fitas coloridas amarradas na base das flores, com uma cor específica para cada um dos três tipos de polinização. A fita colorida foi mantida até que os frutos estivessem secos, de cor marrom, quando foram retirados das plantas e guardados em envelopes de papel, devidamente identificados. Após estarem completamente secos, os frutos foram abertos e suas sementes foram armazenadas em tubos Eppendorf de 1,5 ml.

4.21 Expressão transiente em folhas

4.21.1 Infiltração de folhas de *N. tabacum* e *N. benthamiana*

Uma colônia de *Agrobacterium* contendo a construção S/S_F-box + pK7FWG2 (fusão com GFP) e uma colônia contendo a construção S/S_F-box + pK7YWG2 (fusão com YFP), já checadas por PCR, e também outra colônia contendo o vetor de controle positivo (pCAMBIA1302), de expressão da proteína GFP, foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido com os antibióticos adequados, deixando-se os inóculos a 28°C com agitação de 200 rpm. Após 24 horas de cultivo, cada cultura foi centrifugada em um tubo de 1,5 ml, a 8000 rpm por 2 minutos. O precipitado de células foi ressuscitado em 500 µl de meio de infiltração (MES 10 mM e MgCl₂ 10 mM). A densidade óptica (D.O.) de cada suspensão foi determinada por leitura da absorbância a 600 nm, sendo a D.O. entre 0,2-0,3 ideal para infiltração (SAWERS *et al.*, 2006). A D.O. foi ajustada para o valor 0,3, acrescentando-se mais meio de infiltração. Foram feitos dois tipos de infiltração: uma contendo a construção S/S_F-

box + pK7FWG2 (GFP) apenas, e a outra contendo o vetor S/S_F-box + pK7YWG2 (YFP) junto ao pCAMBIA1302. Para a segunda infiltração, a dupla de vetores foi unida em meio de infiltração, com a D.O. de 0,3 para cada um. Posteriormente, foi adicionado acetoseringona ao meio (concentração final: 100 μ M), e cada suspensão foi colocada em uma seringa de 1 ml, utilizada para infiltrar o meio nas folhas de *N. tabacum* e de *N. benthamiana*. Após leve ferimento com a seringa, na superfície abaxial das folhas, uma pequena pressão foi exercida permitindo a entrada do meio de infiltração dentro dos tecidos foliares, contendo as agrobactérias transformadas. Após infiltração, as plantas foram mantidas a temperatura ambiente por 2-3 dias.

4.21.2 Análises no microscópio confocal

Cortes das folhas infiltradas foram colocados em lâminas cobertas por lamínulas e analisados em microscópio confocal (Leica TCS SP5 Confocal Microscope), localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, FMRP-USP (professor responsável: Prof. Dr. Roy Edward Larson). O *software* utilizado foi o *Leica LAS – AF LITE*. O laser utilizado foi o do argônio, e o comprimento de onda para excitação de cada fluoróforo foi: 488 nm para o GFP dos vetores pCAMBIA1302 e pK7FWG2 e 514 nm para o YFP do vetor pK7YWG2. A captação no detector foi feita nos comprimentos de onda 500-590 nm para GFP e 548-600 nm para YFP. Para a infiltração S/S_F-box + pK7YWG2 juntamente ao vetor pCAMBIA1302, foram feitas aquisições sequenciais, isto é, cada laser foi ligado por vez para evitar *cross-talk* entre as aquisições (excitação de um fluoróforo em comprimento de excitação diferente do seu). As imagens adquiridas foram editadas utilizando-se o mesmo *software*. Como controle negativo dos experimentos, foram utilizadas folhas de *N. tabacum* e *N. benthamiana* não infiltradas.

4.22 Ensaio de Duplo-híbrido

Os experimentos de duplo-híbrido foram realizados com o kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology (*Invitrogen*), baseado no sistema Gateway de recombinação. Os controles positivos e negativo utilizados para os experimentos foram: controle positivo de interação forte (Krev1-RalGDS-wt); controle positivo de interação fraca (Krev1-RalGDS-m1), e controle de interação negativa (Krev1-RalGDS-m2), todos presentes no

kit. Para os experimentos, o gene S/S_F-box foi utilizado como isca. As presas utilizadas foram aquelas presentes na biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos, construída em vetor de expressão adequado ao sistema de duplo-híbrido. O meio de cultura SC (item 4.23), utilizado nos experimentos, tem como característica ausência de todos os suplementos nutritivos. Para seleção das colônias de interesse, o meio SC foi preparado adicionando-se todos os suplementos, exceto leucina, triptofano e histidina, que foram adicionados ou não, de acordo com a seleção desejada. Soluções de cada um destes aminoácidos foram apropriadamente preparadas para suplementação quando necessário (leucina 100 mM; triptofano 40 mM; histidina 100 mM), adicionando-se 80 µl de cada solução requerida para cada 10 ml de meio SC.

4.22.1 Clonagem da CDS de S/S_F-box (isca) no vetor pDEST32

A biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletos para uso no sistema de duplo-híbrido, disponível em nosso laboratório, foi construída no vetor pDEST22 (*Invitrogen*), que possui a sequência do domínio de ativação (AD) do fator de transcrição GAL4 (Figura 15). Dessa forma, a biblioteca contém as presas (*prey*) clonadas no pDEST22. O vetor de expressão utilizado para a clonagem da isca (*bait*), isto é, o gene de estudo, é o pDEST32 (*Invitrogen*) (Figura 16), que contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição GAL4. A CDS de S/S_F-box foi clonada no vetor pDEST32 a partir de uma reação LR entre a sequência de S/S_F-box, já clonada no vetor de entrada do sistema Gateway (construção superexpressão + pDONR221 – item 4.15.2), e o vetor pDEST32. A reação LR foi feita como descrito em 4.15.3. Após recombinação, 1,5 µl da reação foram utilizados para transformação de células DH10B, via eletroporação. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com gentamicina (5µg/ml) e o DNA plasmidial foi extraído de dez colônias isoladas obtidas, pelo método da lizozima. Para verificar a presença do inserto, o DNA plasmidial de cada colônia foi digerido com a enzima EcoRI. Uma colônia positiva foi selecionada para extração de DNA plasmidial por kit. Para tanto, a partir do estoque em glicerol da colônia selecionada (preparação de estoque em glicerol descrita no item 4.4), estriou-se uma placa para a nova extração de DNA plasmidial. Ao final, o DNA foi sequenciado.

Figura 15. Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST22 (*Invitrogen*), para clonagem das presas, via recombinação pela reação LR (sistema Gateway). O vetor apresenta o gene que confere resistência à ampicilina em bactérias e o gene *TRP1*, que codifica uma enzima da via de biossíntese do triptofano, para seleção em leveduras. Os cDNAs da biblioteca foram clonados neste vetor, produzindo-se as presas. A sequência dos cDNAs fusionam-se à sequência do domínio de ativação (AD) do fator de transcrição GAL4, na porção 3' de AD. Um sinal de localização nuclear (NLS) está fusionado à sequência AD. As presas são clonadas por recombinação entre os sítios *attL*, presentes nas presas, com os sítios *attR*, presentes no vetor.

Figura 16. Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST32 (*Invitrogen*), para clonagem da isca, via recombinação pela reação LR (sistema Gateway). O vetor apresenta o gene que confere resistência à gentamicina em bactérias e o gene *Leu2*, que codifica uma proteína da via de biossíntese do aminoácido leucina, para seleção em leveduras. A CDS de S/S_F-box foi clonada neste vetor, através da recombinação entre os sítios *attL*, presentes na construção superexpressão + pDONR221, com os sítios *attR* do vetor pDEST32. A sequência da isca fusiona-se à sequência do domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição GAL4, na porção 3' de DBD.

4.22.2 Preparação de células de levedura competentes

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a (trp1-901; leu2-3,112; ura3-52; his3-200; gal4Δ; gal80Δ; GAL2-ADE2; lys2::GAL1-HIS3; met2::GAL7-lacZ), que apresenta os genes repórteres *HIS3* (para histidina), *ADE2* (para adenina) e *lacZ*, foi recuperada do estoque em glicerol, estriando-se em uma placa contendo meio YPAD (item 4.23), incubada por 3 dias, a 30°C. Uma colônia isolada foi raspada da placa com o auxílio de uma alça de platina e ressuspensa em 50 µl de água milli-Q estéril. A suspensão de células foi plaqueada novamente em meio YPAD, incubando-se a placa a 30°C durante a noite. No dia seguinte, as células crescidas no centro da placa foram coletadas e ressuspensas em 5 ml de água milli-Q estéril. A suspensão foi transferida para um Erlenmeyer contendo 100 ml de meio YPAD líquido, até que a D.O. atingisse um valor próximo a 0,1, a 600 nm. O frasco foi colocado em incubadora a 30°C, sob agitação, até que a D.O. atingisse o valor próximo a 0,4. A cultura foi dividida em dois tubos Falcon de 50 ml, sendo centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos (centrífuga *Eppendorf* 5810 R), a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de células foi gentilmente ressuspensa em 20 ml de água destilada e autoclavada, a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições. O precipitado de células foi ressuspensa em 10 ml de TE/LiAc 1X (solução estoque: 10X TE [100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, autoclavado] e 10X LiAc [acetato de lítio 1 M, esterilizado em filtro]). Centrifugou-se novamente e o precipitado foi ressuspensa em 175 µl da mesma solução, juntando-se o volume dos dois tubos. Foram preparadas alíquotas de 50 µl cada, sendo armazenadas em *freezer* -80°C.

Leveduras competentes contendo a construção S/S F-box + pDEST32: Uma alíquota de células competentes (50 µl) foi adicionada em um tubo de 1,5 ml juntamente com 600 ng da construção S/S_F-box + pDEST32. As leveduras foram transformadas com essa construção, como descrito no item a seguir (4.22.3). A transformação foi plaqueada em meio SC sem Leucina (SC-Leu) para seleção das células que incorporaram a construção. Posteriormente, uma colônia isolada foi selecionada para preparação de células competentes contendo a construção de interesse, como mostrado acima (item 4.22.2).

4.22.3 Transformação de leveduras

A transformação de leveduras foi feita pelo método do choque-térmico. Para tanto, adicionou-se, em um tubo de 1,5 ml, 50 µl de células de levedura competentes, 5 µl de carreador de DNA fresco (esperma de salmão sonicado – 50 µg) e o DNA de interesse (600 ng para preparação de leveduras competentes contendo a construção S/S_F-box + pDEST32 e para os testes de auto-ativação; 1 µg para transformação com a biblioteca). O tubo foi gentilmente agitado por pipetagem. Foram adicionados 300 µl de 40% PEG-3350 (*polyethylene glycol*) / 1X LiAc / 1X TE estéril, misturando-se o conteúdo. Os tubos foram incubados, em banho-maria, a 30°C por 30 minutos, e imediatamente transferidos para outro banho, a 42°C, deixados por 15 minutos, para que ocorresse o choque-térmico. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7000 x g por 30 segundos (centrífuga *Eppendorf* 5415 D). O sobrenadante foi removido e o precipitado de células foi ressuspensionado em 200 µl de solução NaCl 0,09%. Cada suspensão foi plaqueada no meio de cultura adequado.

4.22.4 Teste de auto-ativação

Da isca: Células de levedura competentes contendo a construção S/S_F-box + pDEST32 foram transformadas com 500 ng do vetor pDEST22 vazio, para testar se a proteína híbrida DBD-S/S_F-box, expressa juntamente com o domínio AD, é capaz de auto-ativar o sistema. O produto da transformação foi distribuído em placa contendo meio de cultura SC sem Leucina e sem Triptofano (SC-Leu-Trp), para seleção dos transformantes, incubada a 30°C por 48 horas. Uma colônia isolada obtida foi inoculada em meio líquido SC-Leu-Trp e incubada a 30°C, 220 rpm por 48 horas. Após este período, a concentração de células foi estimada medindo-se a DO_{600} da cultura. Esta foi diluída para a concentração $DO_{600} = 0,2$, a qual foi novamente submetida a diluições seriadas 1:5. Todas estas diluições foram aplicadas em placas contendo SC-Leu-Trp-His (sem Histidina), incubadas a 30°C por 48 horas. Se houver crescimento de colônias, a isca, sozinha, auto-ativa o sistema. Se não houver crescimento, a isca não ativa o sistema, podendo ser utilizada para o *screening* na biblioteca de duplo-híbrido.

Das presas: O teste de auto-ativação para as presas foi feito da mesma forma que para a isca. Porém, foi feita co-transformação em células de levedura sem nenhuma construção,

com o vetor pDEST22 contendo a presa de teste e o vetor pDEST32 vazio. A co-transformação foi plaqueada em meio SC-Leu-Trp para seleção dos transformantes para ambos os vetores. Após crescimento em meio líquido, a transformação foi plaqueada em meio SC-Leu-Trp-His, como descrito para o teste com a isca.

4.22.5 *Screening* da biblioteca

Para o *screening* da biblioteca de cDNAs, construída para uso no sistema de duplo-híbrido, foram utilizadas células de levedura competentes contendo a construção S/S_F-box + pDEST32. Foram realizadas 30 transformações, quantidade necessária para obtenção de 10^6 transformantes (a eficiência de transformação foi previamente determinada em nosso laboratório), sendo, de acordo com o protocolo, a quantidade ideal de transformantes para a realização do *screening*. Para cada uma das transformações, foram utilizados: uma alíquota da levedura competente contendo a construção S/S_F-box + pDEST32; 1 µg de DNA da biblioteca; 5 µl de esperma de salmão sonificado (50 µg) e 300 µl de 40% PEG-3350 / 1X LiAc / 1X TE estéril. Os 30 tubos foram cuidadosamente homogeneizados e incubados a 30°C por 30 minutos. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 36 µl de DMSO (*dimethyl sulfoxide*) estéril (*Sigma*) e a preparação foi agitada cuidadosamente. As transformações por choque-térmico foram feitas de acordo com o descrito em 4.22.3. Cada suspensão de células foi plaqueada em uma placa de Petri de 15 cm contendo meio SC-Leu-Trp-His, sendo o gene *HIS3* utilizado como gene repórter neste momento. As 30 placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e, em seguida, mais 48 horas a temperatura ambiente.

Após este período, as colônias que cresceram neste meio seletivo foram inoculadas em 1,5 ml de meio líquido SC-Leu-Trp em placas de cultura de 96 poços (Greiner) e mantidas a 30°C, 250 rpm por 48 horas. Após crescimento, 300 µl de cada cultura foram utilizados para a obtenção de estoque em glicerol 20% e armazenados a -80°C. Uma alíquota de 200 µl de cada cultura foi transferida para placas de 96 poços (Corning). O restante da cultura, presente na placa de cultura, foi centrifugado a 1250 x g por 5 minutos (centrífuga *Eppendorf* 5810 R). O precipitado de células foi armazenado a -20°C até o momento de extração do DNA plasmidial das leveduras.

4.22.6 Análise do fenótipo dos transformantes para os genes repórteres

A placa de 96 poços (Corning) contendo os 200 µl de cada cultura foi utilizada como molde para replicar as culturas em placas de Petri de 15 cm, contendo os meios seletivos de cada um dos genes repórteres (SC-Leu-Trp-His para *HIS3*; SC-Leu-Trp-Ade, sem Adenina, para *ADE2* [meio SC preparado com todos os suplementos nutritivos, exceto leucina, triptofano e adenina]; YPAD para *lacZ*). Para tanto, um replicador de 96 poços (Boekel), estéril, foi inserido nos 96 poços da placa. O replicador (carimbo) foi levantado e colocado em cima de cada um dos meios para seleção de cada gene repórter, preparados em placas de Petri de 15 cm. A primeira réplica foi realizada em meio seletivo SC-Leu-Trp, servindo de controle do crescimento das células para os testes com os genes repórteres. As células foram obtidas em formato de *spots*.

A segunda réplica foi feita em meio seletivo SC-Leu-Trp-His, para testar novamente os clones de interação com S/S_F-box para o gene repórter *HIS3*. A terceira réplica foi feita em meio SC-Leu-Trp-Ade, para seleção dos clones positivos para o gene repórter para adenina. A quarta réplica foi feita em meio YPAD, contendo uma membrana de nylon Hybond -N+ (Amersham Biosciences) sobre o meio. Todas as células devem crescer neste meio, sobre a membrana. As réplicas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após esse período, foram analisadas as colônias que cresceram nos diferentes meios seletivos.

Para o teste com o *lacZ*, a membrana foi delicadamente retirada da placa com auxílio de uma pinça e imersa em nitrogênio líquido por 30 segundos, para rompimento das células. Cada membrana foi posicionada sobre duas folhas de papel filtro (125-mm *Whatman* 541), sobre uma placa de Petri de 15 cm, e saturadas em uma solução de 100 µl de X-gal em DMF (10 mg X-gal – 5-bromo-5-chloro-3-indolul- β -Dgalactoside; 100 µl DMF – *N,N*-dimethyl formamide), 60 µl de 2-mercaptoethanol e 10 ml de Buffer Z (pH 7,0; 16,1g Na₂HPO₄•7H₂O; 5,5 g NaH₂PO₄•H₂O; 0,75 g KCl; e 0,246 g MgSO₄•7H₂O por litro). As placas foram incubadas em estufa a 37°C. O acompanhamento do processo de coloração azul deve ocorrer no período de 24 horas. A coloração ocorre a partir da ativação do gene repórter *lacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase, capaz de converter X-gal em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, sendo este último de coloração azul. Após esse teste, as colônias que apresentarem coloração azul, são consideradas positivas.

4.22.7 Extração de DNA plasmidial de leveduras

Algumas das colônias positivas para o teste com os genes repórteres foram selecionadas para identificação da presa, podendo corresponder a um parceiro de interação de S/S_F-box. Para isso, colônias precipitadas na placa de cultura (descrito em 4.22.5) foram ressuspensas em 100 µl de solução SDS 3% e NaOH 0,2 N, recém preparada, sendo transferidas para tubos de 1,5 ml. Estes foram incubados a temperatura ambiente por 15 minutos, mexendo-se ocasionalmente por inversão. Foram adicionados 500 µl de TE, agitando-se novamente por inversão. Foram adicionados 60 µl de acetato de sódio 3 M, agitando-se os tubos. Adicionou-se 600 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitando-se os tubos em vortex por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos (centrífuga *Eppendorf* 5415 D). O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo novamente adicionado 600 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Centrifugou-se e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Adicionou-se 650 µl de isopropanol gelado, mexendo-se por inversão. Os tubos foram incubados a -20°C por pelo menos 20 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao precipitado 100 µl de etanol 70%, para lavagem. Novamente centrifugou-se nas mesmas condições, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensado em 10 µl de TE e armazenado em *freezer* -20°C.

4.22.8 Identificação das presas

Para identificação dos possíveis parceiros de interação (presas) de S/S_F-box, 1 µl do DNA plasmidial extraído de levedura de cada clone foi inserido em células DH10B de bactérias, por eletroporação. Posteriormente, todo o conteúdo da transformação (1 ml) foi plaqueado em meio LB suplementado com ampicilina (100µg/ml) para seleção das células que incorporaram apenas o plasmídeo da presa, o pDEST22. Após crescimento, seis colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas no mesmo meio de cultura, contendo o mesmo antibiótico. Após 16-20 horas, o DNA plasmidial de todas as colônias foi extraído pelo método da lisozima (item 4.4.1) e, posteriormente, checados com a enzima de restrição BsrGI. Após eletroforese em gel de agarose, as colônias selecionadas foram levadas para sequenciamento. Após obtenção das sequências, estas foram analisadas nos bancos de

dados *GenBank* e TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), pela ferramenta *tblastx*, comparando-se com as sequências já existentes nestes bancos.

4.22.9 Re-transformação das leveduras com pDEST22-presas

Cada DNA obtido das presas foi novamente inserido em leveduras competentes contendo a construção S/S_F-box + pDEST32. As transformações foram realizadas de acordo com o item 4.22.3 e as células foram plaqueadas em meio SC-Leu-Trp-His para testar a interação mediante a ativação do gene repórter *HIS3*. Neste caso, o crescimento dos transformantes neste meio indica que a interação entre S/S_F-box e a presa correspondente é positiva.

4.23 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados dissolvendo-se os respectivos componentes em água destilada, ajustando-se o pH quando necessário. Os meios foram autoclavados para esterilização.

Meio LB (*Luria-Bertani*) para bactérias – 1 l: 10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; quantidades suficientes de água destilada para 1 l. Para o meio LB sólido, foram adicionados 15 g de ágar bacteriológico para cada litro de meio líquido (1,5%).

Meio MS para plantas (MURASHIGE & SKOOG, 1962): 4,4g/l de meio MS (*Sigma*), contendo os sais e as vitaminas; 30g/l de sacarose; 0,5 g de MES. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4 N. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 7 g de ágar (*DIFCO*) para cada litro de meio líquido.

Meio M-250: meio MS sólido, 1µg/ml de BAP (*benzilaminopurina*), 250µg/ml de cefotaxima e 200µg/ml de canamicina.

Meio M-300: meio MS sólido, 0,1µg/ml de NAA (*ácido naftaleno acético*), 1µg/ml de BAP (*benzilaminopurina*), 500µg/ml de cefotaxima e 200µg/ml de canamicina.

Meio 5X A: 13,8 g de K_2HPO_4 ; 4,5 g de KH_2PO_4 ; 1 g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 g de citrato de sódio. Foi adicionada água destilada em quantidades suficientes para 200 ml. O meio foi autoclavado.

Meio MAS (*Minimum A Sucrose*): 50 ml de meio 5X A; 2,5 ml de sacarose 20% (esterilizada em filtro e armazenada a 4°C); 0,5 ml de $MgSO_4$ 20% (autoclavado e armazenado a 4°C); 0,125 ml de tiamina (10mg/ml - esterilizada em filtro e armazenada a -20°C). O volume foi completado para 245 ml com água destilada autoclavada contendo 3 g de ágar bacteriológico.

Meio YPAD para leveduras – 1 l: 10 g extrato de levedura; 20 g peptona; 100 mg sulfato de adenina; 20 g dextrose; água destilada em quantidades suficientes para 1 l. O pH foi ajustado para 6,0 com HCl.

Meio SC para leveduras (*Synthetic Complete Medium*) – 0,5 l: 3,35 g *Yeast Nitrogen Base without aminoacids* (YNB); 0,675 g de mistura de suplementos nutritivos*; água destilada em quantidades suficientes para 0,5 l. O pH foi ajustado para 5,9 com NaOH. Para o meio SC sólido, adicionou-se 10 g de ágar para levedura. Após ser autoclavado, foi adicionado ao meio 25 ml de glicose 40%.

*mistura de suplementos nutritivos: 500 mg de cada componente: adenina, alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, isoleucina, glicina, valina, tirosina, treonina, uracila, lisina, metionina, fenilalanina, prolina e serina.

4.24 Antibióticos utilizados

Para preparação dos estoques, quantidades apropriadas de cada antibiótico foram pesadas e dissolvidas em água milli-Q, sendo as soluções esterilizadas em filtro de 0,22 µm. O volume foi aliquotado em tubos de 1,5 ml e armazenados em *freezer* -20°C. As concentrações dos antibióticos utilizados para cada construção estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração dos antibióticos utilizados nos meios de cultura (sólido e líquido) para cada construção e a concentração de seus respectivos estoques.

Vetor	Construção	<i>E. coli</i>	<i>Agrobacterium</i>	Estoque
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Clonagem de S/S_F-box	canamicina [50µg/ml]	-	[50mg/ml]
pDONR221	Entrada no sistema Gateway	canamicina [50µg/ml]	-	
pK7WG2	Superexpressão	estreptomicina [12,5µg/ml]	estreptomicina [300µg/ml]	[12,5mg/ml]
pK7GWIWG2(I)	RNAi			
pK7FWG2	Fusão com GFP	espectinomicina [50µg/ml]	espectinomicina [100µg/ml]	[50mg/ml]
pK7YWG2	Fusão com YFP			
pDEST32	Duplo-híbrido	gentamicina [5µg/ml]	-	[5mg/ml]
pDEST22	Duplo-híbrido	ampicilina [100µg/ml]	-	[100mg/ml]

Para seleção das plantas transgênicas, o antibiótico canamicina foi utilizado, na concentração 200µg/ml. Para o vetor pCAMBIA1302, utilizado como controle positivo para os experimentos de expressão transiente, o antibiótico utilizado foi canamicina (50µg/ml).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação de genes F-box expressos no pistilo de *Nicotiana tabacum*

Inicialmente, quando as bibliotecas de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum* foram construídas em nosso laboratório, foram identificados 24 clones da biblioteca TOBEST (QUIAPIM *et al.*, 2009) e um clone da biblioteca subtrativa (SSH) (DEPAOLI, 2006) que possivelmente correspondiam a genes codificadores de proteínas F-box. Para a biblioteca SSH, a anotação foi feita manualmente, no entanto os clones da biblioteca TOBEST foram identificados por anotação automatizada, através de ferramentas de bioinformática (QUIAPIM *et al.*, 2009). No presente trabalho, os 24 clones da biblioteca TOBEST foram analisados manualmente, para confirmar se os mesmos correspondiam a genes da família F-box. Utilizando-se o programa *tblastx* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), nove dos 24 clones foram identificados como correspondentes a genes que codificam proteínas F-box, sendo que os clones restantes apresentaram alta similaridade a enzimas conjugadoras da ubiquitina (enzimas E2), proteínas contendo domínios *zinc-finger* e proteínas SKP1, que não possuem o domínio F-box. Dessa forma, um total de dez clones correspondentes a genes da família F-box foram identificados nas bibliotecas do TOBEST e SSH.

Utilizando-se o programa *tblastx* do banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), foram encontrados os genes ortólogos em *Arabidopsis thaliana* de cada um dos dez clones de *N. tabacum*. *Arabidopsis* tem sido amplamente utilizada como modelo de estudo dentre as angiospermas e possui o genoma sequenciado. Conhecendo-se o ortólogo de cada clone em *Arabidopsis*, torna-se mais fácil verificar se os genes identificados já foram funcionalmente caracterizados. Dessa forma, buscas na literatura foram realizadas, tendo como referência os ortólogos, com o objetivo de eliminar os genes já bem descritos e conhecidos como material de estudo. Dos dez clones analisados, cinco corresponderam a genes com função definida e os outros cinco não apresentaram função conhecida. Os dez clones identificados nas bibliotecas TOBEST e SSH, assim como seus respectivos ortólogos em *Arabidopsis* e a função de cinco deles, estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Clones identificados nas bibliotecas TOBEST e SSH referentes a genes que codificam proteínas F-box e seus respectivos ortólogos encontrados no genoma de *Arabidopsis*. Cinco genes já foram funcionalmente caracterizados.

Biblioteca	Clones F-box (<i>N. tabacum</i>)	Ortólogo em <i>Arabidopsis</i>	Função
TOBEST	035H05	AT3G62980.1	TIR1 - receptor de auxina (DHARMASIRI <i>et al.</i> , 2005; KEPINSKI & LEYSER, 2005)
	046F05	AT1G21410.1	SKP2A - regulador da divisão celular (JURADO <i>et al.</i> , 2008)
	102G12	AT2G25490.1	EBF1 - percepção de etileno (POTUSCHAK <i>et al.</i> , 2003)
	104F05	AT3G26810.1	AFB2 - receptor de auxina (PARRY <i>et al.</i> , 2009)
	118H01	AT1G47056.1	VFB1 - respostas de defesa (BURG <i>et al.</i> , 2008)
	030H09	AT4G15475.1	desconhecida
	055B08	AT3G47150.1	desconhecida
	085H05	AT5G60570.1	desconhecida
	130H05	AT5G57900.1	desconhecida
SSH	SSH-002E09	AT5G52880.1	desconhecida

Os cinco clones referentes a genes de função desconhecida foram selecionados para análise da expressão gênica nos diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos de *N. tabacum*. Para isso, novas reações de sequenciamento foram realizadas para obtenção de sequências confiáveis de cada clone, para desenho dos *primers* de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

5.2 Determinação da expressão dos genes correspondentes aos clones selecionados

Os níveis de expressão dos genes F-box referentes a cada um dos cinco clones de funções desconhecidas foram analisados por qRT-PCR. Para tanto, a partir de plantas controle (cultivar SR1) de *N. tabacum*, 500 mg de cada um dos tecidos (raiz, caule, folha, sépala, pétala, estame, estigma/estilete e ovário) foram coletados e o RNA foi separadamente extraído, servindo como molde para a síntese de cDNA. Os genes de referência utilizados, previamente determinados em nosso laboratório, foram *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e *RPL2* (*ribosomal protein L2*), ambos de expressão constitutiva nos diferentes órgãos de *N. tabacum*. O padrão de expressão dos cinco genes pode ser observado na Figura 17.

Figura 17. Padrões de expressão dos cinco genes referentes aos clones selecionados, nos diferentes tecidos vegetativos (raiz, caule e folha) e reprodutivos (sépala, pétala, estame, estigma/estilete (E/E) e ovário). Os gráficos **A**, **B**, **C** e **D** representam os padrões de expressão dos genes referentes aos clones 030H09, 055B08, 085H05 e 130H05, respectivamente, do TOBEST. O gráfico **E** representa o padrão de expressão do gene referente ao clone SSH-002E09, oriundo da biblioteca SSH. Os gráficos mostram a quantificação relativa (RQ) normalizada aos níveis de expressão dos genes de referência *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e *RPL2* (ribosomal protein L2).

Como observado na Figura 17, os genes referentes aos clones 030H09 (Figura 17-A) e 055B08 (Figura 17-B) apresentaram padrões de expressão semelhantes, com o maior nível de expressão no estame e o menor nível na folha. Para estes genes, os níveis de expressão nos órgãos reprodutivos não apresentaram grandes diferenças quando comparados aos níveis de expressão nos órgãos vegetativos. Já para o gene referente ao clone 085H05 (Figura 17-C), essa diferença foi bastante notável, onde os níveis de expressão apresentaram-se bem maiores na pétala e no estame quando comparados aos órgãos vegetativos. Com exceção da sépala, os níveis de expressão nos dois outros tecidos reprodutivos, estigma/estilete e ovário, também apresentaram-se maiores em relação aos órgãos vegetativos. O gene referente ao clone 130H05 (Figura 17-D) apresentou grande expressão no ovário e no caule, com os menores níveis de expressão na raiz e na folha. O último gene, referente ao clone SSH-002E09 da biblioteca SSH (Figura 17-E), apresentou maiores níveis de expressão no ovário, no caule e no estame e níveis menores de expressão na folha.

Dentre os cinco genes analisados, foi escolhido para caracterização aquele que apresentou maiores níveis de expressão nos órgãos reprodutivos em comparação com os órgãos vegetativos. Dessa forma, o clone 085H05 da biblioteca TOBEST (Figura 17-C) foi selecionado para caracterização e estudo de sua função.

5.3 Expressão do gene referente ao clone 085H05 durante o desenvolvimento floral

Para melhor compreender a papel do gene correspondente ao clone 085H05 nos órgãos reprodutivos, seu nível de expressão foi avaliado em cada um dos 12 estádios do desenvolvimento floral de *N. tabacum* (descritos por KOLTUNOW *et al.*, 1990), por qRT-PCR. O estigma/estilete foi selecionado para esta análise já que é o principal tecido de estudo em nosso laboratório. Para isso, 100 mg de estigmas/estiletos de cada estágio foram separadamente coletados, a partir de plantas controle SR1. O RNA de cada um deles foi extraído, servindo como molde para a síntese de cDNA. Os genes de referência utilizados nesse experimento também foram o *GAPDH* e o *RPL2*. O padrão de expressão do gene referente ao clone 085H05, ao longo do desenvolvimento do estigma/estilete, pode ser observado na Figura 18.

Figura 18. Padrão de expressão do gene correspondente ao clone 085H05 no estigma/estilete de *N. tabacum* durante os 12 estádios do desenvolvimento floral. O gráfico mostra a quantificação relativa (RQ) normalizada à expressão dos genes de referência *GAPDH* e *RPL2*. A representação das flores nos diferentes estádios do desenvolvimento foi retirada de KOLTUNOW *et al.* (1990).

O gráfico mostra que o gene referente ao clone 085H05 apresenta baixos níveis de expressão no início do desenvolvimento do estigma/estilete (estádio 1), aumentando ao longo dos estádios e, por fim, atingindo o maior nível de expressão na antese (estádio 12). O estágio 11 foi o único estágio que apresentou nível de expressão menor que o do estágio anterior. Do estágio 1 ao estágio 6, o nível de expressão aumenta ligeiramente, de forma gradual. Na transição do estágio 6 para o estágio 7 do desenvolvimento, o nível de expressão do gene apresenta grande aumento, de aproximadamente o dobro. Do estágio 8 até o estágio 10, os níveis de expressão aumentam sucessivamente, até que, momentos antes da antese (estádio 11), há leve redução na expressão do gene, que atinge o maior nível de expressão quando a flor está madura (estádio 12).

5.4 Obtenção da CDS do gene correspondente ao clone 085H05

O clone 085H05 é um cDNA que não apresenta a sequência codificadora (CDS) completa do seu gene correspondente. Como a CDS do gene referente ao clone 085H05 não é conhecida em *N. tabacum*, a estratégia utilizada foi montar a CDS com base em sequências já depositadas em bancos de dados, que se assemelhavam à sequência do clone 085H05, de 495pb (pares de base). Para isso, foram utilizados os programas *blast* dos bancos de dados SOL (*SOLanaceae Genomics Network*) e DFCI (*The Gene Index - Dana-Farber Cancer Institute*), onde a sequência do clone 085H05 foi utilizada na busca de sequências similares. No banco de dados SOL, foram encontradas três sequências *unigenes* similares à 085H05: SGN-U430680, que alinhou no início do clone e SGN-U4565000 e SGN-U4565001, que alinharam na porção final da sequência de 085H05. No banco de dados DFCI, a sequência TC166500 foi encontrada, que alinhou com a sequência completa de 085H05. O alinhamento das quatro sequências encontradas nos bancos de dados resultou na provável CDS do gene referente à 085H05, desde o códon de iniciação (ATG), até o códon de terminação (*stop* códon). A partir dessas análises, foi possível prever a CDS do gene correspondente ao clone 085H05, com um tamanho de 1203pb. A tradução da sequência teórica gerada, realizada com a ferramenta *ExPASyTranslate* (<http://web.expasy.org/translate/>), resultou em uma sequência protéica de 400 aminoácidos.

Para tornar a sequência teórica criada mais confiável, foram realizadas análises por *blastp* no banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), utilizando-se a sequência de 400 aminoácidos como molde. Foi observada uma similaridade de 79% e identidade de 70% com a proteína do gene AT5G60570.1, o mesmo gene identificado como ortólogo do clone 085H05 em *Arabidopsis* (ver Tabela 7). Os resultados foram considerados válidos para tentativa de amplificação da CDS do gene referente ao clone 085H05.

5.5 Amplificação da CDS do gene correspondente ao clone 085H05

A partir da sequência teórica gerada, foram desenhados *primers* flanqueando a possível CDS. A reação de PCR para amplificação do fragmento desejado, de 1203pb (Figura 19), foi feita a partir de 10 ng de uma mistura de cDNAs de estigmas/estiletos dos 12 estádios do desenvolvimento floral de *N. tabacum*.

Figura 19. Obtenção, por PCR, da CDS completa do gene referente ao clone 085H05. O fragmento desejado (*amplicon*), de aproximadamente 1200pb, foi obtido. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

A banda esperada de 1203pb obtida foi purificada do gel de agarose e o produto foi clonado no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®]. Células de *E. coli* DH10B foram eletroporadas. Para confirmação da clonagem, o DNA extraído de dez colônias obtidas a partir da transformação foi digerido com a enzima de restrição EcoRI (Figura 20). O padrão esperado da digestão foram duas bandas, uma de 3913pb e a outra de 1221pb.

Figura 20. Checagem da clonagem do produto da PCR no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®], por digestão enzimática. Após a clonagem, o tamanho do vetor + inserto foi de 5134pb. As digestões foram realizadas com a enzima EcoRI, utilizando-se DNAs de dez mini-preparações (1–10) oriundas de dez colônias distintas da transformação. As colônias 1, 2, 3, 8 e 10 apresentaram o padrão esperado: bandas de 3913pb e 1221pb. O rastro ao final do gel equivale ao RNA extraído juntamente ao DNA durante a mini-preparação pelo método da lisozima. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. **n/d.** DNA não digerido. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

O DNA da colônia 8 foi selecionado para sequenciamento. Após sequenciamento, a CDS do gene referente ao clone 085H05 foi obtida, e o gene passou a ser denominado S/S_F-box (*Stigma/Style*_F-box – F-box do estigma/estilete).

5.6 Análises *in silico* da sequência de S/S_F-box

O sequenciamento completo de S/S_F-box (DNA referente à colônia 8) revelou exatamente o tamanho esperado de 1203pb, sendo que a sequência obtida pelo sequenciamento apresentou-se muito semelhante à sequência teórica criada, com modificação de apenas seis nucleotídeos. Análises da sequência de aminoácidos no programa *Motif Scan* (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), a partir da sequência obtida pelo sequenciamento, mostraram que a proteína, de 400 aminoácidos, possui o domínio F-box, contendo 48 resíduos de aminoácidos e localizado na porção amino-terminal da sequência, além de dois domínios do tipo *kelch*, localizados na parte carboxi-terminal da proteína (Figura 21), com 47 resíduos de aminoácidos cada um. Os domínios *kelch* são separados um do outro por apenas um aminoácido. Os três domínios encontrados atuam na interação proteína-proteína.

Figura 21. Representação da proteína linearizada codificada por S/S_F-box. Análises no programa *Motif Scan* revelaram a presença do domínio F-box (48 aminoácidos), localizado na porção amino-terminal (N-terminal) da sequência de aminoácidos. Na parte carboxi-terminal (C-terminal) da proteína, foram identificados dois domínios do tipo *kelch*, que foram denominados domínio *kelch* 1 e domínio *kelch* 2 (47 aminoácidos cada domínio). A letra M localizada no início da proteína representa a metionina inicial da mesma.

Utilizando-se como molde a sequência de nucleotídeos de S/S_F-box, foi feita uma busca pela sua sequência genômica correspondente no banco de dados SOL, que possui sequências genômicas parciais de *N. tabacum* depositadas. O *contig* processed_tobacco_genome_sequences_c15854 obtido revelou que a CDS de S/S_F-box não é interrompida por íntrons. Análises da sequência genômica do ortólogo de S/S_F-box em

Arabidopsis (AT5G60570.1) revelaram que o mesmo também não apresenta a CDS interrompida por íntrons (Figura 22).

Figura 22. Representação da sequência genômica do ortólogo de S/S_F-box em *Arabidopsis*. A sequência apresenta dois éxons (representados em caixas) separados por um íntron (representado em linha). O elemento representado em caixa cinza escuro corresponde a CDS, que não é interrompida por íntrons. As caixas em cinza claro representam as regiões 5' e 3' UTRs (*Untranslated regions*). Esquema retirado do banco de dados TAIR, quando o gene AT5G60570.1 é acessado.

O ortólogo de S/S_F-box em *Arabidopsis* foi analisado no programa *GeneMANIA* (<http://www.genemania.org/>), que contém mapas de interação de proteínas que são criados com base em artigos já publicados. A análise revelou que o gene AT5G60570.1 de *Arabidopsis* apresenta interação física com a proteína WOL1 (*wooden leg 1*) / AHK4 (*Arabidopsis histidine kinase 4*) / CRE1 (*cytokinin response 1*), um receptor de citocinina (gene AT2G01830). A interação predita pelo programa se baseou em um experimento de duplo-híbrido (DORTAY *et al.*, 2008), onde foram feitos ensaios utilizando-se receptores de citocinina como iscas.

5.7 Checagem das construções: superexpressão, RNAi e em fusão com GFP

Para obtenção das plantas transgênicas de superexpressão e de RNAi (silenciamento) e para os experimentos de expressão transiente com fusão com a proteína GFP, as sequências desejadas de cada construção foram clonadas em vetores de expressão em plantas. A estratégia de clonagem utilizada foi o sistema Gateway de recombinação (*Invitrogen*). Para tanto, sítios de recombinação foram inseridos nos fragmentos desejados de cada construção e estes foram clonados no vetor pDONR221 (*Invitrogen*), vetor de entrada no sistema Gateway. Posteriormente, cada fragmento foi transferido para os respectivos vetores de expressão em plantas (vetores de destino), a partir de reações de recombinação.

5.7.1 Obtenção dos fragmentos desejados

A partir de duas reações de PCR consecutivas (PCR1 e PCR2), foram inseridos os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* nas extremidades do fragmento de interesse de cada uma das construções, permitindo assim a ocorrência de recombinação do fragmento desejado com o vetor pDONR221. O DNA molde utilizado nas reações da PCR1 foi aquele referente à colônia 8 positiva da construção S/S_F-box + pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Figura 20). As sequências-molde para as reações de PCR2 foram os produtos da PCR1, purificados do gel de agarose.

Superexpressão:

Na construção de superexpressão, o fragmento desejado abrange toda a região codificadora (1203pb), sendo os tamanhos dos fragmentos esperados, após PCR1 e PCR2, de 1245pb e 1279pb, respectivamente (Figura 23-A).

Fusão com GFP:

Para a construção de fusão com a proteína GFP, foi escolhido fazer a fusão do fragmento desejado com a sequência nucleotídica de GFP correspondente à porção amino-terminal de GFP (fusão S/S_F-box::GFP), para que a fusão não ocorresse próximo ao domínio F-box presente na porção amino-terminal da proteína de S/S_F-box. Dessa forma, o fragmento de interesse abrange toda a região codificadora, exceto o códon de terminação (1200pb), para não haver parada da tradução entre uma sequência e outra. Após a PCR1, o tamanho do fragmento esperado foi de 1242pb e, após a PCR2, o tamanho esperado foi de 1276pb (Figura 23-B).

RNAi:

Para a construção de RNAi, o tamanho do fragmento escolhido foi de 360pb, correspondente à região da sequência de S/S_F-box que não possui nenhum domínio conservado. Esta região tem início após o domínio *kelch* 2 e vai até o códon de terminação. Após a PCR1, o fragmento desejado tem tamanho esperado de 387pb e, após a segunda PCR, o tamanho esperado foi de 421pb (Figura 23-C).

Figura 23. Produtos das reações de PCR1 e PCR2 para inserção dos sítios *attB1* e *attB2* nas extremidades dos fragmentos desejados de cada construção: **A)** Superexpressão. Os fragmentos esperados de 1245pb (PCR1) e 1279pb (PCR2) foram obtidos; **B)** Fusão com GFP. Os fragmentos esperados de 1242pb (PCR1) e 1276pb (PCR2) foram obtidos; **C)** Silenciamento (RNAi). Os fragmentos esperados de 387pb (PCR1) e 421pb (PCR2) foram obtidos. Os géis são demonstrativos, onde foram aplicadas alíquotas de cada reação de PCR para representação, já que o molde da PCR2 é o produto da PCR1. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

As bandas esperadas de cada uma das reações de PCR para as três construções foram obtidas. Os produtos das reações de PCR2 foram purificados dos géis de agarose para clonagem no vetor pDONR221.

5.7.2 Recombinação dos fragmentos com o vetor de entrada

Os produtos das reações de PCR2 foram clonados no vetor de entrada pDONR221, mediante recombinação BP. Células de *E. coli* DH10B foram separadamente eletroporadas com cada uma das construções (superexpressão + pDONR221; RNAi + pDONR221; e fusão com GFP + pDONR221). O DNA plasmidial de oito colônias obtidas de cada construção foi extraído e checado por digestões enzimáticas.

As construções de superexpressão e de fusão com GFP, já recombinadas com o vetor de entrada, apresentam tamanho de 3765pb e 3762pb, respectivamente, com diferença de apenas 3pb, já que o fragmento desejado para fusão com GFP não possui o códon de terminação. Tais construções foram checadas com duas enzimas de restrição, PvuII e SfiI, em duas digestões distintas. A enzima PvuII apresenta um sítio de restrição na sequência do vetor e um sítio dentro da sequência de S/S_F-box, formando, portanto, duas bandas na digestão, com os padrões esperados de 1942pb e 1823pb para a construção de superexpressão e de 1942pb e 1820pb para a construção de fusão com GFP. Já a enzima SfiI corta uma única vez dentro da sequência de S/S_F-box, linearizando o vetor e confirmando a presença do fragmento recombinado com o vetor de entrada. Os padrões de bandas esperados foram obtidos e estão representados nas Figuras 24 e 25.

Figura 24. Checagem da construção superexpressão + pDONR221. O DNA plasmidial de oito colônias originadas da transformação foi extraído. **A)** Checagem com a enzima PvuII. As oito colônias apresentaram o padrão de digestão esperado: 1942pb e 1823pb. **B)** Digestões com a enzima SfiI mostraram a banda com tamanho esperado do vetor linearizado de 3765pb em todas as colônias. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Figura 25. Checagem da construção fusão com GFP + pDONR221. O DNA plasmidial de oito colônias originadas da transformação foi extraído. **A)** Digestões com a enzima PvuII apresentaram o padrão esperado: 1942pb e 1820pb. As bandas de menor peso molecular do marcador não estão representadas, pois a corrida foi deixada por bastante tempo para melhor observação das duas bandas esperadas, que apresentam tamanho aproximado. **B)** Checagens com a enzima SfiI mostraram a banda com tamanho esperado do vetor linearizado de 3762pb. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Para checagem da construção RNAi + pDONR221, as mesmas enzimas, PvuII e SfiI, foram utilizadas. O tamanho do vetor pDONR221 recombinado com o fragmento escolhido para a construção de RNAi foi de 2937pb. Os padrões de bandas esperados de 1942pb e 995pb para a enzima PvuII e de 2937pb para SfiI foram obtidos (Figura 26).

Figura 26. Checagem da construção RNAi + pDONR221. O DNA plasmidial de oito colônias originadas da transformação foi extraído. **A)** Digestões com PvuII apresentaram o padrão de bandas esperado,

de 1942pb e 995pb. **B)** Digestões com a enzima SfiI mostraram a banda de tamanho esperado, de 2937pb. O DNA referente à colônia 4 não mostrou o padrão esperado em ambas as digestões, sendo portanto descartado. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Os DNAs plasmidiais provenientes das colônias 5, 7 e 2 das construções de superexpressão, de fusão com GFP e de RNAi, respectivamente, foram selecionados para sequenciamento. Após confirmação das sequências, o DNA plasmidial de cada construção foi utilizado para recombinação com os vetores de expressão em plantas (vetores de destino).

5.7.3 Recombinação dos vetores de entrada com os vetores de destino

Os DNAs de cada uma das colônias selecionadas de cada construção, clonadas no vetor de entrada pDONR221, foram recombinados com os respectivos vetores de expressão em plantas, mediante reação LR. Células de *E. coli* DH10B foram separadamente eletroporadas com cada uma das construções e o DNA plasmidial de oito colônias obtidas foi extraído. Os vetores de expressão em plantas utilizados para as construções de superexpressão, de fusão com GFP e de RNAi foram pK7WG2 (Figura 10), pK7FWG2 (Figura 12) e pK7GWIWG2(I) (Figura 11), respectivamente, todos construídos para uso no sistema Gateway (KARIMI *et al.*, 2002). As recombinações foram checadas por digestões enzimáticas.

As construções de superexpressão e de fusão com GFP foram checadas com as enzimas de restrição BanII e EcoRV. Após recombinação, ambas as construções passaram a ter quatro sítios de restrição para BanII. A enzima EcoRV corta as construções em três sítios. Após recombinação LR, a construção superexpressão + pK7WG2 possui tamanho de 10724pb. A construção fusão com GFP + pK7FWG2 tem tamanho de 11439pb. Os padrões esperados para as duas digestões foram obtidos e estão representados nas Figuras 27 e 28.

Figura 27. Checagem da construção superexpressão + pK7WG2. O DNA plasmidial de oito colônias originadas da transformação foi extraído. **A)** Digestões com a enzima BanII apresentaram o padrão esperado: 7312pb, 2176pb, 818pb e 418pb. **(B)** As digestões com a enzima EcoRV mostraram o padrão de bandas esperado, de 9261pb, 1277pb e 187pb. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Figura 28. Checagem da construção fusão com GFP + pK7FWG2. O DNA plasmidial de oito colônias originadas da transformação foi extraído. **A)** Digestões com BanII apresentaram o padrão esperado: 7312pb, 2176pb, 1133pb e 818pb. Os DNAs provenientes das colônias 1, 2 e 3 foram digeridos apenas parcialmente e, portanto, mostraram um padrão não esperado de bandas. **B)** Digestões com EcoRV mostraram as bandas de tamanhos esperados, de 9982pb, 1274pb e 187pb. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

A construção de RNAi foi checada com as enzimas de restrição HindIII e SpeI. Após recombinação LR, a construção RNAi + pK7GWIWG2(I) possui tamanho de 11015pb. Apesar

do tamanho do inserto de RNAi ser de apenas 360pb, no vetor de silenciamento o fragmento é recombinado duas vezes para a formação do *hairpin*. Os padrões de bandas esperados foram obtidos (Figura 29).

Figura 29. Checagem da construção de RNAi + pK7GWIWG2(I). O DNA plasmidial de oito colônias originadas da transformação foi extraído. **A)** Digestões com HindIII tiveram o padrão esperado, com fragmentos de tamanhos de 9127pb e aproximadamente 1888pb. As bandas de aproximadamente 1888pb das colônias 2 e 8 estão um pouco mais altas que as demais. **B)** Digestões com SpeI mostraram bandas de tamanho esperado apenas nas colônias 2 e 8, de 9877pb, 1086pb e 52pb (a banda de 52pb não apareceu no gel pois há um rastro de RNA, oriundo da extração de DNA plasmidial pelo método da lisozima, no mesmo local em que a banda deveria aparecer. Adicionalmente, devido ao fato deste fragmento ser muito pequeno, seria necessária uma maior quantidade de DNA digerido para sua visualização). **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Os DNAs plasmidiais provenientes das colônias 1, 4 e 2 das construções de superexpressão, de fusão com GFP e de RNAi, respectivamente, foram selecionados para sequenciamento. Após confirmação das sequências, o DNA plasmidial de cada construção foi utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.

5.8 Checagem das colônias de *Agrobacterium* contendo os vetores de expressão

Para transformação de *Agrobacterium*, foram utilizados 1 µg de DNA plasmidial referente às colônias positivas 1, 4 e 2 selecionadas das construções de superexpressão, de fusão com GFP e de RNAi, respectivamente. Os DNAs de seis colônias obtidas para cada transformação foram checados por reações de PCR, para confirmação da presença dos

vetores de expressão dentro de *Agrobacterium*, que será utilizada para infecção de plantas. Para as reações de PCR, foi utilizado um *primer* externo, que parecia no vetor de expressão correspondente de cada construção, e um *primer* interno, que parecia na sequência do fragmento clonado em cada construção, para maior confiabilidade de que as agrobactérias foram transformadas com o vetor de interesse contendo o fragmento desejado. As reações de PCR referentes à construção de superexpressão geram um *amplicon* de 526pb (Figura 30-A), enquanto as referentes à construção de RNAi amplificam uma região de 571pb (Figura 30-B). As reações de PCR referentes à construção de fusão com GFP geram um *amplicon* de 531pb (Figura 30-C).

Figura 30. Reações de PCR para confirmação da transformação de *A. tumefaciens* para cada construção. **A)** Superexpressão: apenas as colônias 1 (banda bastante fraca) e 5 foram positivas, apresentando o tamanho de banda esperado de 526pb. O rastro ao final do gel equivale aos *primers* excedentes na reação. **B)** RNAi: as 6 colônias checadas apresentaram o fragmento esperado, de 571pb. **C)** Fusão com GFP: todas as colônias checadas foram positivas, apresentando a banda esperada de 531pb. **Legenda:** c- = controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

As colônias 5, 1 e 1 de *Agrobacterium* contendo as construções de superexpressão, de RNAi e de fusão com GFP, respectivamente, foram selecionadas para infecção de plantas.

5.9 Obtenção das plantas transgênicas estáveis: superexpressão e RNAi

Na tentativa de compreender o papel de S/S_F-box na planta de *N. tabacum*, foram produzidas plantas transgênicas com aumento na expressão deste gene e plantas com redução na expressão do mesmo (RNAi). As plantas transgênicas foram obtidas a partir da infecção de discos foliares estéreis de *N. tabacum* (SR1) via *Agrobacterium*, contendo uma das construções de interesse (superexpressão ou silenciamento – RNAi, separadamente). Com a infecção, há transferência do T-DNA da agrobactéria para o genoma da célula vegetal. As células transformadas, que se tornam resistentes à canamicina, se dividem no meio seletivo formando calos que, posteriormente, dão origem a brotos. Os brotos são transferidos para sucessivos meios de cultura, contendo um agente seletivo (em nossos experimentos, canamicina) e um balanço de hormônios adequado, até enraizarem e darem origem às plantas, que são posteriormente levadas para casa de vegetação.

Para cada transformação, foram utilizadas as colônias de *Agrobacterium* que continham a construção de interesse, consideradas positivas através de checagem por PCR (colônia 5 para superexpressão e colônia 1 para RNAi – Figura 30). Para ambas as transformações, foram obtidos aproximadamente 60 calos. Destes, aproximadamente 30 calos de cada construção geraram brotos no meio de indução de parte aérea, sendo estes, então, transferidos para o meio de indução de raiz. De cada calo, foram transferidos no mínimo dois brotos, para ocasional perda de um dos brotos nas manipulações durante a cultura de tecidos (contaminação com fungos e bactérias, ou ausência de enraizamento). Dessa forma, foram geradas plântulas de diversas transformações independentes (cada calo representa um evento de transformação) e também representantes de um mesmo evento de transformação (brotos originados do mesmo calo). Ao final da cultura de tecidos, foram obtidos, para a construção de RNAi, 16 transformantes independentes. Já para a construção de superexpressão, 23 transgênicos distintos foram obtidos. Os transformantes de cada construção foram transferidos para saquinhos com terra, substrato e adubo natural. Plantas SR1 foram utilizadas como controle para os experimentos, que cresceram, sem adição de agente seletivo no meio de cultura, junto aos transgênicos.

5.10 Confirmação da transgenia das plantas obtidas

Apesar das plantas transformadas terem crescido em meio seletivo contendo canamicina, a transgenia em cada uma das plantas só foi confirmada após a identificação de sequências da construção gênica de interesse, introduzidas no genoma das plantas. Essa confirmação foi feita por reações de PCR, utilizando-se como molde DNA genômico extraído de folhas jovens de cada um das plantas obtidas. Para tanto, um *primer* específico para cada uma das construções (superexpressão e RNAi) foi utilizado para amplificação, junto a um *primer* que reconhece uma região externa adjacente à sequência de interesse, mas que também foi integrada ao genoma da planta por fazer parte do T-DNA. Essa estratégia de um *primer* interno e um *primer* externo à sequência de interesse é utilizada para confirmar a integração do T-DNA e amplificar exclusivamente a sequência que foi introduzida no genoma, e não a sequência gênica de S/S_F-box já existente na planta. Para ambas as construções, o *primer* externo utilizado foi aquele que pareia com uma sequência do terminador 35S.

Para as reações de PCR realizadas com DNA genômico das plantas de RNAi, as bandas esperadas foram de 515pb (Figura 31-A), enquanto para as reações realizadas com DNA das plantas de superexpressão, a banda esperada tem tamanho de 493pb (Figura 31-B).

Figura 31. Análise dos produtos das reações de PCR, realizadas para confirmação das plantas transgênicas. Apenas alguns transformantes estão aqui representados. **A)** Confirmação da transgenia das plantas de RNAi. As canaletas 1-5 representam reações de PCR realizadas com DNA genômico extraído de 5 plantas controle (SR1), não apresentando, portanto, a banda esperada; as canaletas 6-16 representam 11 transformantes independentes de RNAi, todos contendo a banda esperada de 515pb. **B)** Confirmação da transgenia das plantas de superexpressão. As canaletas 1, 2 e 4 representam as reações de PCR realizadas com DNA genômico das plantas controle (SR1), enquanto

as canaletas 5-15 representam 11 transformantes independentes de superexpressão, apresentando a banda esperada de 493pb. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Todos os transformantes independentes de cada uma das construções foram checados. Do total de 16 plantas transgênicas de RNAi, quatro não foram confirmadas pela PCR, já que a banda esperada não foi observada. Das 23 plantas de superexpressão, apenas uma única não apresentou a banda de interesse. Essas plantas não confirmadas foram descartadas para evitar futuros erros de análise.

5.11 As plantas de RNAi

5.11.1 Análise da parte vegetativa

Os 12 transformantes independentes de RNAi foram primeiramente mantidos em câmara de germinação com temperatura, umidade e luminosidade controladas, dentro de saquinhos contendo substrato e adubo natural. Nesse período, quando as plantas ainda eram jovens, oito dos 12 transformantes apresentaram algumas diferenças vegetativas quando comparados com as plantas controle SR1 (Figura 32). Plantas selvagens de *N. tabacum* apresentam crescimento vertical pelo desenvolvimento da gema apical, sendo que as gemas laterais estão em dormência. Oito transformantes de RNAi apresentaram desenvolvimento das gemas laterais, que deram origem a folhas e ramos (Figura 32-A). Devido a isso, essas plantas apresentaram, além do ápice principal onde está localizada a gema apical, um ou mais ápices que tiveram origem das gemas laterais (Figura 32-B). Além disso, foram observadas características de necrose no ápice principal das plantas (Figura 32-C) e também nas extremidades de algumas folhas dos oito transformantes (Figura 32-D).

Figura 32. Fenótipo da parte vegetativa observado em oito dos 12 transformantes independentes de RNAi. **A)** Desenvolvimento das gemas laterais em folhas, indicado pelas setas vermelhas. **B)** Desenvolvimento da gema lateral em um ramo (seta vermelha). A seta branca indica o ápice principal da planta contendo a gema apical. **C)** Um dos transformantes de RNAi, originado do calo de número 34, comparado com a planta controle SR1. A seta vermelha indica um ramo desenvolvido de uma das gemas laterais. As setas brancas apontam o ápice principal das plantas. Nota-se que SR1 possui um único ápice, e o transformante 34.1 possui dois ápices. **D)** A seta branca indica o ápice principal da planta com características de necrose. A seta vermelha indica um ramo lateral em formação. **E)** Folha de um dos transformantes de RNAi, com a extremidade necrosada.

Todas as 12 plantas de RNAi foram levadas para casa de vegetação e transferidas para vasos maiores. Durante o crescimento, quatro delas morreram provavelmente devido à falha na aplicação de herbicida por terceiros ao redor da casa de vegetação, que acabou penetrando pela tela da estufa e atingindo essas plantas. Dentre as quatro, uma delas havia apresentado os fenótipos descritos. Dessa forma, restaram oito transformantes independentes de RNAi, que cresceram até o florescimento. Durante esse crescimento, não foram observadas diferenças fenotípicas entre as plantas de RNAi e as plantas controle, já que o próprio controle (SR1), quando em casa de vegetação, desenvolve ramos originados de gemas laterais que antes estavam em dormência, devido às condições da casa de vegetação (por exemplo inclinação da planta, tombada pelo vento ou mesmo pelo seu peso, expondo as gemas laterais para crescimento).

5.11.2 Análise da flor

Como o gene *S/S_F-box* apresenta maiores níveis de expressão nos órgãos florais, estes foram cuidadosamente analisados nas plantas de RNAi. Pétala, estames, estigma/estilete e ovário foram observados durante os 12 estádios do desenvolvimento da flor, comparando-se com o controle SR1. Para tanto, foram feitas medições das flores, com o auxílio de um paquímetro, sendo estas classificadas em cada estádio de acordo com seu tamanho (tamanhos descritos por KOLTUNOW *et al.*, 1990). Foi observado que, das oito plantas de RNAi, quatro delas aparentavam ter flores menores do que as flores de SR1 nos três últimos estádios do desenvolvimento (10, 11 e 12), já que são os únicos estádios onde se é possível observar macroscopicamente características que os definem naquele estádio, independentemente do tamanho da flor: no estádio 10, o topo da corola começa a se abrir, de coloração rosa claro; no estádio 11, o topo da corola, rosado, abre-se mais um pouco, tornando-se possível a visualização do estigma (Figura 33-A); no estádio 12, as flores já estão abertas, com o topo da corola bastante rosado e as anteras começam a se abrir, liberando os grãos de pólen (Figura 33-B). Nos estádios anteriores (1-9), a classificação macroscópica em estádios é feita apenas pelo tamanho das flores, pois elas não apresentam nenhuma característica detectável a olho nu que as diferenciem de um estádio para outro. Em vista disso, para as plantas de RNAi, apenas os estádios 11 e 12 foram avaliados (Figura 33).

Figura 33. Flores de plantas de RNAi comparadas com o controle SR1. Os transformantes aqui representados são 30.1, 33.1 e 34.1. **A)** Flores no estágio 11 do desenvolvimento. Observa-se que as flores da planta 30.1 apresentam o mesmo tamanho que as flores de SR1. Já as flores das plantas 33.1 e 34.1 são menores que as flores do controle. Outros dois transformantes, 17.2 e 23.3 (não mostrados aqui), também apresentaram flores de tamanho reduzido. **B)** Flores no estágio 12 do desenvolvimento. Como no estágio 11, as flores da planta 30.1 apresentaram tamanho semelhante às flores de SR1, enquanto as flores das plantas 33.1 e 34.1 apresentaram-se menores que o controle.

Como mostrado na Figura 33, foram observadas flores do mesmo tamanho que as flores de SR1 (plantas 13.2, 19.2, 21.3 – não mostradas, e 30.1) e flores de 0,5 a 1 cm menores que as flores das plantas controle (plantas 17.2, 23.3 e, as mostradas na figura, 33.1 e 34.1). Observações do estigma/estilete mostraram que, para as flores que apresentaram o fenótipo de menor tamanho, estes tecidos apresentaram-se menores do que o controle SR1 (Figura 34). Além disso, para as mesmas plantas, o ovário também apresentou-se de tamanho reduzido (Figura 35).

Figura 34. Pistilos no estágio 11 do desenvolvimento comparados com o controle SR1 no mesmo estágio. Observa-se que o comprimento do estilete é menor nas flores das plantas 33.1 e 34.1 do que SR1. O tamanho do ovário nessas plantas também é reduzido, diferentemente da flor da planta 30.1, que apresenta comprimento do estilete semelhante à SR1 e ovário com aproximadamente o mesmo tamanho.

Figura 35. Ovários de plantas de RNAi comparados com o controle SR1. Observa-se que o ovário das plantas 23.3, 33.1 e 34.1 são menores que o ovário de SR1. O ovário da planta 30.1 é de tamanho semelhante ao do controle.

5.11.3 Avaliação do nível de expressão de S/S_F-box nos transgênicos

O método de RNA de interferência (RNAi), utilizado para o “silenciamento” do gene de estudo, reduz a expressão de um gene por degradação dos RNAs mensageiros transcritos por ele, através de mecanismos de degradação semelhantes aos dos microRNAs (DOENCH & SHARP, 2004). Sendo assim, não há produção da proteína codificada por este gene. A

redução do nível de expressão de um gene, através do método de RNAi, pode variar de uma planta para outra. A determinação da redução da expressão do gene *S/S_F-box* em cada uma das plantas transgênicas de RNAi é fundamental para que se possa fazer uma correlação entre os níveis de expressão e o fenótipo observado e, também, para confirmação de que as plantas estão realmente com os níveis de expressão do gene de estudo reduzidos. Para tanto, foram feitas reações de qRT-PCR utilizando-se como molde 1 µg de RNAs de estigmas/estiletes do estágio 11 convertidos em cDNAs, para cada uma das oito plantas de RNAi (Figura 36). O estágio 11 foi selecionado para esta análise já que é facilmente detectável (não pelo tamanho, como já discutido) e pelo fato das anteras ainda não terem liberado os grãos de pólen (como no estágio 12), que poderiam cair na superfície do estigma e influenciar nos resultados.

Figura 36. Níveis de expressão de *S/S_F-box* no estigma/estilete (estádio 11) das oito plantas de RNAi, comparadas à SR1. O gráfico mostra a quantificação relativa (RQ) normalizada à expressão dos genes de referência *GAPDH* e *RPL2*.

Os resultados da Figura 36 mostram que todas as plantas de RNAi tiveram redução na expressão de *S/S_F-box*. Na maioria das plantas, a redução foi de aproximadamente 80% em relação à expressão desse gene no estigma/estilete da planta controle. Somente a planta 21.3 apresentou pouca redução no nível de expressão, de apenas 20% em relação ao controle.

5.11.4 Polinizações controladas

Com o objetivo de detectar se houve problemas na reprodução das plantas “silenciadas” para o gene S/S_F-box, foram feitas polinizações controladas de três tipos: 1) pólen de cada uma das plantas transgênicas em pistilos de uma planta SR1, para observar se há problema com o grão de pólen dos transgênicos; 2) pólen de SR1 no pistilo das plantas transgênicas, para observar se há possíveis falhas no pistilo destas; e 3) autopolinização das plantas transgênicas, para confirmar se estas plantas eram capazes de produzir frutos por autopolinização. Os três tipos de polinizações foram realizados para as oito plantas de RNAi, e foi observado que, em todos os casos, houve formação de fruto. Foi observado que os frutos resultantes de polinizações naturais nas plantas de RNAi que apresentaram flores de menor tamanho (17.2, 23.3, 33.1 e 34.1) pareciam ser menores quando comparados aos frutos de SR1. Porém, este dado foi apenas visual, já que nenhum estudo detalhado foi realizado para determinação do tamanho dos frutos dessas plantas.

5.12 As plantas de superexpressão

5.12.1 Análise da parte vegetativa

As 22 plantas de superexpressão obtidas foram, primeiramente, mantidas em câmara de germinação com temperatura, umidade e luminosidade controladas, dentro de saquinhos contendo substrato e adubo natural. Durante esse período, não foi observada nenhuma diferença morfológica entre as plantas transgênicas e o controle SR1, diferentemente das plantas de RNAi. Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, em vasos maiores. Nesse tempo, como já descrito, houve aplicação indevida de herbicida ao redor da casa de vegetação, matando seis do total de 22 plantas transgênicas de superexpressão, além de dois controles SR1. Dessa maneira, os 16 transformantes restantes e três plantas controles cresceram até o florescimento. Não foram observadas diferenças fenotípicas nos tecidos vegetativos das plantas de superexpressão quando comparadas à SR1, em nenhum momento do crescimento das plantas.

5.12.2 Análise da flor

Logo no início do florescimento, foi observado que dez dos 16 transformantes apresentaram uma diferença nas flores: o estilete estava mais alongado, projetando o estigma para fora da corola, sendo possível visualizá-lo desde estádios iniciais do desenvolvimento floral (Figura 37), diferente do que ocorre nas plantas controle SR1, onde o estigma só é visível nos estádios finais do desenvolvimento (estádios 11 e 12).

Figura 37. Flores das plantas de superexpressão em diferentes estádios do desenvolvimento (B, D e F), comparadas com o controle SR1 (A, C e E). **A)** Flores de SR1 em diferentes estádios. O estigma dessas flores apresenta-se inteiramente recoberto pela corola, sendo possível visualizá-lo apenas nos estádios finais do desenvolvimento floral, estádios 11 e 12. **B)** Flores de um transformante de superexpressão. Nota-se que o estigma se projeta para fora da corola, mesmo em estádios bastante iniciais do desenvolvimento floral. **C)** Flor de SR1 no estágio 11 do desenvolvimento. O comprimento do estilete acompanha o tamanho da corola. **D)** Uma flor de superexpressão no estágio 11 do desenvolvimento. Observa-se o estilete bastante alongado, projetando o estigma para fora da corola. **E)** Flor de SR1 no estágio 12 do desenvolvimento floral. O estigma/estilete (não visualizado em vista lateral) acompanha o tamanho da corola. **F)** Flor de uma das plantas de superexpressão no estágio 12 do desenvolvimento, apresentando o estilete bastante alongado para fora da corola.

O fenótipo descrito foi observado em dez plantas de superexpressão. Para melhor compreender o momento durante o desenvolvimento floral em que há alongamento do estilete e projeção do estigma para fora da corola, as flores de quatro dos transformantes que apresentaram o fenótipo (5.2, 10.1, 65.1 e 66.2) foram registradas nos 12 diferentes estádios, comparando-se com o controle SR1 (Figura 38). Nas quatro plantas de superexpressão analisadas, o alongamento excessivo do estilete foi observado em todos os estádios do desenvolvimento floral, desde os estádios iniciais, 1 e 2 (Figura 38-A,B), até o estágio 12, sendo que o estigma não se apresenta ao nível das anteras, como observado em todos os estádios do desenvolvimento de SR1. Como consequência do alongamento excessivo do estilete, essas plantas apresentaram o estigma projetado para fora da corola, observado desde o estágio 3 (Figura 38-C) até o estágio 12 do desenvolvimento. Além disso, observa-se que, a partir do estágio 3 (Figura 38-C), há um encurtamento do filete dos estames, sendo que as anteras apresentam o mesmo tamanho que as anteras do controle. Os fenótipos descritos foram também observados nos estádios posteriores (aqui representados: estádios 5, 9 e 11 - Figura 38-D,E,F). Nos últimos estádios (10, 11 e 12), o alongamento do estilete foi bastante evidente (Figuras 37-D, 37-F e 38-F). Observações destes últimos estádios indicaram que as flores das plantas de superexpressão não apresentaram alteração de tamanho, sendo este idêntico aos tamanhos descritos por KOLTUNOW *et al.* (1990). Dessa forma, as plantas de superexpressão apresentaram alterações morfológicas apenas nos órgãos masculino e feminino.

Além de o estilete estar mais alongado nas plantas de superexpressão e dos filetes dos estames apresentarem-se encurtados em relação à SR1, foi observado que, a partir do estágio 7, os estigmas dessas plantas também apresentaram-se um pouco maiores quando comparados aos estigmas das flores controle (Figura 39).

Figura 38. Flores de superexpressão (transformantes 5.2, 10.1, 65.1 e 66.2) em diferentes estádios do desenvolvimento, comparadas com o controle SR1. **A)** Flores no estágio 1 do desenvolvimento. Observa-se que o estilete está um pouco alongado nas plantas de superexpressão em relação ao controle. O estigma não se apresenta no mesmo nível das anteras. **B)** Flores no estágio 2 do desenvolvimento. **C)** Flores no estágio 3. A partir deste estágio, o estigma projeta-se para fora da corola e os filetes dos estames se encurtam. **D)** Flores no estágio 5. **E)** Flores no estágio 9 do desenvolvimento, apresentando o estilete alongado e o estigma bem acima das anteras. Observa-se o encurtamento do filete dos estames. **F)** Flores no estágio 11, apresentando o estilete bastante alongado quando comparado com SR1, além dos filetes dos estames encurtados (transformantes 5.2 e 10.1). As anteras apresentam-se do mesmo tamanho que as anteras de SR1.

Figura 39. Estigmas de flores de superexpressão comparados ao estigma de SR1. **A)** Estigmas no início do estágio 7. **B)** Estigmas no estágio 7 tardio. Observa-se a produção excessiva de exudato nas plantas transgênicas já neste estágio. **C)** Estigmas no estágio 8, bem maiores quando comparados à SR1. A quantidade de exudato produzida em SR1 neste estágio é observada em pequenas quantidades. **D e E)** Estigmas nos estádios 11 e 12, respectivamente. Nota-se maior concentração de exudato na superfície do estigma das plantas de superexpressão quando comparados ao controle.

Como mostrado na Figura 39, a partir do estágio 7 o estigma das plantas de superexpressão apresentam-se um pouco maiores do que os estigmas das flores de SR1. O estágio 7 é um estágio bastante amplo, pois engloba uma variação grande de tamanho (28-39 mm). Assim, foram analisados estigmas no início do estágio 7 (29 mm) e estigmas no

estádio 7 tardio (38 mm), para verificar se houve mudança de tamanho do estigma durante esse intervalo. Como mostrado na Figura 39-A, no início do estágio 7 o exudato ainda não é observado na superfície de nenhum dos estigmas. Na Figura 39-B, estágio 7 tardio, nota-se a presença de exudato, em grandes quantidades, nos estigmas das flores de superexpressão, o que não ocorre no estigma da flor controle. Exudato no estigma de SR1 é observado a partir do estágio 8, porém em pouquíssimas quantidades (Figura 39-C). Em SR1, a concentração de exudato apenas é maior no estágio 12, como observado na Figura 39-E. Já nas plantas transgênicas, o exudato é grandemente produzido durante o estágio 7 tardio (Figura 39-B) e as concentrações aumentam ao longo dos estádios posteriores, chegando a quantidades bastante elevadas nos estádios 11 e 12 (Figura 39-D,E).

Para finalizar as análises no pistilo, os ovários das plantas de superexpressão também foram analisados. Foi observado que, a partir do estágio 8 do desenvolvimento, os ovários das flores transgênicas apresentaram-se maiores que os ovários das flores de SR1 (Figura 40).

Os fenótipos descritos foram observados em dez dos 16 transformantes independentes de superexpressão do gene *S/S_F-box*. Constatou-se que o fenótipo era bastante aparente em flores de ramos jovens, da primeira florada. As primeiras flores que cresciam em um ramo novo apresentavam o estilete bastante alongado e o estigma e o ovário bem maiores quando comparados à SR1, além do encurtamento do filete do estame bastante evidente. Conforme novas flores cresciam no mesmo ramo, estas apresentavam os mesmos fenótipos, porém com menor evidência (estilete não tão alongado, estigmas e ovários apenas um pouco maiores do que os respectivos em SR1).

Figura 40. Ovários das flores de superexpressão comparados ao ovário da flor de SR1. **A)** A partir do estágio 8, observa-se que os ovários das plantas de superexpressão apresentam-se maiores que o controle. **B)** Ovários no estágio 10 do desenvolvimento. **C)** Ovários no estágio 12 do desenvolvimento floral.

5.12.3 Avaliação do nível de expressão de S/S_F-box nos transgênicos

Como feito para as plantas de RNAi, as plantas de superexpressão também tiveram os níveis de expressão do gene de estudo avaliados, para confirmação de que as plantas estavam realmente superexpressando o gene S/S_F-box. Para isso, 100 mg de estigma/estilete do estágio 11 de oito dos 10 transformantes que apresentaram os fenótipos descritos foram coletados para extração do RNA. O estágio 11 foi selecionado, pois já havia sido escolhido para as plantas de RNAi. Para tanto, o RNA foi convertido em cDNA e o nível

de expressão de S/S_F-box foi determinado no estigma/estilete de cada um dos transformantes (Figura 41), por qRT-PCR.

Figura 41. Níveis de expressão de S/S_F-box no estigma/estilete (estádio 11) das oito plantas de superexpressão selecionadas, comparadas à SR1. O gráfico mostra a quantificação relativa (RQ) normalizada à expressão dos genes de referência *GAPDH* e *RPL2*. **Legenda:** SE = superexpressão.

O gráfico da Figura 41 mostra que todas as plantas analisadas apresentaram aumento na expressão de S/S_F-box, como o esperado. O aumento da expressão deste gene nas plantas de superexpressão foi de três até aproximadamente dez vezes maior que a expressão de S/S_F-box no estigma/estilete (estádio 11) do controle SR1.

5.12.4 Polinizações controladas

Como descrito para as plantas de RNAi, foram feitos três tipos de polinizações nas plantas de superexpressão, para observar se houve falha na reprodução quando o gene S/S_F-box estava sendo expresso em grandes quantidades nas plantas. Observou-se que houve formação de frutos em todos os tipos de polinizações controladas. Além disso, verificou-se que houve polinização natural nas flores das plantas transgênicas, mesmo com as anteras localizadas abaixo do estigma. Porém, isto pode ter ocorrido com os grãos de pólen das flores vizinhas, que podem ter caído na superfície do estigma das flores que formaram frutos. Foi observado, também, que os frutos formados por polinizações naturais nas plantas de superexpressão apresentaram-se maiores quando comparados aos frutos de SR1. Nenhum estudo detalhado sobre o tamanho dos frutos foi realizado.

5.13 S/S_F-box não é regulado, a nível transcricional, por auxina

O fenótipo observado nas flores de superexpressão, de estigmas e estiletes maiores e de encurtamento do filete dos estames, se assemelha ao que foi observado em plantas *yuc2yuc6* de *Arabidopsis*, mutantes na via de biossíntese de auxina (CHENG *et al.*, 2006), e semelhante também ao fenótipo de pistilos tratados com NPA, um inibidor do transporte polar de auxina (NEMHAUSER *et al.*, 2000). Além disso, o fenótipo observado na parte vegetativa das plantas de RNAi, de desenvolvimento das gemas laterais, se assemelha também aos mutantes *yuc2yuc6* de *Arabidopsis*. Desta forma, surgem as perguntas: Será que a expressão do gene S/S_F-box é regulada por auxina? Será que a proteína S/S_F-box participa da via de síntese de auxina? Será que a proteína S/S_F-box participa da via de sinalização de auxina?

Para testar a hipótese de regulação da expressão por auxina, os níveis de expressão de S/S_F-box foram determinados em plantas transgênicas que tiveram aumento da produção de auxina no estigma, construídas em nosso laboratório pelo aluno de mestrado Luís Antônio Alves de Toledo Filho. Em resumo, plantas de *N. tabacum* foram transformadas com uma construção contendo o promotor de um gene específico do estigma (STIG1, descrito por GOLDMAN *et al.*, 1994) fusionado à sequência do gene *iaaM*, de *A. tumefaciens*, que codifica uma das enzimas da via de biossíntese da auxina a partir do triptofano. Assim, foram obtidas plantas com maiores quantidades de auxina produzida no estigma (plantas STIG1_{prom}::*iaaM*). Análises por qRT-PCR foram feitas para determinar a expressão de S/S_F-box nessas plantas, utilizando-se RNAs de estigmas/estiletes convertidos em cDNAs de três plantas obtidas, comparando-se com a expressão do gene nos mesmos tecidos de plantas SR1. Os estádios 3, 7 e 10 foram selecionados para análise. As três plantas selecionadas foram consideradas, cada uma, uma amostra biológica. Dessa forma, foi feita uma média aritmética para os resultados obtidos (Figura 42).

Figura 42. Avaliação do padrão de expressão de S/S_F-box no estigma/estilete de plantas com maior produção de auxina no estigma (STIG1_{prom}::iaaM), comparado ao padrão observado em SR1. Estigmas/estiletos foram coletados nos estádios 3, 7 e 10 de três plantas transgênicas distintas e de plantas SR1. O gráfico mostra a quantificação relativa (RQ) normalizada à expressão dos genes de referência *GAPDH* e *RPL2*.

Como observado na Figura 42, o gene S/S_F-box não apresentou diferença significativa em seus níveis de expressão avaliados nas plantas com aumento da produção de auxina, comparadas à SR1. Dessa forma, os resultados indicam que S/S_F-box não é regulado transcricionalmente por auxina.

5.14 Análise da localização subcelular da proteína de S/S_F-box

A localização da proteína codificada por S/S_F-box dentro das células foi analisada por expressão transiente em folhas. Para tanto, a colônia de *Agrobacterium* positiva, contendo a construção da sequência de S/S_F-box fusiona à sequência de GFP (colônia 1 – Figura 30-C), foi utilizada para infiltração de folhas jovens de *N. tabacum*. O vetor pCAMBIA1302, que expressa a proteína GFP, foi utilizado como controle positivo dos experimentos. A proteína GFP livre é expressa no citoplasma e, quando expressa em altas quantidades, pode entrar no núcleo (Figura 43-A) devido ao seu pequeno tamanho (aproximadamente 27kDa), atravessando, de forma passiva, os poros nucleares. A proteína S/S_F-box::GFP foi observada no citoplasma e, possivelmente, no núcleo celular (Figura 43-B). Poucas células transformadas foram observadas neste experimento.

Figura 43. Microscopia confocal de folhas de *N. tabacum* em ensaios de expressão transiente. Os vetores de expressão em plantas foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens*, que foram infiltradas em folhas jovens. **A)** Controle positivo (vetor pCambia1302), que expressa a proteína GFP. Esta proteína apresenta localização citoplasmática e nuclear. **B)** Célula da epiderme foliar expressando a proteína S/S_F-box em fusão com a proteína verde GFP, indicando localização no citoplasma e, possivelmente, no núcleo celular. A imagem B apresenta as sobreposições de imagens do canal de captação de GFP (verde) e daquele referente à detecção de cloroplastos (vermelho). O comprimento de onda do laser utilizado para excitação da GFP para ambas as imagens foi de 488 nm.

Não foi possível utilizar o corante marcador de núcleo DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*) para confirmação de que a estrutura arredondada observada na Figura 43-B representa verdadeiramente o núcleo da célula, pois o laser utilizado para captação deste marcador não estava disponível no microscópio confocal SP5 (FMRP-USP), utilizado para aquisição das imagens. Na tentativa de comprovar a localização da proteína S/S_F-box no núcleo, a estratégia utilizada foi infiltrar folhas, concomitantemente, com dois vetores de expressão, um deles sendo o controle positivo (pCambia1302), que expressa a proteína GFP, juntamente a uma construção de S/S_F-box fusionada à uma proteína fluorescente que não a GFP, para serem detectadas separadamente. Se a proteína S/S_F-box fusionada a outro gene repórter estiver co-localizando com GFP, admite-se a localização da proteína S/S_F-box nos mesmos locais que a proteína GFP, ou seja, no citoplasma e no núcleo. Para tanto, foi selecionado o vetor pK7YWG2 (Figura 13) (KARIMI *et al.*, 2002) para clonagem de S/S_F-box. Este vetor é bastante semelhante ao vetor pK7FWG2, utilizado para fusão de S/S_F-box com GFP, com a diferença que o primeiro possui a sequência da proteína

YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) ao invés da sequência de GFP. A sequência de S/S_F-box, também sem o *stop* códon, foi clonada no vetor pK7YWG2, para expressão da proteína S/S_F-box::YFP. A clonagem foi realizada da mesma forma que para a construção de fusão com GFP, mediante reação LR entre a construção de fusão com GFP + pDONR221 (colônia 7 positiva, Figura 26) com o vetor pK7YWG2. O DNA plasmidial de quatro colônias obtidas foi extraído e checado com as enzimas de restrição BanII e EcoRV. Após recombinação, a construção fusão com YFP + pK7YWG2 tem tamanho de 11439pb. Os padrões esperados para as duas digestões foram obtidos e estão representados na Figura 44-A. Para transformação de *Agrobacterium*, foi utilizado 1 µg de DNA plasmidial referente à colônia positiva 1. Os DNAs de seis colônias de *Agrobacterium* transformadas foram extraídos e checados por reações de PCR, para confirmação da presença do vetor de expressão dentro de *Agrobacterium*. As reações de PCR referentes à construção de fusão com YFP geram um *amplicon* de 531pb (Figura 44-B). A colônia 1 de *Agrobacterium* contendo a construção de fusão com YFP foi selecionada para infiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana*, que são mais facilmente infiltradas do que folhas de *N. tabacum*. Juntamente, agrobactérias contendo o vetor pCAMBIA1302 foram infiltradas nas mesmas folhas (Figura 45).

Figura 44. A) Checagem da construção fusão com YFP + pK7YWG2. O DNA plasmidial de quatro colônias originadas da transformação foi extraído. Digestões com BanII (canaletas 1-4) apresentaram o padrão esperado: 7312pb, 2176pb, 1133pb e 818pb. Digestões com EcoRV (canaletas 5-8) mostraram as bandas de tamanhos esperados, de 9982pb, 1274pb e 187pb (a menor banda não pode ser visualizada devido ao RNA presente ao final do gel, extraído juntamente ao DNA plasmidial pelo método da lisozima). A colônia 4 (canaletas 4 e 8) não apresentou DNA plasmidial. **B)** Reações de PCR para confirmação da transformação de seis colônias de *A. tumefaciens* com a construção

fusão com YFP + pK7YWG2. Todas as colônias checadas foram positivas, apresentando a banda esperada de 531pb. **Legenda:** c- = controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

Figura 45. Microscopia confocal de folhas de *N. benthamiana* em ensaios de expressão transiente. **A)** Controle positivo de localização citoplasmática e no núcleo celular (vetor pCambia1302). O comprimento de onda do laser utilizado para excitação da GFP foi de 488 nm. **B)** Célula da epiderme foliar expressando a proteína S/S_F-box em fusão com a proteína YFP. O comprimento de onda do laser utilizado para excitação da YFP foi de 514 nm. As aquisições das imagens **A** e **B** foram realizadas na mesma região da lâmina, obtendo-se as mesmas células em ambas as aquisições. **C)** Sobreposição (*merge*) das imagens A e B, indicando a co-localização de GFP e de S/S_F-box::YFP. **D)** Uma célula expressando S/S_F-box::YFP, com localização citoplasmática e em uma estrutura que se assemelha ao núcleo celular.

A Figura 45 mostra que a proteína S/S_F-box::YFP apresenta a mesma localização subcelular da proteína GFP livre: citoplasma e núcleo (os núcleos marcados são de células adjacentes à célula central da imagem, que provavelmente também apresenta o núcleo marcado, mas que está localizado em uma secção da célula diferente da selecionada para a aquisição). A observação de S/S_F-box localizada nas mesmas estruturas arredondadas que GFP indica localização de S/S_F-box, além de citoplasmática, também no núcleo celular.

5.15 Busca por possíveis parceiros de interação de S/S_F-box

A proteína S/S_F-box apresenta três domínios de interação com outras proteínas: o domínio F-box na porção amino-terminal da proteína e dois domínios *kelch* na porção carboxi-terminal da mesma. Baseando-se nesse fato e, na tentativa de compreender a função dessa proteína, foi realizada uma busca por parceiros de interação de S/S_F-box através do *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes construída para uso no sistema de duplo-híbrido.

5.15.1 Clonagem da CDS de S/S_F-box no vetor pDEST32: obtenção da isca

Foi construída, em nosso laboratório (parte do projeto de Doutorado de Edward J. Strini), uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum* construída em vetor de expressão adequado ao sistema de duplo-híbrido. Para tanto, os cDNAs foram clonados no vetor de expressão pDEST22 (Figura 15), que contém a sequência do domínio de ativação (AD) do fator de transcrição GAL4, formando-se as presas (*prey*). Para construção da isca (*bait*), a CDS de S/S_F-box foi clonada no vetor de expressão pDEST32 (Figura 16), que contém a sequência do domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição GAL4. A clonagem foi realizada por recombinação da construção superexpressão + pDONR221 (Figura 24), que contém a CDS completa do gene de estudo, com o vetor pDEST32, pela reação LR. Após recombinação, o plasmídeo gerado foi inserido em bactérias DH10B por eletroporação e os DNAs plasmidiais, extraídos de dez colônias isoladas, foram checados com a enzima de restrição EcoRI. As bandas esperadas de 6558pb e 5155pb foram obtidas (Figura 46).

Figura 46. Checagem da construção S/S_F-box + pDEST32. Os DNAs plasmidiais de dez colônias foram extraídos e checados com a enzima de restrição EcoRI. As bandas esperadas foram de 6558pb e 5155pb. Apenas a colônia 10 apresentou um padrão diferente do esperado. **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Após confirmação por digestão, o DNA da colônia 1 foi sequenciado para identificar se a CDS de S/S_F-box foi fusionada em fase de leitura correta com o domínio DBD. Após confirmação, o DNA foi utilizado para transformação de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem PJ69-4a, que contém os genes repórteres *HIS3* (para a via de síntese da histidina), *ADE2* (para a via de síntese de adenina) e *lacZ*.

5.15.2 Teste de auto-ativação da isca

Antes de dar início à busca por parceiros de interação, foi necessário investigar se a proteína S/S_F-box, sozinha, era capaz de auto-ativar o sistema, isto é, ativar a transcrição dos genes repórteres *HIS3*, *ADE2* e *lacZ*. Para isso, foram preparadas leveduras competentes contendo a construção S/S_F-box + pDEST32, que foram posteriormente transformadas com o vetor pDEST22 vazio, contendo o domínio AD. As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo SC sem Leucina e sem Triptofano (SC-Leu-Trp) para seleção das colônias que continham os dois vetores. Posteriormente, uma das colônias foi selecionada, crescida em meio líquido por 48 horas e plaqueada em meio SC-Leu-Trp-His (sem Histidina), para verificar se DBD-S/S_F-box juntamente com AD ativava a transcrição do gene *HIS3*. Se houvesse crescimento de colônias, ficaria demonstrado que a proteína S/S_F-box, na

configuração do vetor pDEST32, sem as proteínas parceiras, era capaz de ativar o sistema, pois os domínios do fator de transcrição GAL4 (DBD e AD) teriam se reconstituído e ativado a transcrição do gene repórter *HIS3*. Porém, não houve crescimento de nenhuma colônia, indicando que S/S_F-box, sozinha, não ativa o sistema e que, então, o *screening* da biblioteca de duplo-híbrido podia ser iniciado.

5.15.3 *Screening* da biblioteca de duplo-híbrido

Para o *screening* da biblioteca de duplo-híbrido, foram utilizadas as leveduras competentes previamente preparadas contendo a construção da isca (S/S_F-box + pDEST32). Essas leveduras foram transformadas com 1 µg da biblioteca. Um total de 30 transformações foram realizadas, para obtenção da quantidade necessária de transformantes indicada pelo kit utilizado nos experimentos. Cada transformação foi plaqueada em meio SC-Leu-Trp-His, para seleção dos clones positivos para o gene repórter *HIS3*. Após o período de incubação, foram obtidos 280 clones que cresceram em meio sem adição de histidina. Todas as colônias foram transferidas, uma a uma, para poços de placas de cultura de 96 poços (um total de três placas para os 280 clones) contendo meio líquido SC-Leu-Trp, juntamente com os controles de interação forte, interação fraca e de interação negativa, presentes no kit, e também com o controle de auto-ativação para S/S_F-box. Após crescimento, os clones de cada placa de cultura foram replicados, com o auxílio de um replicador de 96 poços, em quatro placas de Petri de 15 cm para diferentes seleções: 1) SC-Leu-Trp, apenas para seleção dos vetores inseridos nas leveduras; 2) SC-Leu-Trp-His, para seleção dos vetores e para o gene repórter *HIS3*; 3) SC-Leu-Trp-Adenina (sem Adenina), para seleção dos vetores e para o gene repórter *ADE2*, e 4) YPAD contendo uma membrana para teste para o *lacZ*. Para as placas da seleção 1, houve crescimento de quase todos os 280 clones. Para as placas da seleção 2, houve crescimento de 192 clones. As placas das seleções 3 e 4, para *ADE2* e *lacZ* respectivamente, não foram consideradas nestes experimentos, já que para as placas da seleção 3 apenas o controle de interação forte cresceu, não havendo mais nenhuma colônia. Já para as placas da seleção 4, a reação com o X-gal em DMF (*N,N*-dimethyl formamide) tornou todas as colônias azuis, inclusive os controles negativos. Isso ocorreu pelo fato de que a cepa PJ69-4a de *S. cerevisiae*, utilizada em nossos experimentos, pode apresentar expressão endógena do gene *lacZ* (GIETZ et al., 1997). Dessa forma, apenas

os testes com *HIS3* foram analisados. A Figura 47 ilustra uma das placas de Petri obtidas para seleção do gene repórter *HIS3*.

Figura 47. Foto de uma placa de Petri, replicada da placa de cultura, contendo meio SC-Leu-Trp-His, de seleção para o gene repórter *HIS3*. Cada colônia representa possíveis parceiros de interação de S/S_F-box. As colônias numeradas na última coluna correspondem à: **1)** S/S_F-box + pDEST32 com pDEST22 vazio (teste de auto-ativação da isca); **2)** controle positivo de interação forte (Krev1-RalGDS-wt); **3)** controle positivo de interação fraca (Krev1-RalGDS-m1), e **4)** controle de interação negativa (Krev1-RalGDS-m2).

Os 22 primeiros clones positivos para a seleção do gene repórter *HIS3* foram selecionados para investigação das presas, possíveis parceiros de interação de S/S_F-box. Para isso, o DNA plasmidial de cada clone de levedura foi extraído.

5.15.4 Transferência de pDEST22-presas para bactérias

O DNA plasmidial, extraído de cada um dos clones de levedura selecionados, foi inserido em bactérias DH10B, por eletroporação, plaqueando-se cada transformação em meio LB suplementado com ampicilina, para seleção das bactérias que incorporaram o vetor pDEST22 contendo a presa. Da transformação de bactérias para cada clone de levedura, foram selecionadas pelo menos seis colônias de bactérias para extração de DNA plasmidial. Isto se justifica pelo fato de que, de acordo com o kit utilizado, durante a transformação da levedura com a biblioteca de duplo-híbrido, mais de um plasmídeo pDEST22-presas, contendo diferentes cDNAs ou não, pode ter sido introduzido em cada célula. Essa estratégia de selecionar seis colônias de bactérias transformadas com o DNA de um clone de levedura permite identificar os diferentes plasmídeos que possam ter entrado durante a

transformação de leveduras. Posteriormente, é possível identificar qual plasmídeo contém a presa que, juntamente com S/S_F-box, ativou o sistema. O DNA plasmidial de cada uma das seis colônias foi checado com a enzima de restrição BsrGI. Essa enzima corta o vetor pDEST22, já recombinado com um cDNA, em três regiões, formando uma banda de 1090pb, outra de 6007pb e as demais bandas equivalem à sequência do cDNA recombinado ao vetor. Um gel de agarose representando essas digestões pode ser observado na Figura 48.

Figura 48. Análise do padrão de restrição do DNA plasmidial extraído de 18 colônias de bactérias, correspondendo a três colônias de levedura, candidatas a interação com S/S_F-box. As canaletas 1-6 representam DNAs digeridos de seis colônias de bactérias selecionadas, equivalendo a um clone de levedura selecionado da placa SC-Leu-Trp-His (teste de *HIS3*). As canaletas 7-12 representam DNAs de seis colônias de bactérias, equivalendo a um segundo clone de levedura. O mesmo vale para as colônias 13 a 18, representando um terceiro clone de levedura. Observa-se a presença das bandas de 1090pb e 6007pb (setas cinza) para a maioria dos DNAs digeridos. As demais bandas observadas equivalem ao cDNA clonado no vetor pDEST22 (presas). **M.** Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Observa-se na Figura 48 que, nas canaletas 1-6 há dois padrões de digestão. Esse é um caso em que mais de um plasmídeo distinto foi inserido durante a transformação da levedura com os plasmídeos da biblioteca. Dessa forma, para esse clone de levedura, não se sabe se a presa que está interagindo com a isca equivale ao cDNA apresentado nas canaletas 2 e 4, ou àquele das canaletas 3, 5 e 6. Para tanto, o DNA de uma colônia de cada padrão foi selecionado para sequenciamento (colônias 4 e 5 foram escolhidas) e re-teste de interação

de duplo-híbrido. No caso dos outros clones representados na Figura 48, que apresentaram o mesmo padrão em todas as colônias de bactérias, o DNA de uma das seis colônias (foram escolhidas as colônias 8 e 13) foi selecionado para sequenciamento e re-teste. As sequências obtidas foram analisadas pela ferramenta *tblastx* (NCBI), para busca de sequências similares de cada uma.

5.15.5 Identificação das presas

Cada um dos DNAs sequenciados foi utilizado para transformar leveduras competentes já contendo a construção S/S_F-box + pDEST32, para identificar qual presa está interagindo com a isca (re-teste). Para tanto, as transformações foram plaqueadas em meio SC-Leu-Trp-His, obtendo-se colônias isoladas para a presa positiva. Após determinação das presas, foi feito teste de auto-ativação para as mesmas, para verificar se elas não estavam auto-ativando o sistema.

Para os 22 clones de levedura testados, foram obtidas três presas distintas, positivas para o teste de ativação do gene repórter *HIS3*, e que não auto-ativaram o sistema. As presas identificadas foram: SKP1 de *N. tabacum* (GenBank: AY702087.1), uma proteína pertencente ao complexo SCF, de degradação de proteínas por ubiquitinação; VOZ1 (em *Arabidopsis* AT1G28520.1), um fator de transcrição e SIP1 de *N. tabacum* (GenBank: AB072391.1), outro fator de transcrição (Figura 49).

Figura 49. Ensaio de duplo-híbrido (re-teste). O gene repórter *HIS3* foi utilizado para confirmação da interação isca-presa (crescimento em meio SC-Leu-Trp-His). **A** representa colônia de levedura contendo o controle de interação forte. **B** representa o controle de interação fraca. **C**, **D** e **E** representam colônias de levedura transformadas com a construção S/S_F-box + pDEST32 (isca), juntamente com as construções das presas VOZ1, SIP1, e SKP1, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

6.1 S/S_F-box é importante para o desenvolvimento do pistilo

Neste trabalho, foi identificado um novo gene que codifica uma proteína F-box, denominado S/S_F-box, preferencialmente expresso nos órgãos florais de *N. tabacum*. A avaliação do padrão de expressão de S/S_F-box no estigma/estilete revelou que este gene apresenta maiores níveis de expressão nos estádios mais avançados do desenvolvimento floral (estádios 7-12) (KOLTUNOW *et al.*, 1990), sugerindo que a proteína codificada por S/S_F-box seja importante para os eventos tardios do desenvolvimento do estigma/estilete. O fenótipo observado nas plantas de superexpressão de S/S_F-box, de alongamento do estilete, aumento do estigma (a partir do estágio 7 tardio) e ovários maiores (a partir do estágio 8), em concordância com o fenótipo observado nas plantas transgênicas obtidas para redução na expressão de S/S_F-box, de estilete e ovário com tamanhos reduzidos (estádios 11 e 12), sugerem que a proteína codificada por S/S_F-box esteja envolvida com o controle do tamanho dos tecidos do pistilo. Dessa forma, a proteína codificada por S/S_F-box pode afetar, direta ou indiretamente, dois processos: a proliferação das células dos tecidos e/ou a expansão celular, mais especificamente durante os estádios mais avançados do desenvolvimento do pistilo. Proteínas F-box com papel no ciclo celular já foram descritas em plantas, como a SKP2A (*S-phase kinase-associated protein 2A*) (JURADO *et al.*, 2010), a SKP2B (*S-phase kinase-associated protein 2B*) (REN *et al.*, 2008) e a FBL17 (GUSTI *et al.*, 2009) que reconhecem reguladores negativos do ciclo celular, levando-os para degradação no proteassomo, permitindo a proliferação celular. A proteína F-box SLY1 (*sleepy 1*) já foi descrita como reguladora do crescimento por ambos os processos, alongamento/expansão celular e proliferação celular, promovendo a degradação de um repressor de sinalização de giberelina (ACHARD *et al.*, 2009), hormônio que promove o crescimento dos tecidos. Para esclarecer em qual dos dois processos S/S_F-box está envolvida, ou se está envolvida em ambos, seria interessante analisar os pistilos das plantas transgênicas em cortes histológicos, comparados com os pistilos de plantas controle SR1, para verificar se houve aumento/diminuição do número de células ou expansão/redução celular nos tecidos do pistilo das plantas de superexpressão/silenciamento.

O fenótipo de estigmas maiores e de estiletes alongados, observado nas plantas de superexpressão de S/S_F-box, se assemelha ao fenótipo observado em flores de *Arabidopsis*

tratadas com NPA (*N-1-naphthylphthalamic acid*), um inibidor do transporte polar de auxina (NEMHAUSER *et al.*, 2000). Nestas plantas de *Arabidopsis*, não há transporte apical-basal de auxina, que se apresenta em maiores concentrações nas células do estigma e do estilete, promovendo a proliferação celular nestes tecidos. Adicionalmente, os mesmos fenótipos e também o fenótipo de redução do filete dos estames, também observado nas plantas de superexpressão, se assemelha a plantas *yuc2yuc6* de *Arabidopsis* (CHENG *et al.*, 2006). Os genes da família YUC codificam flavinas monooxigenases que participam da biossíntese de auxina. As plantas *yuc2yuc6*, mutantes para os genes *YUC2* e *YUC6*, apresentam menor concentração de auxina, resultando em flores de *Arabidopsis* com estigmas e estiletos maiores e filetes reduzidos. Para testar a hipótese de que a expressão de S/S_F-box seja regulada pelo hormônio auxina, seus níveis de expressão foram avaliados em plantas de *N. tabacum* que tiveram os níveis de auxina aumentados no estigma/estilete (plantas STIG1_{prom}::iaaM). A análise revelou que S/S_F-box não é regulado, a nível transcricional, por este hormônio. Por outro lado, é possível que a proteína de S/S_F-box seja responsável pela degradação de alguma proteína da via de sinalização de auxina.

Altas concentrações de exudato foram observadas na superfície dos estigmas das plantas obtidas para superexpressão de S/S_F-box. Nas plantas selvagens de *N. tabacum*, a produção de exudato se inicia quando os estiletos apresentam 2-3 mm de tamanho (CRESTI *et al.*, 1986), equivalente aos estádios iniciais do desenvolvimento floral. Porém, a produção massiva ocorre de 2-3 dias antes da antese (estádio 12). Nas plantas controle SR1, o exudato foi macroscopicamente observado a partir do estágio 8, em baixíssimas quantidades, apresentando maiores concentrações nos estádios 11 e 12, apenas. Nas plantas de superexpressão de S/S_F-box, altas concentrações de exudato foram observadas a partir do estágio 7 tardio, aumentando ainda mais até o último estágio do desenvolvimento. Os resultados obtidos sugerem que a proteína codificada por S/S_F-box pode estar envolvida com a via de produção e/ou liberação do exudato. No entanto, deve-se considerar que, se o aumento da área do estigma nas plantas de superexpressão se deu pelo processo de proliferação celular, há maior quantidade de células da zona secretória do estigma, produzindo, em consequência, maiores quantidades de exudato do que as plantas controle. A análise dos cortes histológicos na região da zona secretória das plantas transgênicas, juntamente com análises da quantidade de exudato na superfície de estigmas das plantas de silenciamento, podem auxiliar a elucidar esta questão.

6.2 S/S_F-box é um componente do complexo SCF

A busca por parceiros de interação da proteína codificada por S/S_F-box, a partir do *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigmas/estiletes de *N. tabacum*, construída para uso no sistema de duplo-híbrido, revelou que a proteína de S/S_F-box interage fisicamente com a proteína SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), uma proteína que faz parte do complexo SCF, a maior classe de ubiquitina ligases (enzimas E3) encontrada em plantas (MAGORI & CITOVSKY, 2011). As proteínas F-box se ligam à proteína SKP1 através do domínio F-box (KIPREOS & PAGANO, 2000; KURODA *et al.*, 2002), que está localizado na porção amino-terminal da proteína codificada por S/S_F-box. O resultado obtido revelou que a proteína de S/S_F-box é um componente do complexo SCF, denominado SCF^{S/S_F-box}, que, portanto, está envolvido com o reconhecimento de proteínas alvo que serão poliubiquitinadas e levadas para degradação no proteassomo. A análise da localização subcelular da proteína S/S_F-box, a partir da fusão com os genes repórteres GFP e YFP, mostrou que esta proteína localiza-se no citoplasma e no núcleo celular. Proteínas F-box já foram encontradas no núcleo, no citoplasma, concomitantemente no núcleo e no citoplasma (KIPREOS & PAGANO, 2000; SCHUMANN *et al.*, 2011) e, também, no retículo endoplasmático (WANG & XUE, 2005). É provável que o complexo SCF^{S/S_F-box} localize-se, também, no núcleo e no citoplasma. O proteassomo é encontrado em ambos os locais (SCHUMANN *et al.*, 2011). Para esclarecer esta questão, experimentos de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), utilizando as sequências de S/S_F-box e de SKP1, poderiam ser realizados para confirmação da precisa localização do complexo SCF^{S/S_F-box} nas células.

Os testes de duplo-híbrido também revelaram a interação de S/S_F-box com outra proteína SKP1, diferente da primeira encontrada (dados não mostrados, pois não foram feitos re-teste e teste de auto-ativação para esta presa). Esta possível proteína parceira de S/S_F-box não é conhecida em *N. tabacum*, correspondendo a uma nova proteína SKP1 desta espécie. Vinte genes que codificam proteínas do tipo SKP1 já foram identificados em *Arabidopsis* (RISSEEUW *et al.*, 2003). No entanto, o número de genes desta família é desconhecido em *N. tabacum*. Os dados sugerem que S/S_F-box pode fazer parte de, no mínimo, duas combinações possíveis para formação do complexo SCF^{S/S_F-box}.

6.3 O complexo SCF^{S/S_F-box} reconhece os fatores de transcrição VOZ1 e SIP1

O *screening* da biblioteca construída para uso no sistema de duplo híbrido revelou ainda a interação da proteína S/S_F-box com os fatores de transcrição VOZ1 (*vascular plant one zinc finger protein 1*) e SIP1 (*6b-interacting protein 1*), prováveis proteínas alvo a serem levadas para a via ubiquitina-proteassomo. A interação das proteínas F-box com proteínas alvo se dá através do(s) domínio(s) de interação proteína-proteína localizado(s) na porção carboxi-terminal da proteína F-box. S/S_F-box apresenta dois domínios do tipo *kelch* localizados nesta região, pertencendo à subfamília Kelch, a segunda maior subfamília da família F-box encontrada em plantas (SCHUMANN *et al.*, 2011).

Proteínas da família VOZ foram primeiramente identificadas em *Arabidopsis*, apresentando papel na regulação da expressão gênica de uma pirofosfatase vacuolar (V-PPase), durante o desenvolvimento do pólen (MITSUDA *et al.*, 2004). Mimida e colaboradores (2011) investigaram o padrão de expressão da proteína VOZ1 nos diferentes tecidos de *Malus × domestica* Borkh (maçã), observando expressão preferencial nos órgãos florais e nos frutos. A expressão constitutiva de MdVOZ1 em *Arabidopsis* induziu a formação de flores estéreis, com elongação aumentada do pedúnculo floral e inflorescências anormais, além de ter afetado o tamanho da planta, a morfologia foliar e a formação do primórdio da folha na face adaxial dos cotilédones (MIMIDA *et al.*, 2011). Estes mesmos autores revelaram, através de experimentos de duplo-híbrido, que MdVOZ1 interage com a proteína FLOWERING LOCUS T (FT), um indutor floral transmissível, que ativa o florescimento. Dois tipos de proteínas FT foram descritas: FT1, envolvida com a aceleração do florescimento e FT2, envolvida com o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e também com o florescimento. Um modelo propõe que as proteínas FT interagem com a proteína FLOWERING LOCUS D (FD), ativando o promotor do gene *APETALA1* (AP1), que promove o desenvolvimento floral (KOTODA *et al.*, 2010; MIMIDA *et al.*, 2011). Mimida e colaboradores (2011) sugerem que a interação FT – VOZ1, juntamente com uma terceira proteína, o fator de transcrição TCP (*teosinte branched 1, cycloidea and proliferating cell factors*), apresenta papel na regulação da proliferação celular e na formação de novos tecidos, podendo afetar o desenvolvimento de folhas e frutos de *Malus × domestica*. Nossos testes de duplo-híbrido também revelaram uma proteína TCP como uma possível presa de

S/S_F-box. Os dados não foram mostrados, pois não foram realizados re-teste e teste de auto-ativação com esta possível presa.

O fator de transcrição SIP1 foi primeiramente identificado em *N. tabacum*, como um parceiro de interação da proteína 6b de *A. tumefaciens*, que promove a divisão celular em cultura de células de *N. tabacum*, independentemente da ação de hormônios (KITAKURA *et al.*, 2002). Estes autores sugeriram que a proteína 6b atua na proliferação das células vegetais, pelo menos em parte, através da associação com a proteína NtSIP1. Em 2009, Gao e colaboradores identificaram uma proteína de *Arabidopsis* que compartilha 40% de similaridade com NtSIP1, denominada ASIL1 (*Arabidopsis 6b-interacting protein 1-like 1*), um repressor de genes essenciais para a maturação das sementes. Tanto NtSIP1 quanto ASIL1 apresentam o domínio *trihelix* de ligação ao DNA, fazendo parte da família Trihelix de fatores de transcrição. Apesar da função de NtSIP1 não ser conhecida, acredita-se que esta proteína esteja envolvida com a regulação da proliferação celular.

Analisando, em conjunto, as funções propostas para os fatores de transcrição que interagem com S/S_F-box e as alterações de tamanho observadas nos pistilos de plantas de RNAi e superexpressão de S/S_F-box, é possível propor que esta proteína tenha função relacionada à proliferação celular e ao desenvolvimento dos órgãos vegetais, mais especificamente o pistilo.

6.4 S/S_F-box e a dominância apical

O fenótipo observado na parte vegetativa das plantas de RNAi, semelhante ao observado em plantas *yuc2yuc6* de *Arabidopsis*, deficientes na via de biossíntese de auxina (CHENG *et al.*, 2006), indicam que estas plantas perderam a dominância apical, o eixo apical-basal determinado durante a embriogênese e mantido durante a vida da planta (MÜLLER & LEYSER, 2011). Perdendo-se a dominância apical, as gemas laterais presentes na base das folhas saem da dormência e se desenvolvem em folhas ou ramos. A perda da dominância apical e o desenvolvimento das gemas laterais estão intimamente relacionados ao balanço dos hormônios vegetais auxina e citocinina: maiores níveis de citocinina estimulam a divisão das células das gemas laterais, enquanto níveis elevados de auxina inibem a divisão das mesmas (DOMAGALSKA & LEYSER, 2011). O modo de ação desses dois hormônios, em conjunto, no desenvolvimento das gemas laterais ainda é desconhecido, já que os

mecanismos de interação de ambos ainda é uma questão de debate (MÜLLER & LEYSER, 2011). Recentemente, foi mostrado que o hormônio strigolactona também apresenta funções na regulação do desenvolvimento de ramos laterais, tendo como função principal a inibição da ramificação (MÜLLER & LEYSER, 2011).

Experimentos de duplo-híbrido em *Arabidopsis* (DORTAY *et al.*, 2008) revelaram que o ortólogo de S/S_F-box nesta espécie interage fisicamente com a proteína WOL1 (*wooden leg 1*) / AHK4 (*Arabidopsis histidine kinase 4*) / CRE1 (*cytokinin response 1*), que possui três nomes já que o gene foi descrito três vezes utilizando-se diferentes mutantes de *Arabidopsis* para o mesmo *locus* (INOUE *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2001). Esta proteína é uma proteína de membrana, receptora do hormônio citocinina, que transduz o sinal proveniente deste hormônio para dentro da célula, regulando a atividade de genes de resposta à citocinina (YAMADA *et al.*, 2001). A possível interação de S/S_F-box com um receptor de citocinina sugere que o desenvolvimento das gemas laterais das plantas de RNAi se deu por essa via. Considerando-se que a proteína de S/S_F-box interage com a proteína WOL1/CRE1/AHK4 de *N. tabacum*, uma hipótese foi criada: S/S_F-box, componente do complexo SCF^{S/S_F-box}, reconhece a proteína WOL1/CRE1/AHK4, levando-a para degradação no proteassomo. Nas plantas obtidas para superexpressão de S/S_F-box, há grande quantidade desta proteína, que reconhece o receptor de citocinina, levando-o para degradação, diminuindo, dessa forma, a transdução de sinal deste hormônio (Figura 50-A) nas células das gemas laterais. Já para as plantas obtidas com bloqueio na expressão de S/S_F-box (silenciamento por RNAi), os receptores de citocinina não são degradados, o que aumenta o sinal de citocinina nas células das gemas laterais (Figura 50-B), promovendo a proliferação celular neste local.

Para testar esta hipótese, poderia ser realizado um experimento de duplo-híbrido, par a par, para observar se há interação entre S/S_F-box e WOL1/CRE1/AHK4 de *N. tabacum*. Um teste *in vivo* de interação destas proteínas também poderia ser realizado, através da técnica de BiFC. Um entrave para estes experimentos seria a falta de conhecimento da CDS deste receptor de citocinina em *N. tabacum*, que necessitaria ser clonada nesta espécie cujo genoma ainda não foi sequenciado. Foram realizadas buscas nos bancos de dados de ESTs de *N. tabacum* (DFCI, que inclui as sequências do TOBEST, o SOL, entre outros), mas infelizmente não foi possível encontrar a sequência de WOL1/CRE1/AHK4, o que inviabiliza, no momento, a realização deste experimento. A análise

de novos candidatos identificados no *screening* de duplo-híbrido com S/S_F-box poderá, eventualmente, permitir encontrar o WOL1/CRE1/AHK4 de *N. tabacum*.

Figura 50. Hipótese da ação de S/S_F-box nas células das gemas laterais, considerando a possível interação desta proteína com o receptor de citocinina WOL1/CRE1/AHK4 (representado em rosa). **A)** Nas plantas de superexpressão, altas quantidades da proteína codificada por S/S_F-box estão presentes, que reconhece o receptor de citocinina levando-o para degradação no proteassomo. Em consequência, há diminuição do sinal deste hormônio, influenciando na ação dos genes regulados por ele. **B)** Nas plantas de RNAi, S/S_F-box não está presente, ou presente em baixas quantidades. Dessa forma, o receptor de citocinina não é degradado no proteassomo, o que aumenta o sinal do

hormônio citocinina nas células das gemas laterais. O aumento do sinal de citocinina pode estimular a proliferação celular nesta região.

7. CONCLUSÕES

Durante a realização deste trabalho, um gene da família F-box de função desconhecida foi caracterizado em *N. tabacum*. As seguintes conclusões finais podem ser apresentadas:

- 1) Dos cinco genes da família F-box estudados inicialmente, um deles apresentou expressão preferencial nos órgãos florais. Este gene foi denominado S/S_F-box (*Stigma/Style_F-box*).
- 2) A expressão do gene S/S_F-box é regulada durante o desenvolvimento do estigma/estilete, apresentando baixa expressão no início (estádio 1), aumentando os níveis de expressão ao longo do desenvolvimento e, por fim, atingindo o maior nível na antese (estádio 12), sugerindo que este gene seja importante para o desenvolvimento destes tecidos.
- 3) A análise da sequência codificadora de S/S_F-box revelou que a proteína codificada por este gene apresenta, além do domínio F-box localizado na porção amino-terminal, dois domínios do tipo *kelch* localizados na porção carboxi-terminal, classificando esta proteína como um membro da subfamília Kelch. Além disso, a análise da sequência genômica de S/S_F-box revelou que sua CDS não é interrompida por íntrons, assim como seu ortólogo em *Arabidopsis*.
- 4) As plantas de superexpressão de S/S_F-box apresentaram o estilete alongado em relação ao controle SR1, além do ovário e do estigma de maior tamanho. As plantas de silenciamento apresentaram estilete e ovário menores quando comparados com SR1. Altas concentrações de exudato foram observadas na superfície do estigma das plantas de superexpressão, a partir do estágio 7 tardio. Concentrações elevadas de exudato apenas são observadas nos estádios 11 e 12 das plantas controle. Os fenótipos observados nas plantas transgênicas sugerem que a proteína de S/S_F-box esteja envolvida com o controle do tamanho dos tecidos do pistilo e com o desenvolvimento deste órgão.

- 5) A proteína codificada por S/S_F-box localiza-se no citoplasma e no núcleo celular.
- 6) Os testes de duplo-híbrido, utilizando S/S_F-box como isca, indicaram interação da proteína de estudo com SKP1, uma proteína pertencente ao complexo SCF. S/S_F-box, como um dos componentes do complexo SCF^{S/S_F-box}, é responsável pelo reconhecimento de proteína(s) alvo que são levadas para degradação no proteassomo. Duas proteínas candidatas a alvo foram identificadas: os fatores de transcrição VOZ1 e SIP1, envolvidos com a proliferação celular.

É possível propor que o gene S/S_F-box codifica uma proteína com função relacionada à proliferação celular e ao desenvolvimento dos órgãos vegetais, incluindo o pistilo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARD, P.; GUSTI, A.; CHEMINANT, S.; ALIOUA, M.; DHONDT, S.; COPPENS, F.; BEEMSTER, G. T. S.; GENSCHIK, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology* 19: 1188-1193.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-402.
- ARIIZUMI, T.; LAWRENCE, P. K.; STEBER, C. M. (2011). The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in *Arabidopsis* gibberellins signaling. *Plant Physiology* 155: 765-775.
- BAI, C.; RICHMAN, R.; ELLEDGE, S. J. (1994). Human cyclin F. *The EMBO Journal* 13(24): 6087-6098.
- BAI, C.; SEN, P.; HOFMANN, K.; MA, L.; GOEBL, M.; HARPER, W.; ELLEDGE, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-Box. *Cell* 86: 263-274.
- BELL, J.; HICKS, G. (1976). Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. *Planta* 131: 187-200.
- BENEDETTI, C. E.; COSTA, C. L.; TURCINELLI, S. R.; ARRUDA, P. (1998). Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *Coi1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116: 1037-1042.
- BINDER, B. M.; WALKER, J. M.; GAGNE, J. M.; EMBORG, T. J.; HEMMANN, G.; BLEECKER, A. B.; VIERSTRA, R. D. (2007). The *Arabidopsis* EIN3 binding F-box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *The Plant Cell* 19: 509-523.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (1998). Manual de Transformação Genética de Plantas. Editora Embrapa Produção de Informação. Brasília.
- BRÜCKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D.; SCHLATTNER, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci* 10: 2763-2788.

- CALDERÓN-VILLALOBOS, L. I. A.; NILL, C.; MARROCCO, K.; KRETSCH, T.; SCHWECHHEIMER, C. (2007). The evolutionarily conserved *Arabidopsis thaliana* F-box protein AtFBP7 is required for efficient translation during temperature stress. *Gene* 392: 106-116.
- CAPRON, D.; MOUZAYAR, S.; BOULAFLOUS, A.; GIROUSSE, C.; RUSTENHOLZ, C.; LAUGIER, C.; PAUX, W.; BOUZIDI, M. F. (2012). Transcriptional profile analysis of E3 ligase and hormone-related genes expressed during wheat grain development. *BMC Plant Biology* 12: 35. DOI:10.1186/1471-2229-12-35.
- CHAE, E.; TAN, Q. K-G.; HILL, T. A.; IRISH, V. F. (2008). An *Arabidopsis* F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development* 135: 1235-1245.
- 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 & Development* 20: 1790-1799.
- CHEVRAY, P. M.; NATHANS, D. (1992). Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5789-5793.
- CLIFFORD, R.; LEE, M.; NAYAK, S.; OHMACHI, M.; GIORGINI, F.; SCHEDL, T. (2000). FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C. elegans* hermaphrodite germline. *Development* 127: 5265-5276.
- 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.
- CRESTI, M.; KEIJZER, C. J.; TIEZZI, A.; CIAMPOLINI, F.; FOCARDI, S. (1986). Stigma of *Nicotiana*: ultrastructural and biochemical studies. *Amer. J. Bot.* 73(12): 1713-1722.
- DEPAOLI, H. C. (2006). Análise da expressão gênica no pistilo de *Nicotiana tabacum*: identificação de genes específicos por hibridização subtrativa e caracterização temporal e celular. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP, 104p.

- DEVOTO, A.; NIETO-ROSTRO, M.; XIE, D.; ELLIS, C.; HARMSTON, R.; PATRICK, E.; DAVIS, J.; SHERRATT, L.; COLEMAN, M.; TURNER, J. G. (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32: 457-466.
- DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 436: 441-451.
- DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; WEIJERS, D.; LECHNER, E.; YAMADA, M.; HOBBIE, L.; EHRISMANN, J. S.; JÜRGENS, G.; ESTELLE, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Developmental Cell* 9: 109-119.
- DILL, A.; THOMAS, S. G.; HU, J.; STEBER, C. M.; SUN, T. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellins signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell* 16: 1392-1405.
- DOENCH, J. G.; SHARP, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development* 18: 504-511.
- DOMAGALSKA, M. A. & LEYSER, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 12: 211-221.
- DORTAY, H.; GRUHN, N.; PFEIFER, A.; SCHWERDTNER, M.; SCHMÜLLING, T.; HEYL, A. (2008). Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteome Research* 7: 3649-3660.
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. (1991). A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19(6): 1349.
- FIELDS, S.; SONG, O-K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- FUKAMATSU, Y.; MITSUI, S.; YASUHARA, M.; TOKIOKA, Y.; IHARA, N.; FUJITA, S.; KIYOSUE. (2005). Identification of LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2)-interacting factors that can recruit LKP2 to nuclear bodies. *Plant Cell Physiology* 46(8): 1340-1349.

- GALAN, J.; WIEDERKEHR, A.; SEOL, J. H.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; DESHAIES, R. J.; RIEZMAN, H.; PETER, M. (2001). Skp1p and the F-Box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol. and Cell. Biology* 21(9): 3105-3117.
- GAO, M.-J.; LYDIATE, D. J.; LI, X.; LUI, H.; GJETVAJ, B.; HEGEDUS, D. D.; ROZWADOWSKI, K. (2009). Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell* 21: 54-71.
- GIETZ, R. D.; TRIGGS-RAINE, B.; ROBBINS, A.; GRAHAM, K. C.; WOODS, R. A. (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry* 172: 67-79.
- GOLDBERG, R. B. (1988). Plants: Novel developmental processes. *Science* 240: 1460-1467.
- GOLDMAN, M. H. S; GOLDMAN, R. B.; MARIANI, C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *The EMBO Journal* 13: 2976-2984.
- GOLEMIS, E. A.; SEREBRIISKII, I.; FINLEY-JR, R. L.; KOLONIN, M. G.; GYURIS, J.; BRENT, R. (2011). Interaction Trap/Two-hybrid system to identify interacting proteins. *Current Protocols in Cell Biology* 17.3: 17.3.1-17.3.35.
- GONZÁLEZ-CARRANZA, Z. H.; ROMPA, U.; PETERS, J. L.; BHATT, A. M.; WAGSTAFF, C.; STEAD, A. D.; ROBERTS, J. A. (2007). *HAWAIIAN SKIRT*: An F-box gene that regulates organ fusion and growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 1370-1382.
- GOODSPEED, T. H. (1954). The genus *Nicotiana*. University of California, Bekerley, California.
- GRAY, J. F.; KUNG, S. D.; WILDMAN, S. G. (1974). Origin of *Nicotiana tabacum* L. detected by polypeptide composition of fraction I protein. *Nature* 252: 226-227.
- GUSTI, A.; BAUMBERGER, N.; NOWACK, M.; PUSCH, S.; EISLER, H.; POTUSCHAK, T.; DE VEYLDER, L.; SCHNITTGER, A.; GENSCHIK, P. (2009). The *Arabidopsis thaliana* F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development. *PLoS One* 4(3):e4780.

- HAN, L.; MASON, M.; RISSEEUW, E. P.; CROSBY, W. L.; SOMERS, D. E. (2004). Formation of an SCF^{ZTL} complex is required for proper regulation of circadian timing. *The Plant Journal* 40: 291-301.
- HARMON, F. G.; KAY, S. A. (2003). The F-box protein AFR is a positive regulator of phytochrome A-mediated light signaling. *Current Biology* 13: 2091-2096.
- HELLIWELL, C.; WATERHOUSE, P. (2003). Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30: 289-295.
- HEPWORTH, S. R.; KLENZ, J. E.; HAUGHN, G. W. (2006). UFO in the *Arabidopsis* inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta* 223: 769-778.
- HERMAND, D. (2006). F-box proteins: more than baits for the SCF? *Cell Division* 1: 30. doi: 10.1186/1747-1028-1-30.
- HISCOCK, S. J.; ALLEN, A. M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist* 179: 286-317.
- INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- JESENBERGER, V.; JENTSCH, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 112-121.
- JIN, J.; CARDOZO, T.; LOVERING, R. C.; ELLEDGE, S. J.; PAGANO, M.; HARPER, J. W. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* 18: 2573-2580.
- JURADO, S.; ABRAHAM, Z.; MANZANO, C.; LÓPEZ-TORREJÓN, G.; PACIOS, L. F.; POZO, J. C. (2010). The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *The Plant Cell* 22: 3891-3904.
- JURADO, S.; DÍAZ-TRIVIÑO, S.; ABRAHAM, Z.; MANZANO, C.; GUTIERREZ, C.; POZO, C. (2008). SKP2, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *The Plant Journal* 53: 828-841.

- 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.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195.
- KEPINSKI, S.; LEYSER, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- KIM, H. S.; DELANEY, T. P. (2002). *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 14: 1469-1482.
- KIM, J.; KIM, J. H.; LEE, S.; KIM, D. H.; KANG, H.; BAE, S.; PAN, Z.; SEO, Y. (2002). The novel human DNA helicase hFBH1 is an F-box protein. *The J. of Biological Chemistry* 277(27): 24530-24537.
- KIM, O-K.; JUNG, J-H.; PARK, C-M. (2010). An *Arabidopsis* F-box protein regulates tapetum degeneration and pollen maturation during anther development. *Planta* 232: 353-366.
- KIM, Y. Y.; JUNG, K. W.; JEUNG, J. U.; SHIN, J. S. (2011). A novel F-box protein represses endothelial secondary wall thickening for anther dehiscence in *Arabidopsis thaliana*. *J. of Plant Physiology* 169: 212-216.
- KIPREOS, E. T.; PAGANO, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology* 5: 3002.1-3002.7.
- KITAKURA, S.; FUJITA, T.; UENO, Y.; TERAOKURA, S.; WABIKO, H.; MACHIDA, Y. (2002). The protein encoded by oncogene 6b from *Agrobacterium tumefaciens* interacts with a nuclear protein of tobacco. *The Plant Cell* 14: 451-463.
- KOLTUNOW, A. M.; TRUETTNER, J.; COX, K. H.; WALLROTH, M.; GOLDBERG, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201-1224.

- KOOPS, P.; PELSER, S.; IGNATZ, M.; KLOSE, C.; MARROCCO-SELDEN, K.; KRETSCH, T. (2011). EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62(15): 5547-5560.
- KOTODA, N.; HAYASHI, H.; SUZUKI, M.; IGARASHI, M.; HATSUYAMA, Y.; KIDOU, S-I.; IGASAKI, T.; NISHIGUCHI, M.; YANO, K.; SHIMIZU, T.; TAKAHASHI, S.; IWANAMI, H.; MORIYA, S.; ABE, K. (2010). Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-Like genes of Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiology* 51(4): 561-575.
- KURODA, H.; TAKAHASHI, N.; SHIMADA, H.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; MATSUI, M. (2002). Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-Box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol.* 43: 1073-1085.
- LEVIN, J. Z.; MEYEROWITZ, E. M. (1995) *UFO*: An *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *The Plant Cell* 7: 529-548.
- LI, M.; XU, W.; YANG, W.; KONG, Z.; XUE, Y. (2007) Genome-wide gene expression profiling reveals conserved and novel molecular functions of the stigma in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* 144: 1797-1812.
- LORD, E. M. (2003). Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal of Experimental Botany* 54: 47-54.
- MAGORI, S.; CITOVSKY, V. (2011). *Agrobacterium* counteracts host-induced degradation of its effector F-box protein. *Sciences Signaling* 4: Issue 195 ra69.
- MALDONADO-CALDERÓN, M. T.; SEPÚLVEDA-GARCÍA, E.; ROCHA-SOSA, M. (2011). Characterization of novel proteins in plants induced by biotic and abiotic stress. *Plant Science* 185-186: 208-217.
- MÁS, P.; KIM, W.; SOMERS, D. E.; KAY, S. A. (2004). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426: 567-570.
- MATSUMOTO, D.; YAMANE, H.; ABE, K.; TAO, R. (2012). Identification of a Skp1-like protein interacting with SFB, the pollen S determinant of the gametophytic self-incompatibility in *Prunus*. *Plant Physiology*. DOI:10.1104/pp.112.197343.

- MAUSETH, J. D. (2003). Botany: An Introduction to Plant Biology. 3ª edição. University of Texas, Austin, Texas.
- MCDANIEL, C. N. (1999). Rapid flowering *Nicotiana tabacum* L. *Sex. Plant. Reprod.* 12: 123-124.
- MIMIDA, N.; KIDOU, S.; IWANAMI, H.; MORIYA, S.; ABE, K.; VOOGD, C.; VARKONYI-GASIC, E.; KOTODA, N. (2011). Apple FLOWERING LOCUS T proteins interact with transcription factors implicated in cell growth and organ development. *Tree Physiology* 31: 555-566.
- MITSUDA, N.; HISABORI, T.; TAKEYASU, K.; SATO, M. H. (2004). Voz; Isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 45(7): 845-854.
- MÜLLER, D.; LEYSER, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* 107: 1203-1212.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- NEMHAUSER, J. L.; FELDMAN, L. J.; ZAMBRYSKI, P. C. (2000). Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* 127: 3877-3888.
- OU, C. Y.; PI, H.; CHIEN, C. T. (2003). Control of protein degradation by E3 ubiquitin ligases in *Drosophila* eye development. *Trends Genet.* 19: 382-389.
- PARRY, G.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I.; PRIGGE, M.; PERET, B.; DHARMASIRI, S.; ITOH, H.; LECHNER, E.; GRAY, W. M.; BENNETT, M.; ESTELLE, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *PNAS* 106: 22540-22545.
- PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. (1995). Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* 59(1): 94-123.
- POTUSCHAK, T.; LECHNER, E.; PARMENTIER, Y.; YANAGISAWA, S.; GRAVA, S.; KONCZ, C.; GENSHIK, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F-box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 116: 679-689.

- POZO, J. C.; ESTELLE, M. (2000). F-box proteins and protein degradation: An emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology* 44: 123-128.
- QUIAPIM, A. C.; BRITO, M. S.; BERNANDES, L. A. S.; DA SILVA, I.; MALAVAZI, I.; DEPAOLI, H. C.; MOLFETTA-MACHADO, J. B.; GIULIATTI, S.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S. (2009). Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. *Plant Physiology* 149: 1211-1230.
- REN, H.; SANTNER, A.; POZO, J. C.; MURRAY, J. A. H.; ESTELLE, M. (2008). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *The Plant Journal* 53: 705-716.
- RISSEEUW, E. P.; DASKALCHUK, T. E.; BANKS, T. W.; LIU, E.; COTELESAGE, H.; ESTELLE, M.; SOMERS, D. E.; CROSBY, W. L. (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34: 753-767.
- SAGE, T.L.; HRISTOVA-SARKOVSKI, K.; KOEHL, V.; LYEW, J.; PONTIERI, V.; BERNHARDT, P.; WESTON, P.; BAGHA, S.; CHIU, G. (2009). Transmitting tissue architecture in basal-relictual angiosperms: Implications for transmitting tissue origins. *American Journal of Botany* 96(1): 183-206.
- SAMACH, A.; KLENZ, J. E.; KOHALMI, S. E.; RISSEEUW, E.; HAUGHN, G. W.; CROSBY, W. L. (1999). The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *The Plant Journal* 20(4): 433-445.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning. 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Estados Unidos.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SANTNER, A.; ESTELLE, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature Reviews* 459: 1071-1078.

- SAWA, M.; NUSINOW, D. A.; KAY, S. A.; IMAIZUMI, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318: 261-265.
- SAWERS, R. J. H.; FARMER, P. R.; MOFFETT, P.; BRUTNELL, T. P. (2006). In planta transient expression as a system for genetic and biochemical analyses of chlorophyll biosynthesis. *Plant Methods* 2: 15. doi:10.1186/1746-4811-2-15.
- SCHUMANN, N.; NAVARRO-QUEZADA, A.; ULLRICH, K.; KUHL, C.; QUINT, M. (2011). Molecular evolution and selection patterns of plant F-Box proteins with C-terminal kelch repeats. *Plant Physiology* 155: 835-850.
- SKAAR, J. R.; PAGAN, J. K.; PAGANO, M. (2009a). SnapShot: F-Box proteins I. *Cell* 137: 1160-1160.e1. DOI 10.1016/j.cell.2009.05.039.
- SKAAR, J. R.; D'ANGIOLELLA, V.; PAGAN, J. K.; PAGANO, M. (2009b). SnapShot: F-Box proteins II. *Cell* 137: 1358-1358.e1. DOI 10.1016/j.cell.2009.05.040.
- SKOWYRA, D.; CRAIG, K. L.; TYERS, M.; ELLEDGE, S. J.; HARPER, J. W. (1997). F-Box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 209-219.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. (2008). Fundamentos de Genética. 4ª edição, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- STIRNBERG, P.; FURNER, I. J.; LEYSER, H. M. O. (2007). MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *The Plant Journal* 50: 80-94.
- SUZUKI, S.; MIWA, K.; ISHIKAWA, K.; YAMADA, H.; AIBA, H.; MIZUNO, T. (2001). The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiology* 42: 107-113.
- SWANSON, R.; CLARK, T.; PREUSS, D. (2005). Expression profiling of *Arabidopsis* stigma tissue identifies stigma-specific genes. *Sex Plant Reprod.* 18: 163-171.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2006). *Fisiologia Vegetal*. 4ª edição, Artmed. Porto Alegre.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2010). *Fisiologia Vegetal*. 5ª edição, Artmed. Porto Alegre.
- THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S. Y.; HOWE, G. A.; BROWSE, J. (2007). JAZ repressors proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signaling. *Nature* 448: 661-666.
- TUNG, C. W.; DWYER, K. G.; NASRALLAH, M. E.; NASRALLAH, J. B. (2005). Genome-wide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiology* 138: 977-989.
- VIDAL, M.; BRACHMANN, R. K.; FATTAEY, A.; HARLOW, E.; BOEKE, J. D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10315-10320.
- VIERSTRA, R. D. (2009). The ubiquitin–26s proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews* 10: 385-397.
- WALHOUT, A. J. M.; SORDELLA, R.; LU, X.; HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A.; THIERRY-MIEG, N.; VIDAL, M. (2000). Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* 287: 116-122.
- WANG, H-Y.; XUE, Y-B. (2005). Subcellular localization of the *S* Locus F-box protein AhSLF-S₂ in pollen and pollen tubes of self-incompatible *Antirrhinum*. *Journal of Integrative Plant Biology* 47(1): 76-83.
- WOO, H. R.; CHUNG, K. M.; PARK, J.; OH, S. A.; AHN, T.; HONG, S. H.; JANG, S. K.; NAM, H. G. (2001). ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 1779-1790.
- XIE, D. X.; FEYS, B. F.; JAMES, S.; NIETO-ROSTRO, M.; TURNER, J. G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094.

- XU, G.; MA, H.; NEI, M.; KONG, H. (2009). Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationship with functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 835-840.
- YAMADA, H.; SUZUKI, T.; TERADA, K.; TAKEI, K.; ISHIKAWA, K.; MIWA, K.; YAMASHINO, T.; MIZUNO, T. (2001). The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiology* 42: 1017-1023.
- ZHENG, X.; MILLER, N. D.; LEWIS, D. R.; CHRISTIANS, M. J.; LEE, K.; MUDAY, G. K.; SPALDING, E. P.; VIERSTRA, R. D. (2011). AUXIN UP-REGULATED F-BOX PROTEIN1 regulates the cross talk between auxin transport and cytokinin signaling during plant root growth. *Plant Physiology* 156: 1878-1893.