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

**A expressão de *SCII* e sua regulação transcricional no meristema
floral de *Nicotiana tabacum***

JOELMA DE OLIVEIRA CRUZ

RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO

2018

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

**A expressão de *SCII* e sua regulação transcricional no meristema
floral de *Nicotiana tabacum***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de MESTRE em CIÊNCIAS -
Área de concentração: GENÉTICA

Aluna: Joelma de Oliveira Cruz

Orientadora Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

RIBEIRÃO PRETO
-2018-

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cruz, Joelma de Oliveira

A expressão de *SCII* e sua regulação transcricional no meristema floral de *Nicotiana tabacum*/
Joelma de Oliveira Cruz; orientadora Maria Helena de Souza Goldman -Ribeirão Preto, 2018.

110p. : 30 il

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Maria Helena de Souza Goldman

1.Meristema floral. 2. *SCII*. 3. Interação proteína:DNA. 4. Hibridização *in situ* 5. *NAGI*.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

NOME: Joelma de Oliveira Cruz

TÍTULO: A expressão de *SCII* e sua regulação transcricional no meristema floral de *Nicotiana tabacum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS - Área de concentração: GENÉTICA.

PROF. Dr _____

INSTITUIÇÃO: _____

PARECER: _____

ASSINATURA: _____

PROF. Dr: _____

INSTITUIÇÃO: _____

PARECER: _____

ASSINATURA: _____

PROF. Dr: _____

INSTITUIÇÃO: _____

PARECER: _____

ASSINATURA: _____

PROF. Dr: _____

INSTITUIÇÃO: _____

PARECER: _____

ASSINATURA: _____

“A race of people is like an individual man; until it uses its own talent, takes pride in its own history, expresses its own culture, affirms its own selfhood, it can never fulfill itself.”

Malcom X- 50 anos de sua morte

“Poverty is not an accident. Like slavery and apartheid, it is man-made and can be removed by the actions of human beings.”

Nelson Mandela- seu centenário

*À minha mãe “vêa”, **Petronília Pereira Cruz***

*Ao meu papai, **Manoel Silva***

*Obrigada pelo carinho e cuidado que só aqueles que foram pais duas vezes são
capazes de oferecer!*

In memoriam, dedico...

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À Prof. **Dra. Maria Helena de Souza Goldman**, agradeço pela oportunidade, apoio e confiança por mesmo sem me conhecer, aceitar a minha inclusão no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas! Agradeço por ter respondido aquele primeiro e-mail as 03:00 da manhã, firmando nosso primeiro contato e possibilitando a minha vinda ao laboratório. Agradeço pela animação contagiante nos dias de descrença que as coisas dariam certo. E eu, como amante de doces, não poderia deixar de agradecer por todos os bolos e doces que você nunca se esquecia de trazer nas datas comemorativas ou mesmo sem nenhum motivo. Eles contribuíram para alegrar meus dias... muito obrigada!

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela oportunidade e suporte oferecido durante a realização do mestrado, em especial à secretária Susie Adriana Penha Nalon por estar sempre disposta e disponível a sanar todas as dúvidas e resolver os problemas.

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

À CAPES, pela bolsa concedida que possibilitou a realização desse Mestrado.

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 concedido para a participação de eventos científicos

Agradeço as “Déas de minha vida”. Uma delas, **Dra Andrea Karla Almeida dos Santos**, sempre acreditou em mim e me deu todo o suporte para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada por despertar em mim o amor pela pesquisa e por me mostrar que mesmo com poucos recursos é preciso fazer ciência, pois só o conhecimento nos permite evoluir para que nos tornemos cidadãos melhores. A outra, **Dra Andréa Carla Quiapim da Silva**, não só por ser o braço direito do laboratório, mas por ser minha companheira de risadas e eterna fornecedora de

chocolatinhos na hora do almoço e claro, ser sempre a minha carona certa no final do dia. Muito obrigada!

Agradeço ao **ex-presidente Lula**, por todos os programas de assistência social. Eu que sou “cria” de todos os programas assistencialistas não teria chegado até aqui sem todo o suporte recebido, desde a educação fundamental até a pós-graduação. Que o desmonte pelo qual o nosso país vem passando não retire a oportunidade de outros como eu e como muitos nesse país a fora.

Agradeço à minha mainha, **Carmita** pelo apoio incondicional e disponibilidade para ouvir os meus lamentos quando as coisas não iam bem e comemorar comigo quando davam certo, obrigada também pelas orações e conselhos e por estar sempre me esperando com aquele docinho que você sabe que eu gosto.

Ao meu painho, **João Batista**, agradeço pelas mensagens no fim do dia para saber como estou. Agradeço pelo apoio incondicional. Sua energia sempre me contagiou e aqui não foi diferente. Obrigada por sempre ter uma piada e me fazer rir até mesmo nos momentos de tristeza e descrença.

Agradeço à minha irmã, **Juliana** que me acompanha em todas as fases da minha vida, sempre ao meu lado, fico muito feliz em saber que você também tem suas próprias lutas e assim como eu também alcançou a conquista de terminar o mestrado. Agradeço por me alimentar todos os dias hahaha, pois como você mesma diz, sem você eu morreria de fome. Somos personalidades opostas e juntas seguiremos em frente conquistando nossos sonhos.

Ao meu irmão, **Júlio Cezar**, as vezes calado, mas sempre interessado e preocupado comigo, agradeço pelo apoio e por estar sempre pronto para fazer aquela comemoração mesmo sem motivo algum.

A todos os membros da minha família que reconhecem o valor dessa luta. À minha avó **Laurita** e avô **Israel** pelo cuidado e dedicação e por estarem sempre de braços abertos a me receber. Aos meus tios e tias, primos e primas (são muitos) e aos meus padrinhos. *In memoian* à minha avó Petronília e meu avô Manoel. Meus sinceros agradecimentos a vocês. Agradeço por mesmo

passando tanto tempo longe estarem sempre de braços abertos e nunca deixarem a ligação entre nós morrer. Sou imensamente grata!

Aos meus amigos, baianos: **Breno, Ivanéia** (minha gêmea), **Raissa, Elaine**, amigos do **laboratório de Botânica (UFBA)**, **Verena, Tia Vera, Matheus, Lício...** Espero que vocês saibam o quão importante é poder contar com o apoio vocês. Agradeço até pelo simples desejo de boa sorte de todos os dias e finalizo dizendo que prometo ficar mais próxima daqui por diante.

Agradeço a **família Pensão da Jô**, vocês são meu alento nessa cidade, obrigada por me acolherem e oferecerem sua amizade. Em especial ao **Fábio (macho), Rodrigo, Guilherme Reginaldo, Gabriel (Jesus) e Jô**, obrigada pelas risadas proporcionadas nos nossos almoços de domingo, lanches da tarde momentos triviais que trouxeram grande satisfação durante esses dois anos. Jô que durante esse tempo foi como uma mãe para mim em Ribeirão, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos amigos que a USP me deu, especialmente ao **Max, Leonardo Mizoguti, Hugo e Romário** é sempre bom conhecer pessoas que compartilham conosco a mesma forma de enxergar a vida.

Ao Dr. Edward J. Strini, **Ed**, por sua disponibilidade e por sempre, com sua experiência, ter me ajudado a solucionar os problemas que emperravam a pesquisa. Agradeço também por sua amizade, muito obrigada!

Ao Dr. **Juca A. B. San Martin**, pela ajuda e experiência no planejamento e execução dos experimentos, agradeço também pela ajuda nas correções dos textos.

Às técnicas dos laboratórios de microscopia da FMRP, **Bete e Roberta**, obrigada pela ajuda nas análises. À Roberta em especial, obrigada por compartilhar comigo parte de seus conhecimentos em microscopia e pelas conversas nos longos períodos de aquisição das imagens.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelo acolhimento e paciência ao me ensinarem as técnicas e funcionamento do laboratório! Ao **Vitor** por, no início, ter me dado todo o suporte necessário para aprender e me adaptar à nova rotina

de trabalho e hoje por, através do seu conhecimento, contribuir com as discussões e ter me ajudado a construir ideias para o desenvolvimento do trabalho. Ao **Pedro**, por ser essa pessoa tão doce e tranquila, me contagiando nos momentos de tensão. Obrigada pela sua amizade e ajuda nos momentos em que as coisas não davam certo. À **Vanessa**, minha companheira de mestrado, compartilhamos os momentos em que as coisas não davam certo e também quando davam e por isso sei que, com sua calma, você conseguirá finalizar seu trabalho e irá longe nos seus objetivos. Ao **Fábio**, recém-chegado ao laboratório, mas já faz parte da família.

À **Greice**, nossa você é a pessoa mais positiva que eu já conheci! Obrigada por todos os dias chegar com um sorriso no rosto e a certeza de que, naquele dia, as coisas dariam certo. Esse sentimento contagia todos ao seu redor, não mude nunca, você faz bem aos que te cercam.

À **Pat**, uma das pessoas de alma mais leve e “desencanadas” que já conheci. Você sabe levar a vida e tenho muito o que aprender com você, meu muito obrigada pelo tempo que passou comigo.

À comunidade **Quilombola Pastinho**, obrigada por torcerem por mim e estarem sempre desejando o bom andamento do meu trabalho.

Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 A flor e os órgãos reprodutivos das plantas.....	21
1.2 Regulação da transcrição: Elementos <i>Cis</i> -atuantes	22
1.3 Evocação floral	24
1.4 Iniciação, manutenção e término do meristema floral.....	25
1.5 Morfologia do meristema floral	27
1.6 Desenvolvimento da flor: Enfoque nos carpelos.....	29
1.7 <i>SCII</i>	31
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 PROTOCOLOS ADOTADOS	35
3.1.1 Material vegetal e cultivo.....	35
3.1.2 Transformação de plantas	35
3.1.3 Manipulação de Micro-organismos	36
3.1.3.1 Preparação de células de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>), cepa DH10B, eletrocompetentes	36
3.1.3.2 Transformação de células DH10B eletrocompetentes	36
3.1.3.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.1.3.4 Preparação de inóculos para crescimentos das colônias transformadas	37
3.1.3.5 Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelo método de choque térmico.....	37

3.1.4 Manipulação de Ácidos Nucleicos	38
3.1.4.1 Mini preparação de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i> método liso- zima	38
3.1.4.2 Mini extração de DNA plasmidial de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.1.4.3 Midi-preparação de DNA plasmidial pelo método liso- zima	39
3.1.4.4 Extração de DNA genômico de folhas de <i>N. tabacum</i>	40
3.1.4.5 Purificação de DNA plasmidial pelo método fenol/clorofórmio	40
3.1.4.6 Extração de RNA	41
3.1.4.7 Síntese de cDNA	42
3.1.4.8 Sequenciamento	42
3.1.5. Clonagens	42
3.1.5.1 Clonagem de sequência nos vetores do sistema TOPO TA	42
3.1.5.2 Clonagem com o sistema <i>Gateway</i>	43
3.1.5.3 Inserção dos sítios <i>attBs</i> nos fragmentos a serem clonados no sistema <i>Gateway</i> ®	44
3.1.5.4 Digestão com enzimas de restrição	45
3.1.5.5 Análises dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose	46
3.2 EXPERIMENTOS	46
3.2.1 Clonagem do gene <i>NtWUSCHEL</i>	46
3.2.2 Análise de sequência	46
3.2.1.3 Amplificação da CDS (Sequência codificadora) de <i>NtWUSCHEL</i> e inserção em vetor de interesse	47
3.2.2 Construção de sondas para a hibridização <i>in situ</i>	48
3.2.3 Hibridização <i>in situ</i>	49
3.2.3.1 Fixação	49
3.2.3.2 Desidratação	49
3.2.3.3 Embebição	50
3.2.4 Pré-hibridização	50

3.2.4.1 Desparafinização	50
3.2.5 Hibridização	51
3.2.6 Pós-hibridização	51
3.2.7 Imuno-deteção	51
3.2.8 Microscopia de campo claro	51
3.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
3.2.10 Mono Híbrido (<i>Yeast One Hybrid</i>)	52
3.2.10.1 Integração do DNA plasmidial em célula de levedura PJ69-4a por recombinação homóloga	53
3.2.10.2 Teste de Auto ativação do DNA alvo.....	53
3.2.10.3 Ensaio de mono híbrido (<i>Yeast One Hybrid</i>).....	54
3.2.11 Clonagem da sequência genômica de <i>SCII</i>	54
3.2.12 Obtenção de plantas transgênicas <i>SCII</i> _{prom} :: <i>SCI1</i> -GFP	56
3.2.13 Microscopia confocal.....	58
3.2.14 Análise em Microscópio Multifóton.....	58
3.3 Materiais utilizados	58
4. RESULTADOS	64
4.1 Desenvolvimento do meristema floral e da flor de <i>N. tabacum</i> , com foco no pistilo	64
4.2 O gene <i>SCII</i> inicia sua expressão no meristema floral	68
4.3 <i>SCII</i> co-expressa com o gene <i>NAG1</i> (<i>AGAMOUS</i> de <i>N. tabacum</i>).....	70
4.4 O fator de transcrição <i>AGAMOUS</i> (<i>NAG1</i>) interage com o promotor de <i>SCII</i>	72
4.5 A sequência genômica de <i>SCII</i> , em fusão com GFP, é capaz de reproduzir sua expressão endógena.....	75
4.6 A localização subcelular de <i>SCI1</i> foi confirmada em núcleo e nucléolo	80
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÕES	91
7 .REFERÊNCIAS	92

APÊNDICE.....	100
ANEXO.....	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática da flor de angiosperma (*Nicotiana tabacum*).
- Figura 2** – Representação esquemática de um gene eucariótico
- Figura 3** – Regulação da identidade do meristema. floral.
- Figura 4** – *Feedback* temporal da regulação do meristema floral.
- Figura 5** – Representação esquemática do meristema floral.
- Figura 6** – Revisão do modelo ABC de identidade dos verticilos florais
- Figura 7** – Estádios do desenvolvimento floral em *N. tabacum*.
- Figura 8** – Esquema ilustrativo das reações BP e LR.
- Figura 9** – Representação esquemática da inserção dos sítios attbs nas sequências clonadas no Sistema *gateway*.
- Figura 10** – Passos na produção das plantas transgênicas.
- Figura 11** – Eletromicrografias de varredura em diferentes estádios de desenvolvimento das flores de *N. tabacum*.
- Figura 12** – Microscopia de campo claro, de cortes em historesina, de material corado com azul de toluidina.
- Figura 13** – Representação esquemática da especificação das sépalas na flor de *N. tabacum*.
- Figura 14** - Hibridização *in situ* da região apical da inflorescência com sonda antisenso de *SCII*.
- Figura 15** – Hibridização *in situ*, com sonda antisenso de *SCII* em meristemas florais de *N. tabacum*.
- Figura 16** - Hibridização *in situ*, com sonda antisenso de *SCII*, em diferentes estádios de desenvolvimento floral de *N. tabacum*.
- Figura 17** – Hibridização *in situ*, com sonda antisenso de *NAG1*, em meristemas florais
- Figura 18** – Hibridização *in situ*, com sonda antisenso de *NAG1*, em botões florais.
- Figura 19A** – Representação esquemática da sequência genômica de *SCII* e fragmentos utilizados no ensaio de mono híbrido
- Figura 19B** – Representação esquemática do fragmento 1 de 443pb do promotor de *SCII* utilizado nos ensaios de mono híbrido
- Figura 20** - Ensaio de mono híbrido (*yeast one hybrid*), evidenciando a interação do fator de transcrição NAG1 com o fragmento 1 do promotor de *SCII*
- Figura 21** – Ensaio de mono híbrido (*yeast one hybrid*), evidenciando a interação do fator de transcrição WUS com o fragmento 1 do promotor de *SCII*

Figura 22 – Imagens de microscópio multifóton de meristemas florais de *N. tabacum*

Figura 23 – Microscopia confocal de meristemas florais da planta *SCII*gen_GFP17.1.

Figura 24 – Microscopia multifóton de estádios iniciais do desenvolvimento floral de três plantas transgênicas de *N. tabacum*.

Figura 25 – Microscopia confocal de estigma/estilete e óvulos de plantas transgênicas de *N. tabacum*.

Figura 26 - Microscopia confocal de tecido floral de planta transgênica *SCII*1gen_GFP.

Figura 27 - Representação esquemática da expressão de *SCII*.

Figura 28 - Representação esquemática do modelo proposto para a regulação transcricional de *SCII*.

Figura 29 - Representação esquemática da localização dos transcritos de *NAG1* e *SCII* no meristema floral.

Figura 30 – Representação esquemática do modelo proposto para atuação de *SCII*, *NAG1* e *WUS* no meristema floral.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de componentes para solução *Dropout* completa

Tabela 2- Lista de primers utilizados neste trabalho, para a amplificação e/ou sequenciamento dos clones.

LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

AD - *Activation Domain* – domínio de ativação do fator de transcrição GAL4

Ade – adenina

cDNA – DNA complementar

CDS - *Coding sequence* – sequência codificadora

dATP - *Deoxyadenosine triphosphate*

DEPC - Dietil Pirocarbonato

dH₂O - água deionizada

dNTP – *Deoxyribonucleotide 5'-triphosphate*

g – Força gravitacional

GFP – *Green Fluorescent Protein* – Proteína Verde Fluorescente

IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

LB - Luria-Bertani (meio de cultura)

LiAc – Acetato de lítio

MS - *Murashige e Skoog* (meio de cultura)

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OD₆₀₀ – *Optical Density* – Densidade Óptica a 600 nm

pb – Pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PEG3350 - *Polyethylene Glycol 3350*

RNAi – interferência por RNA

rpm – Rotações por minuto

SD – *Synthetic Dropout* (meio de cultura)

T.A. – Temperatura ambiente

Trp – Triptofano

UV – Ultravioleta

Ura – Uracila

w/v – Massa/volume

Y1H – *Yeast One-Hybrid* – Mono híbrido em leveduras

RESUMO

CRUZ, J. O. **A expressão de SCII e sua regulação transcricional no meristema floral de *Nicotiana tabacum*.** [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018. p. 110.

A flor se caracteriza como um ramo altamente modificado, especializado na reprodução das angiospermas. Por ser responsável por um processo tão crucial no ciclo de vida das plantas, o desenvolvimento das flores é estritamente regulado por vias genéticas e sinais ambientais que controlam a transição da fase vegetativa para fase reprodutiva. Esse controle culmina na determinação no meristema floral, o qual se diferenciará nos quatro verticilos florais: sépalas, pétalas, estames e pistilo. Dentre os quatro verticilos, os estames e o pistilo são os órgãos responsáveis pela reprodução, logo é de suma importância compreender mecanismos moleculares responsáveis pelo correto desenvolvimento desses órgãos. Com o intuito de melhor compreender o desenvolvimento do pistilo, nosso grupo de pesquisa fez a caracterização inicial de um gene preferencialmente expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum*, que controla a proliferação celular nesse órgão e foi denominado *SCII* (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*). No entanto, seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado. Avanços nas investigações tem revelado uma extensa rede de proteínas com as quais *SCII* interage, o que permitiu assumir que *SCII* está envolvido em vias de processamento de RNA e no ciclo celular. Seu envolvimento em processos celulares básicos, levantou a hipótese de uma possível expressão no início do desenvolvimento floral. Portanto, este trabalho teve por objetivos determinar onde e quando o gene *SCII* inicia sua expressão em flores de *Nicotiana tabacum*; relacionar a expressão de *SCII* com o desenvolvimento do pistilo; e analisar a regulação transcricional de *SCII*. Através da hibridização *in situ* foi possível determinar que *SCII* inicia sua expressão no meristema floral e segue se expressando intensamente nos primórdios iniciais dos verticilos florais. A expressão de *SCII* no meristema floral e primórdios dos verticilos indica que este gene pode estar envolvido no desenvolvimento de todos os verticilos florais. A medida que os verticilos se especificam, a expressão de *SCII* é reduzida, exceto no pistilo, órgão em que se localizam as últimas células meristemáticas a se diferenciarem. O mRNA de *SCII* foi detectado tanto nos carpelos não fusionados, quanto já fusionados. A hibridização *in situ* também revelou a co-expressão de *SCII* com o gene *NAG1* no meristema floral, nos verticilos dos estames e carpelos. *NAG1* codifica um fator de transcrição responsável pela especificação do terceiro e quarto verticilos florais e *SCII* foi descrito como um gene que controla o desenvolvimento de estigma

e estilete, estruturas que fazem parte do quarto verticilo, logo essa co-expressão revela uma possível interação desse fator de transcrição com o promotor de *SCII*. Essa interação foi predita *in silico* e confirmada em ensaio de mono híbrido (*Yeast One Hybrid*) com uma porção do promotor de *SCII*, denominada frag1, que compreende 443pb acima do códon de iniciação (ATG). Análises *in silico* também encontraram um putativo sítio para a interação do fator de transcrição WUSCHEL nesse mesmo fragmento, no entanto os resultados obtidos nos ensaios de mono híbrido para esta interação foram inconclusivos. Plantas transgênicas expressando a proteína SCII em fusão traducional a GFP, sob controle do promotor endógeno de *SCII*, foram capazes de reproduzir a expressão endógena desse gene e possibilitaram determinar a localização da proteína. Como o mRNA, a proteína SCII é encontrada a partir do meristema floral e em todos os verticilos florais. A medida que a flor se desenvolvia, a proteína foi reduzindo sua quantidade de maneira centrípeta nos verticilos, no entanto essa redução não foi observada no pistilo até o estágio 2, estágio em que foi possível a observação (devido ao tamanho da flor). Nessas plantas também foi possível detectar a proteína SCII nos tecidos especializados do estilete e estigma, tecido transmissor do estilete e zona secretória do estigma, respectivamente, assim como nas células do parênquima. Essas plantas também possibilitaram observar a proteína nos óvulos e confirmar sua localização em núcleo e nucléolo. Esse conjunto de dados confirmam a hipótese da expressão de *SCII* no meristema floral. Além disso, os resultados demonstram que a expressão de *SCII* é regulada diretamente pelo fator de transcrição NAG1.

Palavras Chave: Meristema floral; *SCII*; Interação proteína:DNA; Hibridização *in situ*; *NAG1*.

ABSTRACT

CRUZ, J. O. **The expression of *SCII* and its transcriptional regulation in the floral meristem of *Nicotiana tabacum*.** [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018. p.110.

The flower is characterized as a highly modified branch, specialized in the reproduction of angiosperms. Since it is responsible for such a crucial process in the life cycle of plants, flower development is strictly regulated by genetic pathways and environmental signals that control the transition from the vegetative phase to the reproductive phase. This control culminates in the floral meristem determination, which will differentiate in the four flower whorls: sepals, petals, stamens and pistil. Among the four whorls, stamens and pistil are the organs responsible for reproduction, so it is extremely important to understand the molecular mechanisms responsible for the correct development of these organs. In order to better understand the development of pistil, our research group made the initial characterization of a gene preferentially expressed in the pistil of *Nicotiana tabacum*, which controls cell proliferation in this organ and was denominated *SCII* (Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1). However, its mechanism of action has not yet been elucidated. Advances in the investigations have revealed an extensive network of proteins with which *SCII* interacts, which has allowed to assume that *SCII* is involved in RNA processing pathways and in the cell cycle. Its involvement in basic cellular processes, raised the hypothesis of a possible expression at the beginning of floral development. Therefore, this work had as objectives to determine where and when the *SCII* gene starts its expression in flowers of *Nicotiana tabacum*; to correlate *SCII* expression to pistil development; and to analyze the transcriptional regulation of *SCII*. Through *in situ* hybridization, it was possible to determine that *SCII* starts its expression in the floral meristem and continues to express intensely in the early primordia of floral whorls. The expression of *SCII* in floral meristem and whorl primordia indicates that this gene may be involved in the development of all floral whorls. As the whorls are specified, the expression of *SCII* is reduced, except in the pistil, organ in which the last meristematic cells are located. *SCII* mRNA was detected in both unfused and fused carpels. *In situ* hybridization also revealed the co-expression of *SCII* with the *NAG1* gene in the floral meristem, in the whorls of stamens and carpels. *NAG1* encodes a transcription factor responsible for the specification of the third and fourth floral whorls and *SCII* was described as a gene that controls the development of stigma and style, structures that are part of the fourth whorl, so this co-expression reveals a possible interaction

of this transcription factor with the *SCII* promoter. This interaction was predicted *in silico* and confirmed in a Yeast One Hybrid assay with a portion of the *SCII* promoter, called frag1, comprising 443bp upstream the initiation codon (ATG). *In silico* analyzes also found a putative site for the interaction of the WUSCHEL transcription factor in this same fragment, however the results obtained in Yeast One Hybrid assays for this interaction were inconclusive. Transgenic plants expressing the SCI1 protein in translational fusion to GFP, under the control of the endogenous *SCII* promoter, were able to reproduce the endogenous expression of this gene and enabled to determine the location of the protein. Like the mRNA, the SCI1 protein is found since the floral meristem and on all floral whorls. As the flower developed, the protein was reducing its amount in a centripetal way in the whorls, however this reduction was not observed in the pistil until the stage 2, the last stage in which the observation was possible (due to the size of the flower). In these plants it was also possible to detect the SCI1 protein in the specialized tissues of style and stigma, stilar transmitting tissue and stigmatic secretory zone, respectively, as well as in the parenchyma cells. These plants also allowed the observation of the protein in ovules and to confirm its localization in nucleus and nucleolus. This data set confirms the hypothesis of *SCII* expression in floral meristem. In addition, the results demonstrate that *SCII* expression is directly regulated by the transcription factor NAG1.

Keywords: Floral meristem; *SCII*; DNA:protein interaction; *In situ* Hybridization; *NAG1*

1. INTRODUÇÃO

1.1 A flor e os órgãos reprodutivos das plantas

As angiospermas representam o maior grupo de plantas com aproximadamente 235.000 espécies descritas, com distribuição cosmopolita e grande diversidade morfológica (RAVEN, 2007 e APG IV). As flores caracterizam a maior inovação desse grupo e o seu surgimento possibilitou a diversificação e grande dispersão das angiospermas (BECKER; ALIX; DAMERVAL, 2011). Responsável pela reprodução, as flores apresentam grande variedade de estruturas e formas dentre espécies (FRIIS; PEDERSEN; CRANE, 2006).

Caracterizado como um ramo altamente modificado, as flores são constituídas de um receptáculo e de verticilos externos e internos, os órgãos florais estéreis e férteis respectivamente (MARIAH; SANTOS; BITENCOUT, 2006). Os órgãos estéreis, verticilos externos, são constituídos pelas sépalas e pétalas; os órgãos férteis, verticilos internos, são os estames e o pistilo (Figura 1). Os estames são constituídos pelo filete e antera, coletivamente referidos como androceu. Já os pistilos são formados pelo ovário, estilete e estigma, e o conjunto é denominado gineceu (ESAU, 1989). O gineceu tem função especialmente relevante no processo reprodutivo, visto que é responsável pelo reconhecimento e seleção dos grãos de pólen, direcionamento do tubo polínico e proteção dos óvulos e dos embriões (FRIIS; PEDERSEN; CRANE, 2006). Uma vez que a flor representa uma estrutura central na reprodução, a eficiência desse processo biológico nas angiospermas depende do desenvolvimento correto dos órgãos reprodutivos e da interação entre pólen e pistilo compatíveis (DEPAOLI et al., 2011). Consequentemente, os processos que levam ao desenvolvimento da flor envolvem uma intensa regulação de genes envolvidos com a iniciação, desenvolvimento e término floral, assim como também, a ação de fatores ambientais que atuam como sinais que determinam o início da fase reprodutiva da planta (LEVY, 1998).

Figura 1 Representação esquemática da flor de angiosperma (*Nicotiana tabacum*), evidenciando os órgão estéreis, sépalas e pétalas e órgãos férteis, estames e pistilo (FERREIRA, 2016)

1.2 Regulação da transcrição: Elementos *Cis*-atuantes

Um gene eucariótico é composto basicamente por uma sequência promotora; uma região codificante, sequência *downstream* ao promotor composta de éxons e introns, e a sequência terminadora (ALBERTS et al, 2008) (Figura 2). O promotor tem função de regular a expressão da sequência *downstream* a ele (ALBERTS et al., 2008). Pode ser dividido em promotor núcleo ou promotor mínimo, sendo a região onde se liga a RNA polimerase, e sequências regulatórias *cis*-regulatórias ou *cis*-atuantes, as quais tem a função de regular a transcrição (TAIZ e ZAIGER, 2009)

Figura 2 Representação esquemática de um gene eucariótico, composto por Enhancer, sequência regulatória ou promotor regulatório, promotor núcleo e gene, elementos acentuadores e insuladores. Figura adaptada de. Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and technique. CAREY, M & SMALE, S. T. 1999.

A regulação da expressão gênica em eucariotos é um processo que inclui diversos mecanismos, como condensação da cromatina, *splicing*, estabilidade dos RNAs mensageiros, controle traducional, degradação de proteína, além das várias formas de modificações pós-traducionais (PIERCE, 2011) e, também, a ação de microRNAs (GULYAEVA; KUSHLINSKIY, 2016). Entretanto, para os genes eucarióticos, o início da transcrição é um passo primário de regulação, pois este determina quando e onde o mRNA será produzido (TAIZ & ZAIGER, 2005). O controle transcricional da expressão é feito através do reconhecimento e ligação das sequências regulatórias (*cis*-atuantes) no promotor por fatores de transcrição (FT).

No genoma de *A. thaliana* existem cerca de 2000 FT (GUO et al., 2005). Em *N. tabacum* foram identificados 5176 FT, que puderam ser agrupados em 56 famílias (ZHANG et al., 2011; JIN et al., 2016). No entanto, o genoma dessa espécie, apesar de todo sequenciado, ainda contém muitos erros de anotação, o que pode resultar na redução ou mesmo aumento nesse número.

Em plantas, a ação dos elementos *cis*-atuantes é descrita na regulação de vários processos como, produção de carotenóides (AHRAZEM et al., 2010), resposta ao estresse abiótico (HWANG et al., 2010), e desenvolvimento de raiz (FRANSSEN et al., 2017). No processo de florescimento, esses elementos estão envolvidos desde a evocação floral (KUSTERS et al., 2015; YE et al., 2016; WANG et al., 2016) até a especificação dos órgãos florais (SIEBURTH; MEYEROWITZ, 1997; TILLY; ALLEN; JACK, 1998).

Uma das sequências regulatórias mais extensivamente caracterizadas, até então, são as CArG-box (SHORE; SHARROCKS, 1995). Primeiramente identificada *upstream* a todos os genes regulados pelo *serum responsive fator* (SRF), que atua regulando a proliferação e diferenciação celular no músculo cardíaco (NORMAN et al., 1988), essas sequências de 10 pares de bases conservadas, são requeridas para a ligação de proteínas que atuam como fatores de transcrição (PELLEGRINI; TAN; RICHMOND, 1995; MUIÑO et al., 2014). Como observado pelos autores Pellegrini; Tan; Richmond (1995), essas sequências formam um sulco menor que pode ser especificamente reconhecido por proteínas que inserem a cadeia lateral de uma arginina altamente conservada para efetuar a ligação. Em plantas, essas sequências são sítios de ligação para as proteínas MADS-box que controlam a via de especificação dos órgãos florais (SHORE & SHARROCKS, 1995). As proteínas MADS-box formam tetrâmeros específicos para cada função e se ligam às sequências CArG-box, através da porção amino terminal de cada proteína que compõe o tetrâmero (THEISSEN; SAEDLER, 2001). O reconhecimento dessas sequências pelas proteínas MADS-box se dá da mesma maneira que a observada para o SRF e,

aparentemente, essa é uma forma amplamente conservada de reconhecimento e ligação específica a sequências de DNA (ROHS et al, 2009).

1.3 Evocação floral

O processo de evocação floral tem sido amplamente estudado nas últimas décadas e, com isso, diversas elucidações foram obtidas. Na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* esse processo é regulado por uma complexa rede de fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, fatores endógenos como sinalização hormonal e vias genéticas (INGRAM; WAITES, 2006; CIANNAMEA et al., 2006). Esses fatores atuam no meristema apical do caule promovendo a transição do meristema da fase vegetativa (*shoot apical meristem* - SAM) para o meristema de fase reprodutiva da planta, ao originar o meristema da inflorescência (*inflorescence meristema* - IM) (LEVY, 1998). Os sinais ambientais e endógenos resultam na ativação dos genes integradores da via de florescimento, como *FLOWERING LOCUS T (FT)* e *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*. Esses genes são transcricionalmente regulados de forma direta e indireta pelos fatores acima citados, culminando na transição para IM (KARDAILSK et al., 1999; MOURADOV; CREMER; COUPLAND, 2002).

Em *A. thaliana*, para garantir a correta expressão espacial e temporal de *FT* e *SOC1*, um complexo repressor, que consiste de dois fatores de transcrição MADS-Box, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* e *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (HARTMANN et al., 2000; MATEOS et al., 2015), atua controlando esses genes. Esse complexo opera reprimindo a expressão do *FT* nas folhas e, conseqüentemente, bloqueia sua translocação para SAM. Essa translocação é necessária para ativação de *SOC1* e *API* (WIGGE et al., 2005). O bloqueio da expressão de *SOC1* também é feito de forma direta por *FLC* no meristema apical do caule (SEARLE et al., 2006). Dessa forma, esse complexo inibidor impede que a planta entre na fase reprodutiva de forma precoce.

Os sinais de florescimento inibem o complexo repressor, principalmente pelas vias da giberelina e os sensores de temperatura, que mutuamente funcionam na ativação *FT* e *SOC1*. Dessa forma, pode-se concluir que a função dos sinais de florescimento é atuar como mecanismos desrepressores de genes de transição para o florescimento (LIU; THONG; YU, 2009). De forma geral, a interação dos reguladores mencionados anteriormente é responsável por mediar a transição da fase vegetativa para o florescimento, culminando na ativação dos genes *LEAFY (LFY)* e *APETALA1 (API)*, responsáveis pela evocação do meristema floral

(WEIGEL, 2000). Entretanto, a iniciação do meristema floral não depende somente das vias citadas, mas também, da polarização SAM e o influxo de auxina (BLÁZQUEZ et al., 2006). Uma síntese das vias envolvidas na transição para o florescimento é esquematizada abaixo (Figura 3).

Figura 3 - Regulação da identidade do meristema. A identidade do meristema floral é regulada pela integração de múltiplos sinais de florescimento. *SOC1* e *FT* atuam como integradores dessas vias percebendo os sinais ambientais e desenvolvimentais através das várias vias do florescimento. Durante a transição floral, o complexo *FLC-SVP* reprime a expressão de *SOC1* e *FT* nas folhas e no meristema apical, enquanto que o complexo *FT-FD* promove a expressão de *SOC1* e *API*. No interior do meristema, o incremento da expressão de *SOC1* e *FT* promove a expressão dos genes cadastrais do meristema floral, incluindo *LFY* e *API*, e a partir de então dá-se início ao desenvolvimento dos meristemas florais a partir do meristema de inflorescência. Figura adaptada de Liu et al. (2009).

1.4 Iniciação, manutenção e término do meristema floral

Os genes *LFY* e *API* atuam de maneira parcialmente redundante, e a expressão destes resulta na especificação do meristema floral (WEIGEL et al., 1995). A consequência da perda da expressão de um destes dois genes é a reversão para IM (WEIGEL, 2000). Por outro lado, a expressão de *LFY* ou *API* em órgãos não reprodutivos faz com que eles se convertam em meristema floral, causando a supressão da fase juvenil (PEÑA et al., 2001). A reversão do meristema floral para meristema vegetativo é resultado da ação do gene *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), que exerce ação antagônica aos genes de evocação do meristema floral (SHANNON; MEEKS-WAGNER, 1991). Esse mecanismo é necessário para a indução do meristema floral, bem como a manutenção de sua identidade, e assim, permitir o correto desenvolvimento da flor

(PARCY; BOMBLIES; WEIGEL, 2002). Pois, como descrito por Shannon; Meeks-Wagner (1993), quando a expressão desses genes é reduzida, as flores se desenvolvem em estruturas semelhantes a folhas.

O gene *LFY* atua como o regulador central, orquestrando toda a rede de genes que atuam *downstream* a ele e estão envolvidos no desenvolvimento floral (MOYROUD et al., 2010). O *LFY* codifica um fator de transcrição exclusivo do reino vegetal, que se liga de maneira “sequência específica” através do motivo hélice-alfa-hélice (FRANÇOIS et al, 1998), ativando, dessa forma, *AP1* no meristema floral jovem. Essa ativação tem como consequência a expressão uniforme de *AP1* no primórdio floral (BRAND et al., 2000). A proteína LFY persiste até o estágio 3 da flor de *A. thaliana* e, como mostrado por Brand et al (2000), este fator de transcrição atua na ativação do gene *AGAMOUS* (*AG*) no centro do meristema floral.

A manutenção do meristema funcional requer uma coordenação entre a perda da pluripotência das células meristemáticas, através da diferenciação, e a manutenção dessa pluripotência através da divisão de células primordiais, células indiferenciadas (BRAND et al., 2000). No meristema apical, de forma geral, essa manutenção é exercida por um *loop* de *feedback* entre *WUSCHEL* (*WUS*), fator de transcrição que contém um homeodomínio, e os genes da via *CLAVATA* (*CLV*), *CLV1*, *CLV2* e *CLV3*, responsáveis por inibir a expressão de *WUS* no meristema apical (MAYER et al., 1998). Em plantas adultas, *WUS* se expressa em uma pequena população de células da camada L3 do meristema apical. Esse sítio de expressão não é o mesmo dos genes da via *CLAVATA*, logo, é necessária uma sinalização entre as camadas L1, L2 e L3 para que ocorra a regulação de *WUS* (FLETCHER, 2002). Essa sinalização é feita pelos próprios genes da via *CLAVATA*. Na camada L1, *CLV3* se expressa codificando uma pequena proteína que é necessária para ativar a expressão de *CVL1* (CLARK, 2001). A proteína *CLV2* é requerida para o acúmulo de *CLV1* e também participa da via de sinalização entre as camadas L1, L2 e L3 (JEONG; TROTOCHAUD; CLARK, 1999). Através dessa sinalização, o complexo ligante do gene *CLV3* atua inativando o *WUS*, levando a um *loop* de *feedback* negativo que também inativa o *CLV3*, impedindo que o restante da via seja expressa (FLETCHER, 2002).

Entretanto, o meristema floral não é equivalente ao meristema apical, pois esses meristemas originam órgãos diferentes (IRISH, 2010). Apesar de *WUS* ser o responsável pela manutenção das células em estado indiferenciado no meristema floral, o término da atividade meristemática neste órgão é regulado por outros genes, uma vez que *CLV3* se expressa em domínios adjacentes ao meristema floral (FLETCHER, 2002). O término da pluripotência no

meristema floral é regulado por dois genes (Figura 4), um deles é o *LFY*, um dos genes de especificação do meristema floral. Como foi dito, *LFY* codifica uma proteína de ligação ao DNA que atua regulando diretamente a transcrição de genes, que possuem sequências específicas para seu reconhecimento e ligação, e são expressos *downstream* a ela. Um desses genes é o *AG* (PARCY; BOMBLIES; WEIGEL, 2002), gene homeótico que codifica um fator de transcrição MADS-box necessário para especificação do terceiro e quarto verticilos florais (BOWMAN, 1989) e término da proliferação (LENHARD et al., 2001; LIU et al., 2011). O *AG* inicia sua expressão no centro do meristema floral, nas células que resultarão no androceu e gineceu. Essa especificidade é resultado da cooperação dos genes *LFY* e *WUS*. *WUS* se liga no segundo intron de *AG* (LOHMANN et al., 2001), adjacente a esse sítio há o sítio para a ligação de *LFY* mas, apesar dessa proximidade, a ligação dos dois fatores de transcrição ocorre de forma independente (LOHMANN et al., 2001) e resulta na ativação de *AG*. Segundo Lenhard et al. (2001), assim que ativado, *AG* reprime a expressão de *WUS* e, por fim, encerra produção das células meristemáticas figura 4.

Figura 4 - Feedback temporal da regulação do meristema floral. No meristema floral jovem, *LFY* + *WUS* se ligam a uma sequência *enhancer* de *AG* para induzir a transcrição desse gene no centro da flor em desenvolvimento. No momento da iniciação dos carpelos (ca), *AG* e um fator X (desconhecido) reprimem a expressão de *WUS* e levam ao término da atividade das células meristemáticas. Adaptado de Fletcher (2002).

1.5 Morfologia do meristema floral

Em algumas espécies, a transição do meristema vegetativo para o meristema reprodutivo resulta na formação de uma única flor. Porém, em outras espécies, como *A. thaliana* e *Nicotiana tabacum*, a transição dá lugar ao meristema de inflorescência, que em teoria pode dar origem a

um grande número de meristemas laterais, os meristemas florais, que por sua vez, determinam os órgãos que compõem a flor (ZIK; IRISH, 2003; YANOFISKY, 1995). O meristema floral difere dos meristemas apical do caule e da inflorescência em diferentes vias de desenvolvimento (IRISH, 2010). Uma vez que o meristema floral é iniciado, ocorre uma rápida mudança na sua geometria devido a divisões celulares que ocorrem em três dimensões (KWIATKOWSKA, 2008). O órgão, que antes da transição para fase reprodutiva tinha uma “aparência de cone”, agora apresenta um formato quase esférico (REDDY et al., 2004).

Em angiospermas, geralmente, o meristema floral é caracterizado pela presença de três camadas distintas, L1, L2, L3 (MEEKS-WAGNER, 1993; JENIK; IRISH, 2000; SATINA; BLAKESLEE, 1943) (Figura 5). Na flor de *Datura stramonium*, espécie da família *Solanaceae*, Satina; Blakeslee e Avery (1940) realizaram um estudo histológico em quimeras periclinais no qual foi possível caracterizar as três camadas germinativas. L1 e L2 são as camadas externas, coletivamente chamadas de túnica, composta de células em formato esférico e núcleo avantajado. As células da camada L1 se dividem de forma anticlinal com o objetivo de manter a organização da camada. Na camada L2 as divisões ocorrem de maneira anticlinal e periclinal. A camada L3, a mais interna, é o corpo do meristema, composta por várias camadas de células que se dividem em todas, as direções com o objetivo de manter uma população de células indiferenciadas até que ocorra a determinação de todos os órgãos florais.

Na flor de *Datura*, Satina (1944) destacou a contribuição das camadas meristemáticas na formação do estigma e estilete. Em *Arabidopsis*, que tem sido alvo de detalhadas análises, Jenik; Irish, (2000) concluíram que a formação dos órgãos e tecidos é resultado de um coordenado padrão de divisão celular entre as diferentes camadas de células, sendo que a camada L1 contribui para a epiderme, estigma, parte do tecido transmissor e o integumento dos óvulos, enquanto que os tecidos internos e o mesófilo são formados pelas camadas L2 e L3. Para os mesmos autores, a contribuição dessas camadas para a formação da flor varia com a relação à camada e o tecido considerado, sendo que a L2 e L3 apresentam maior plasticidade que a L1. Ao final, fica claro que a formação de tecidos e órgãos é resultado de um balanço entre proliferação e especificação celular, e logo há o envolvimento da maquinaria de controle celular.

Figura 5 – Representação esquemática do meristema floral de *N. tabacum*, evidenciando as três camadas meristemáticas. Azul, camada L1; amarelo, camada L2; laranja, camada L3; verde, bráctea.

1.6 Desenvolvimento da flor: Enfoque nos carpelos

Iniciada a partir do meristema floral, apesar da ampla variedade de formas, a flor apresenta uma arquitetura básica formada por sépalas, pétalas, estames e pistilo. Essa organização resulta de uma coordenada regulação gênica que culmina na ativação de genes homeóticos, que determinam a identidade dos órgãos florais (COEN; MEYEROWITZ, 1991). Atualmente, esse padrão de desenvolvimento é explicado pelo clássico modelo ABC (BOWMAN, 1991), hoje estendido para o modelo ABCDE (THEISSEN, 2000; THEISSEN and SAEDLER 2001). Esses modelos representam os seguintes genes: classe A, *APETALA1* (*AP1*) e *APETALA2* (*AP2*); B, *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*); C, *AGAMOUS* (*AG*); D, *SEEDSTICK* (*STK*), *SHATTERPROOF1* e *SHATTERPROOF2* (*SHP1* e *SHP2*); e a classe E, é composta por *SEPALLATA1*, *SEPALLATA 2*, *SEPALLATA 3* (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3*) (KAUFMANN; MELZER; THEISSE, 2005; YAN; CHEN; KAUFMANN, 2016) (Figura 6). Os genes que compõem esses modelos de desenvolvimento, exceto *AP2*, codificam fatores de transcrição da família MADS-box que se ligam no DNA a elementos denominados CArG -box, sequências consenso geralmente representadas pelas formas genéricas: CC[A,T]6GG ou CC[A,T]7G (RIECHMANN; MEYEROWITZ, 1997). O modelo ABCDE é denominado como quarteto floral baseado na interação de suas proteínas (THEISSEN, 2001) e usado para explicar a interação desses genes na especificação dos verticilos florais (PURANIK et al., 2014). Funcionando de maneira coordenada, esses complexos proteicos atuam na especificação dos verticilos florais (THEISSEN, 2001; DORNELAS et al., 2011), como demonstrado na Figura 6 (DORNELAS; DORNELAS, 2005).

Figura 6 - Revisão do modelo ABC de identidade dos verticilos florais. Em *A. thaliana* os genes da função A (*APETALA1*- *API*) formam as sépalas. Genes da função B (*APETALA3*-*AP3* e *PISTILATA*- *PI*) juntamente com os genes da função A, são necessários para a formação das pétalas. Os genes da função B mais os genes da função C (*AGAMOUS*- *AG*) especificam os estames. O gene da função C, sozinho, especifica o pistilo. A expansão do modelo foi necessária para incluir os genes das classes D e E, que são necessários para a especificação dos óvulos e a definição dos verticilos, respectivamente. A função D inclui os genes *SEEDSTICK* (*STK*), assim como também *SHATTERPROOF1* e *SHATTERPROOF2* (*SH1* e *SH2*). Os genes da função E são requeridos para a correta função das outras classes. Adaptada de Dornelas e Dornelas (2005).

O gene *AGAMOUS*, em especial, além da especificação dos carpelos, apresenta outras funções como, por exemplo, a terminação do meristema floral, e a ativação dos genes da classe D, que são responsáveis pela especificação da identidade dos óvulos (Figura 6).

Assim como em *A. thaliana*, em *N. tabacum* a especificação dos carpelos se dá pela ativação de *AGAMOUS*, nessa espécie, o homólogo *NAG1* (KEMPIN; MANDEL; YANOFISKY, 1993). O pistilo de *N. tabacum* é formado pela fusão de dois carpelos (DEPAOLI, 2010). Koltunow et al. (1990) dividiram o desenvolvimento da flor de *N. tabacum* em 19 estádios que vão do -7 ao 12 (Figura 7). A especificação dos carpelos ocorre ao final do estádio -7 e a fusão dos carpelos ocorre entre os estádios -6 e -4 (KOLTUNOW et al., 1990). Em seguida, inicia a formação da porção superior do pistilo, o estigma e o estilete. Essas estruturas se desenvolvem a partir das células da camada L2 do topo do pistilo. Nessa posição, as células aumentam em

número e tamanho rapidamente, devido ao ganho de citoplasma, resultando na formação do estilete e dos dois lóbulos do estigma (SATINA, 1944) no estágio -3 (KOLTUNOW et al., 1990). A formação do tecido transmissor do estilete, derivado da camada protodérmica L1, está conectada com o desenvolvimento do estigma (SATINA; BLAKESLEE, 1943). Em estádios iniciais do desenvolvimento floral, não há uma delimitação bem definida entre estigma e estilete. Esses podem ser delimitados a partir do momento em que começam a se desenvolver as células secretoras na zona secretória do estigma, ficando bem definidos quando passam a ser diferenciados os lóbulos estigmáticos (SATINA, 1944). Segundo Wolters-Arts et al. (1996), o maior índice mitótico no tecido transmissor do estilete e zona secretória do estigma ocorrem nos estádios iniciais do desenvolvimento, apresentando uma taxa de divisão 5 vezes maior até os estádios 1 e 2. Nestes estádios, já ocorreu a total diferenciação do ovário, do estigma e do estilete (KOLTUNOW et al., 1990) e, a partir de então, o índice de divisão é reduzido até o estágio 6 quando não ocorrem mais divisões. Por fim, a partir do estágio 6 as células passam por alongação até alcançar o estágio 12, quando ocorre a antese.

Figura 7- Estádios do desenvolvimento floral em *N. tabacum*. O início da formação dos verticilos florais ocorre no estágio -7, a partir de então, os verticilos seguem se diferenciando até o estágio 1, onde a diferenciação dos órgãos florais está completa, com exceção dos gametófitos masculino, grãos de pólen, e feminino, ovócitos. O estigma/estilete se prepara, dos estádios 1 ao 11, para os eventos da polinização, que ocorrerá no estágio 12 (antese). Os tamanhos médios (mm) de cada botão floral, do estágio -7 ao 12, são, respectivamente, 0,75, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 20, 22, 28, 39, 43, 45, 47 e 46. Modificado de Koltunow et al. (1990)

1.7 *SCII*

Um gene de expressão preferencial em estigma e estilete, descrito por nosso grupo de pesquisa, foi denominado *SCII* – *Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1* (DEPAOLI, 2010; DEPAOLI et al., 2011). A nomenclatura desse gene é relacionada à sua maior expressão nos órgãos estigma e estilete, quando comparada com a expressão nos outros órgãos da planta testados. O nome também diz respeito aos fenótipos observados quando analisadas as plantas

transgênicas para esse gene, silenciamento e superexpressão ($SCII^{Ri}$ e $SCII^{OE}$, respectivamente), as quais apresentaram fenótipos com alterações no tamanho do pistilo (DEPAOLI, 2010; DEPAOLI et al., 2011). As plantas $SCII^{Ri}$ possuem pistilos maiores em comparação com os da planta do tipo selvagem, resultado do maior número de células da zona secretória do estigma e do tecido transmissor do estilete (DEPAOLI et al., 2011). As plantas $SCII^{OE}$ apresentaram o fenótipo oposto aos das plantas de silenciamento, porém de maneira menos evidente. Essas plantas possuem estigmas menores quando comparados com a planta selvagem e, novamente, o fenótipo macro foi consequência da alteração em nível celular, pois foi detectada a redução do número de células nessas plantas (DEPAOLI, 2010; DEPAOLI et al., 2011).

Em *Arabidopsis thaliana*, os mesmos fenótipos foram observados nos mutantes *scil*+/- e *scil*-/-. Nestes, a proliferação celular foi aumentada na região superior do pistilo, com estiletos mais longos e mais células estigmáticas (DEPAOLI et al., 2014). Partindo da análise desses fenótipos, foi proposto que *SCII* é um inibidor tecido específico da proliferação celular e, dessa forma, esse gene fundaria uma nova família de inibidores da proliferação celular, com ação tecido específica (DEPAOLI et al., 2012; 2014).

Observando as plantas $SCII^{Ri}$, DePaoli et al. (2012) concluíram que seu fenótipo é similar ao fenótipo de pistilos de *A. thaliana* tratados com um inibidor reversível do efluxo de auxina, o NPA (N-1-naphthylphthalamic acid; NEMHAUSER et al., 2000). Adicionalmente, nas plantas $SCII^{Ri}$ e $SCII^{OE}$ foi observado que três genes regulados por auxina (ARF8, Aux/IAA13 e Aux/IAA19) se encontram alterados nas plantas (DEPAOLI et al., 2012), sendo que nas plantas $SCII^{OE}$ eles estão superexpressos e o oposto foi observado nas plantas $SCII^{Ri}$, quando comparadas com as plantas selvagens (DEPAOLI, 2010; DEPAOLI et al., 2012).

A relação de *SCII* com auxina também foi demonstrada por DePaoli et al. (2014) em *A. thaliana*, onde *AtSCII* teve expressão diminuída em mutantes com deficiência em auxina (*yuc2yuc6* e *npyl*). Os autores verificaram também que a aplicação de auxina, nas pétalas expressando *SCII* (YFP-*AtSCII*), acelera sua degradação. Com esse resultado, os autores sugerem uma provável sinalização realizada pela auxina que marca *AtSCII* para degradação. Esses dados indicam que as proteínas *SCII* e *AtSCII* possam influenciar a transcrição de genes de respostas à auxina e que sua expressão esteja regulada por esse hormônio.

Em linhas gerais, foi proposto que a ação de *SCII* envolve a regulação do ciclo celular, provavelmente afetando o funcionamento de complexos ciclina/CDK e em uma via de sinalização de auxina (DEPAOLI et al., 2011; 2012; 2014). Para compreender os possíveis

mecanismos de ação de *SCII*, foram realizados experimentos de interação proteína-proteína em larga-escala, através de métodos genéticos e bioquímicos (STRINI, 2014). Como método genético, empregou-se o duplo-híbrido em leveduras, utilizando *SCII* como isca e uma biblioteca de cDNAs de estigmas e estiletes como presas (STRINI, 2014). Esse método permite avaliar interações físicas diretas entre duas proteínas (BRÜCKNER et al., 2009). O método bioquímico foi o *pulldown*, utilizando *SCII* recombinante como isca e extratos proteicos de estigmas e estiletes de *N. tabacum* como fonte de putativas presas. Em seguida, as proteínas ligantes foram separadas por SDS-PAGE e identificadas por espectrometria de massas (STRINI, 2014).

Nesses ensaios, Strini (2014) encontrou proteínas parceiras de interação de *SCII* envolvidas em diferentes processos celulares, sendo que algumas delas chamaram atenção. No duplo-híbrido, foram encontradas as proteínas DEAD-BOX RNA Helicase 35 e uma proteína com domínio SWAP/SURP, ambos membros de famílias com envolvimento no processamento de RNAs. Já no experimento de *pulldown*, foi encontrada uma Ciclina B1 e também uma CDK, proteínas cujas famílias possuem membros bem descritos no controle do ciclo celular.

A localização subcelular de *SCII* foi investigada por Strini (2014) e Pinoti (2016), que demonstraram que *SCII* co-localiza com proteínas marcadoras de *splicing speckles* e *cyclophilin-containing speckles*. Strini (2014) também identificou, como parceiras de interação de *SCII*, uma CDK (homóloga de At1g67580 de *Arabidopsis* - CDKG;2), uma ciclina (homóloga de At2g26430 de *Arabidopsis* – *Arginine-rich cyclin 1/Cyclin-L1*), ambas relacionadas ao processo de *splicing*. Ensaios de interação mostraram que *SCII*, DEAD-box e Ciclina-L1 interagem com a proteína spliceossomal U2a' e os fatores de *splicing* RS2Z33 e SR45 (PINOTI, 2016). O conjunto destes resultados são fortes indícios do envolvimento de *SCII* no metabolismo de RNA.

Até o presente momento, os resultados obtidos revelam as possíveis vias em que *SCII* pode atuar no desenvolvimento floral. No entanto, ainda não há nenhuma informação sobre a regulação desse gene. *SCII* é regulado transcricionalmente? Se sim, quais os elementos responsáveis pela ativação de *SCII*? *SCII* é expresso no meristema floral? Diante disso, fica clara a necessidade de ampliar os estudos sobre a expressão do gene *SCII* e sua regulação, além das implicações no desenvolvimento dos carpelos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo geral responder às seguintes perguntas:

SCII é expresso no meristema floral?

O que o local da expressão de *SCII* pode revelar sobre seu papel no desenvolvimento do pistilo?

SCII é alvo do fator de transcrição AGAMOUS (*NAG1*), de identidade do carpelo?

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, esse trabalho teve como objetivos específicos:

Analisar a expressão de *SCII* no meristema floral e nos estádios iniciais da flor de *N. tabacum*;

Comparar a expressão espacial de *SCII* com o gene de identidade de carpelo em *N. tabacum* (*NAG1*);

Clonar a sequência genômica de *SCII* de *N. tabacum*;

Testar se o fator de transcrição *NAG1* interage com a sequência genômica de *SCII*

Produzir plantas transgênicas expressando a proteína *SCII* fusionada à GFP em sua extremidade carboxi-terminal, sob controle do promotor endógeno;

Analisar se as plantas transgênicas expressam *SCII*-GFP de forma semelhante ao gene *SCII* endógeno

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROTOCOLOS ADOTADOS

3.1.1 Material vegetal e cultivo

Sementes da espécie *Nicotiana tabacum* cv Petit Havana SR-1 foram esterilizadas e germinadas *in vitro* sob condições estéreis para produção das plantas transgênicas *SCII_{prom}::SCII-GFP*, e mantidas em incubadora Mod.347CDG nas condições de 26°C e 16h luz e 8h escuro até que completassem um tamanho ideal para dar seguimento ao experimento. Sementes da mesma cultivar também foram germinadas e as plantas levadas à casa de vegetação para serem utilizadas como controles nos experimentos. As plantas SR1 e as plantas transgênicas foram mantidas em casa de vegetação na cidade de Ribeirão Preto – SP, Brasil. (Latitude - 21° 10'24" S, Longitude - 47° 48'24" W, com média de temperatura de 22°C no inverno e 27°C no verão; a diferença entre dia longos e curtos é de menos de duas horas). As irrigações eram feitas diariamente, por aspersão automática, a cada 12h.

3.1.2 Transformação de plantas

Plantas selvagens de *N. tabacum* (SR1) crescidas em condições estéreis foram utilizadas para obtenção das plantas transgênicas estáveis. Plantas com aproximadamente seis semanas (após semeadura), *in vitro*, tiveram suas as folhas coletadas e cortadas em pequenos discos foliares de 0,5cm, o corte com lâmina de bisturi provoca lesões nas bordas dos discos, o que permite a liberação da molécula-sinal (acetoseringona) pelas células foliares. Essa molécula, induz a transferência do T-DNA de interesse, presente em *Agrobacterium*, para o genoma vegetal (STACHEL et al., 1985). Os discos foliares foram imersos em 20 ml de meio MS líquido em placa de Petri. A esses 20 ml de meio foi acrescido 750 µl de cultura de *Agrobacterium* portando a construção de interesse previamente confirmada por PCR. Os discos foliares foram mantidos por 48 h no escuro nessa cultura (meio MS + cultura de *Agrobacterium* portando a construção de interesse).

3.1.3 Manipulação de Micro-organismos

3.1.3.1 Preparação de células de *Escherichia coli* (*E. coli*), cepa DH10B, eletrocompetentes

A cepa DH10B foi estriada em uma placa contendo meio LB sólido e incubada por um período de 16 horas, a 37°C. Uma colônia foi transferida para 5ml de meio LB líquido e incubada por 16 horas a 37°C sob agitação de 220 rpm (Incubadora *Shaker* Innova 4000). No dia posterior, 200 µl do inóculo foi transferido para 200 ml de meio LB. A cultura foi mantida a 37°C, sob agitação de 220 rpm por aproximadamente 3 horas ou até atingir a OD₆₀₀ entre 0,4-0,6. A cultura foi então mantida no gelo durante 30 minutos e em seguida foi centrifugada, todas as centrifugações foram feitas a 1100 x g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 200ml de água estéril a 4°C e então centrifugada. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100ml de água estéril a 4°C e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10ml de glicerol 10% a 4°C e novamente centrifugadas. Na última etapa, as células foram ressuspensas em 500µl de glicerol 10% a 4°C e separadas em alíquotas de 40µl as quais foram armazenadas em freezer -70.

3.1.3.2 Transformação de células DH10B eletrocompetentes

Para as transformações foram usados (40 µl) de células eletrocompetentes. As células foram descongeladas em gelo, e então adicionados 1- 2 µl do DNA plasmidial de interesse. A mistura foi adicionada em uma cubeta de eletroporação de 10 mm (BioRad) previamente gelada e então ajustada no eletroporador *GenePulse II* (BioRad), onde foi submetida a um pulso elétrico de 1.8 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω durante 5s. Após o pulso foi adicionado 1 ml de meio LB líquido para recuperar as células da cubeta, e o volume foi transferido para um tubo de ensaio e levadas ao *shaker* (Innova 4000) onde foi mantido por uma hora a 37°C e rotação constante de 220 rpm. Após esse período um volume de 100-300 µl da cultura foram plaqueadas em meio LB sólido com antibiótico específico para seleção dos transformantes. As bactérias cresceram em estufa a 37°C por 16-20 h.

3.1.3.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de *A. tumefaciens* foi semelhante à de *E. coli*, no entanto existem algumas diferenças: após o pulso elétrico, as células foram incubadas a 28°C e 150 rpm durante 4 h; foram plaqueadas 40-50 µl dessa cultura em meio sólido com antibiótico para seleção dos transformantes, e a placa foi incubada a 28°C por 48 h para crescimento das bactérias.

3.1.3.4 Preparação de inóculos para crescimentos das colônias transformadas

Após a transformação, um número de colônias foi analisado. Para isso, colônias isoladas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5ml de meio de cultura LB líquido, suplementado com antibiótico para seleção e incubados a 37°C, sob agitação 220rpm por 16-20 horas em incubadora (Innova 4000).

3.1.3.5 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de choque térmico

Anterior à transformação de células de *S. cerevisiae*, a cepa PJ69-4a (*trp1-901*; *leu2-3,112*; *ura3-52*; *his3-200*; *gal4Δ*; *gal80Δ*; *GAL2-ADE2*; *lys2::GAL1-HIS3*; *met2::GAL7-lacZ*), foi estriada em meio SD sólido com solução *dropout* “completa” 1X. Essas células cresceram por 48 h em estufa a 30°C, e, após esse período foram mantidas a 20°C por no máximo duas semanas (DEFOLTER & IMMINK, 2011). Para a transformação, uma colônia foi inoculada em 5 ml de meio SD líquido com solução *dropout* “completa” 1X, e incubada *overnight* a 30°C e rotação de constante de 250 rpm. Na manhã do dia da transformação, uma quantidade suficiente para alcançar uma OD₆₀₀ de 0,2 foi retirado da cultura e inoculado em 30 ml de meio SD líquido com solução *dropout* “completa” 1X, e mantido a 30°C e rotação constante de 230 rpm até atingir OD₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Para cada transformação foram utilizados 2 ml dessa cultura. Os 2 ml foram centrifugados a 18000 x g por 5 s. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 ml de LiAc 100 mM e incubadas a T.A. por 1 min. A mistura foi centrifugada a 18000 x g por 10s e o sobrenadante removido. O precipitado de células foi ressuspensado com 240 µl de PEG3350 50%, e em seguida foi adicionada a mistura: 500 ng do DNA plasmidial + água deionizada estéril em q.s.p. 70 µl. Posteriormente, foi adicionado 5 µl de DNA de esperma de salmão desnaturado (10 min a 95°C) e 36 µl de LiAc 1 M. A mistura de transformação foi agitada em vórtex por 1 min e incubada por 1 h a 42°C em banho-maria. Depois, foi centrifugada a 18000 x g por 10 s, e o sobrenadante descartado. O precipitado de

células foi ressuspensionado em 200 µl de água deionizada estéril, e centrifugado nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µl de água deionizada estéril. Essa solução foi plaqueada em meio SD sólido com solução *dropout* adequada para seleção dos transformantes, e as leveduras cresceram em estufa a 30°C por 72 h. Após esse período, as placas foram mantidas a 20°C por no máximo 2 semanas.

3.1.4 Manipulação de Ácidos Nucleicos

3.1.4.1 Mini preparação de DNA plasmidial de *Escherichia coli* método lisozima

Foram centrifugados 1,5 ml de cultura a 18000 x g por 2 min a T.A. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais uma vez. Depois de descartar o sobrenadante, as células precipitadas foram ressuspensionadas em 175 µl de tampão TES (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), pH 8,0; sacarose 15%). Foram adicionados 20 µl de lisozima (10mg/µl), e a mistura foi incubada por 10 min a T.A e em seguida em banho em banho-maria a 73°C por 15 min. O tubo foi centrifugado a 18000 x g por 15 min para separar o DNA plasmidial do DNA cromossômico e dos restos celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo os plasmídeos foi transferido a um novo tubo, onde houve a adição acetato de sódio 3 M (1/10 do volume total) e 2 volumes de etanol 100%. A mistura foi incubada a -70°C por 30 min, e em seguida centrifugada a 18000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos abertos em T.A. até a evaporação total do etanol. O DNA precipitado foi ressuspensionado com 50 µl de água deionizada estéril. As soluções contendo os plasmídeos foram armazenadas a -20°C.

3.1.4.2 Mini extração de DNA plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens*

O método de extração de DNA plasmidial de *A. tumefaciens* foi o da lise alcalina, baseado em protocolo de Brasileiro & Carneiro (1998). Previamente à extração, a colônia de interesse foi inoculada em meio LB suplementado com antibióticos de seleção e incubada por 24 h a 28°C e agitação constante de 250 rpm. Foi feito o estoque semipermanente em glicerol na concentração de 25%. Para a extração, 1,5 ml de cultura foi centrifugado por 2 min a 13400 x g e T.A. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado com 1 ml de Tampão I (NaCl 0,2 M em Tris-EDTA). A mistura foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido uma vez, e o precipitado

de células foi ressuspendido em 200 µl de Tampão I, ao qual foram acrescentados 200 µl de Solução I (NaOH 0,2 N; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1 %). Essa mistura foi homogeneizada e, em seguida, mantida em gelo por 15 min. Ainda no gelo, foram adicionados 150 µl de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) gelado. A mistura foi homogeneizada novamente e mantida em gelo por mais 30 min. O tubo foi então centrifugado a 13400 x g por 5 min em T.A. para separar o DNA plasmidial dos restos celulares e do DNA cromossômico. O sobrenadante resultante foi transferido a um novo tubo, onde adicionado 2 volumes de etanol absoluto, e mantido a -20°C por no mínimo 1h para ocorrer a precipitação do DNA. Em seguida, esse tubo foi centrifugado a 13400 x g em T.A. por 30 min e o sobrenadante descartado a seguir. O precipitado foi lavado com 400 µl de etanol 70 % e centrifugado novamente por 2 min nas mesmas condições anteriores. Depois de descartado o etanol, o tubo foi deixado aberto a T.A. até a evaporação total do etanol residual, e o precipitado foi ressuspendido em 20 µl de água deionizada estéril e armazenado para confirmação dos transformantes.

3.1.4.3 Midi-preparação de DNA plasmidial pelo método lisozima

Para a midi-preparação de DNA, inicialmente foi preparada uma cultura bacteriana de 50ml, a 37°C por 16-20 horas em meio LB, suplementado com quantidade adequada de antibiótico específico para seleção. As células bacterianas foram precipitadas em tubo de 50ml, submetendo-as a uma centrifugação por 10 minutos, numa velocidade de 1.100 x g a 4°C em centrífuga Sorval® RC6 plus. Posteriormente, todo o precipitado foi completamente ressuspendido em 1ml de TE 50/1 gelado (50mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1mM EDTA, pH 8,0) e em seguida, a ressuspensão foi transferida para um tubo Nalgene previamente gelado, e ao mesmo foram adicionadas 315µl de lisozima (10mg/ml). Após inversão do tubo por 10 vezes a mistura foi incubada no gelo por 5 minutos e, em seguida, foram adicionadas 250µl de EDTA 0,5M pH 8,0 (o tubo foi invertido lentamente algumas vezes) e mantido novamente no gelo por 5 minutos. 18,75µl de uma solução 10% de Triton X-100 e 100µl de TE 50/1 foi adicionado ao tubo e este foi novamente invertido com cautela por 10 vezes. Após incubação no gelo por 30 minutos, a mistura foi centrifugada por 1 hora e 30 minutos a 2.887 x g. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15ml e então submetido a uma limpeza com fenol/clorofórmio. Foi adicionando 1,25ml de fenol, agitado em vórtex, centrifugado 1.375 x g por 20 minutos. A fase superior foi transferida para um tubo de 15ml limpo e foi adicionado 1,25ml de clorofórmio, a mistura foi centrifugada a 1.375 x g por 5 minutos. A fase superior foi transferida para um tubo de 2ml e foi adicionado 125µl de acetato de potássio 5M e 1ml de isopropanol, o conteúdo do

tubo foi invertido algumas vezes para misturar e então centrifugado a 2.887 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o tubo mantido aberto para que o isopropanol evaporasse totalmente, após evaporado todo o álcool o DNA foi ressuspensionado em 100µL de tampão TE (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA, pH 8,0).

3.1.4.4 Extração de DNA genômico de folhas de *N. tabacum*

A extração do DNA genômico de folhas de *N. tabacum* foi feita de acordo com o protocolo descrito em Edwards et al. (1991). Uma amostra de tecido foliar de cada planta foi coletada utilizando-se a tampa do microtubo de 1,5ml estéril como molde para o disco foliar. Para isso, um pedaço de folha foi colocado entre a tampa e o corpo do tubo, e a tampa foi pressionada para baixo até fechar o tubo. Com isso, forma-se um disco foliar com tamanho uniforme para uniformizar as extrações das diferentes plantas. O tecido foi macerado dentro do mesmo tubo, utilizando-se pistilos estéreis até o material estar bem macerado. 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 vórtex por 5 segundos. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, procedeu-se com a centrifugação dos tubos 18000 x g por 1 minuto (centrifuga Eppendorf 5415 D) e 300 µl do sobrenadante foram transferidos para novo tubo. Foram adicionados 300µl de isopropanol e as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugou-se a 13400 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensionado em 100 µl de água ultrapura 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.

3.1.4.5 Purificação de DNA plasmidial pelo método fenol/clorofórmio

Os DNAs obtidos a partir de mini e mid preparação pelo método de lisozima pode conter contaminações como proteínas e outras macromoléculas, logo eles passaram por um processo de purificação para dar continuidade aos experimentos. O método utilizado para isso foi o fenol/clorofórmio. Para a purificação, o volume inicial da solução de DNA plasmidial foi completado com água deionizada estéril q.s.p. 400 µl. À essa solução foram adicionados 4 µl de solução de RNase (10 mg/µl), e a mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por 30 min. Depois, foram adicionados 400 µl de fenol tamponado em pH 8,0, e a mistura foi misturada no

vórtex por 1 min e centrifugada a 13400 x g por 3 min e T.A. A fase superior da mistura foi removida e transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1. Esse tubo foi misturado em vórtex e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A fase superior da mistura foi novamente removida e transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado acetato de sódio 3 M (1/10 de volume) e etanol absoluto gelado (2 volumes). Essa mistura foi mantida a -70°C por 30 min para ocorrer a precipitação do DNA plasmidial. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13400 x g por 15 min e T.A. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400 µl de etanol 70 %, passando por nova centrifugação por 3 min nas mesmas condições da anterior. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo foi mantido aberto em T.A. até a evaporação do etanol residual. O precipitado foi ressuspenso em 50 µl de água deionizada estéril.

3.1.4.6 Extração de RNA

Todas as soluções para uso com RNA foram preparadas com água ultrapura tratada com DEPC (Dietil Pirocarbonato) e as vidrarias tratadas com água oxigenada 10 volumes. O RNA total foi extraído de diferentes amostras de acordo necessário. A amostra (100-500 mg) foi macerada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofarizes e pistilos. O material macerado foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml. A extração do RNA total 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 vórtex 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 Sorval® RC6 plus, Termo Electron corporation). A fase aquosa (fase superior, que contém o RNA) foi 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 vórtex e centrifugada a 7500 x g por 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado. O tubo foi mantido aberto por 10 minutos para evaporação do etanol e secagem do precipitado. Ao final da

extração, o RNA foi ressuspensionado em 50 µl de água DEPC 0,1%. As amostras foram quantificadas em *NanoDrop 2000* e armazenadas a -70°C.

3.1.4.7 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando-se a enzima transcriptase reversa III (*Superscript® III Reverse Transcriptase, Invitrogen*). Em um tubo de 200µl livre de RNase foram adicionados 1 µl de oligo(dT) (50 µM), 5 µg de RNA total, 1 µl de dNTP Mix (10 mM de cada: dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e água DEPC para completar o volume de 13 µl. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e imediatamente transferida para o gelo por 2 minutos. Após uma breve centrifugação, foram adicionados à mistura: 4 µl de *First-Strand Buffer 5X*, 1 µl de DTT 0.1M, 1 µl de *RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor* e 1 µl of *SuperScript™ III RT* (200 unidades/µl). O conteúdo foi homogeneizado com a pipeta e incubado em termociclador a 50°C por 40 minutos e a 55°C por 20 minutos. Em seguida, a reação foi inativada, aquecendo-se o tubo a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -70°C.

3.1.4.8 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram preparadas pela técnica do Laboratório Dra. Andréa Carla Quiapim da Silva e encaminhadas para laboratórios que ofereciam o serviço de sequenciamento

3.1.5. Clonagens

3.1.5.1 Clonagem de sequência nos vetores do sistema TOPO TA

A clonagem nos vetores do sistema TOPO- TA se dá através de uma reação de ligação entre os nucleotídeos adenina nas extremidades do fragmento a ser ligado e os nucleotídeos timina em sítios específicos do vetor. A reação é catalisada pela enzima DNA topoisomerase I que funciona tanto como uma endonuclease de restrição quanto como uma enzima ligase. Por tanto para que seja possível a reação é necessária que as extremidades dos fragmentos a serem clonados sejam *3'dA-tailed*, para isso durante a clonagem podem ser usadas enzimas *Taq polimerase* que possua essa capacidade de finalizar os fragmentos dessa forma ou após a reação

de PCR, pode ser feita uma reação de adenilação para inserção dos nucleotídeos adenina nas extremidades do fragmento. As reações de clonagem com esse vetor foram feitas com 4 µl do produto da PCR, 1 µl da diluição 1:4 da solução salina [1,2 M de NaCl; 60 mM de MgCl₂) e 1 µl do vetor. As reações foram mantidas por 16-20 horas à temperatura ambiente. No dia posterior, as ligações foram transformadas em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes e plaqueadas em meio LB suplementado com X-gal, IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e antibiótico para seleção dos transformantes. As placas permaneceram por 16-20 horas a 37°C. Das placas foram selecionadas as colônias com coloração branca, pois o sítio para ligação do inserto se localiza dentro da sequência do gene que metaboliza o carboidrato X-gal e dá uma coloração azul para as colônias, assim as colônias portando a sequência de interesse produzem a enzima *β-galactosidase* truncada e dessa forma apresentam coloração branca.

3.1.5.2 Clonagem com o sistema *Gateway*

As reações de recombinação realizadas até então, foram todas desenvolvidas utilizando o sistema *Gateway*® (*Gateway*® Technology, Life Technologies). Esse sistema tem como principal característica a manutenção do *frame* de leitura da sequência inserida nos vetores do sistema, pois baseia-se no princípio de recombinação sítio específica do bacteriófago λ (HARTLEY; TEMPLE; BRASCH, 2000). As recombinações ocorrem nos sítios *att* que estão presentes tanto na sequência de DNA de interesse quanto nos vetores de clonagem e expressão. Os sítios *att* somam-se quatro, os *attB1* e *attB2* são inseridos via reação de PCR na sequência a ser clonada, esses sítios se recombinam com sítios *attP1* e *attP2* presentes no vetor (pDONR) através de uma reação BP. Essa recombinação resulta formação dos sítios *attL1* e *attL2* que passam a flanquear a sequência de interesse no vetor para entrada no sistema *Gateway*® (pENTRY). A recombinação nos vetores de expressão é feita através de uma reação LR, os sítios *attLs* como já dito, presentes no vetor de entrada, e os sítios *attR1* e *attR2* presentes nos vetores destino vazios. Após a recombinação do vetor destino com o vetor pENTRY é então gerado um clone de expressão em que a sequência clonada é flanqueada pelos sítios *AttBs*. Note que o garante a especificidade de recombinação e manutenção do *frame* de leitura é a presença dos sítios acima descritos, pois o sítio “B1” só se recombina com o “P1” e o mesmo se aplica aos outros sítios. Os plasmídeos utilizados nas clonagens deste trabalho estão inseridos e descritos no anexo A.

A BP Reaction **B LR Reaction**

Figura 8 - Esquema ilustrativo das reações BP e LR. (A) ilustra uma reação BP que resulta no produto *Entry clone* em que o inserto é flanqueado pelos sítios attL1 e attL2 e também no subproduto ccdB flanqueado pelos sítios attR1 e attR2. Em (B) é ilustrada uma reação LR que resulta na sequência de interesse inserida no vetor de expressão flanqueada pelos sítios attB1 e attB2. É também ilustrado o subproduto ccdB flanqueado no plasmídeo pelos sítios attP1 e attP2.

3.1.5.3 Inserção dos sítios *attBs* nos fragmentos a serem clonados no sistema *Gateway*

®

Para que seja possível inserir sequências de interesse no vetor de entrada do sistema *Gateway*® é preciso que elas possuam as sequências necessárias para recombinação com esse vetor. As sequências necessárias são os *attB1* e *attB2* e como os DNA a serem clonados não possuem essas sequências elas são adicionadas de forma artificial através de *PCR*. Para obter sucesso na clonagem do gene e inserção dos *attBs* foi adotada uma estratégia de amplificação em duas reações diferentes as quais foram denominadas PCR1 e PCR2, as amplificações foram feitas dessa forma devido a proporção de pares de bases nos *primers* que não apresentam complementariedade com a sequência alvo. Por tanto, na PCR1 foram utilizados *primers* específicos para a sequência alvo e parte das sequências *AttBs*. Em seguida, para a PCR2 foram utilizados oligonucleotídeos específicos para os sítios de recombinação, denominados BP1 e BP2, os quais complementarizariam os sítios *attB1* e *attB2*.

Figura 9 – Representação esquemática da inserção dos sítios AttBs nas sequências clonadas no sistema Gateway. O retângulo em azul representa a sequência de DNA interesse. Abaixo do primeiro retângulo azul são representados o par de *primers*, em azul a sequência complementar ao DNA de interesse, em rosa e laranja são representados a sequência parcial dos AttBs que são inseridos na primeira reação à sequência de DNA de interesse na PCR1. Na PCR2, o resultado da PCR1, retângulo azul com as extremidades rosa e laranja, é utilizado como molde da reação. Logo abaixo em uma extremidade o retângulo nas cores, laranja e vermelho, representam a parte complementar e restante da sequência attB1 respectivamente. Na outra extremidade, o retângulo nas cores rosa e amarelo representam a parte complementar e restante da sequência attB2. Abaixo a seta indica a sequência amplificada e agora possuindo as sequências attB1 e attB2 completas.

3.1.5.4 Digestão com enzimas de restrição

Todas as construções foram checadas através de digestão com endonucleases de restrição seguida de eletroforese em gel de agarose, após a transformação de *E. coli* cepa DH10B e replicação em meio seletivo. As digestões foram planejadas utilizando a ferramenta NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, New England BioLabs) e software ApE (v2.0.53) a qual indica sítios de restrição de diversas enzimas para a sequência de interesse. Para cada reação foram escolhidas enzimas com sítios de restrição na sequência de interesse e na sequência do vetor, para confirmar a inserção. Caso a sequência de interesse não estivesse sequenciada, foram escolhidas enzimas que excisavam o fragmento inserido, para extrapolar a inserção através da comparação do tamanho do fragmento resultante com o tamanho esperado do inserto. As digestões foram feitas de acordo com as instruções do fabricante das enzimas utilizadas. O produto da reação foi analisado logo em seguida ou armazenado a -20°C

3.1.5.5 Análises dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses foram realizadas em duas situações: para checagem dos fragmentos de DNA digeridos por endonucleases de restrição e para checagem do tamanho dos produtos obtidos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que posteriormente foram excisadas do gel para purificação. Em ambos os casos, as análises foram feitas através de eletroforese em gel de agarose 1 % (w/v) em tampão TBE 0,5X [Tris-base 50 mM; ácido bórico 50 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0]. A mistura [TBE 0,5X; agarose 1%] foi aquecida em forno micro-ondas para a fundição da agarose e ligeiramente resfriada e acrescida de brometo de etídeo (concentração final de 1 ng/ml) ou *Invitrogen™ SYBR™ Safe DNA Gel Stain*. Após a adição desse intercalante de DNA, a mistura foi colocada em um molde para a formação de poços. Depois de solidificado, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5X em q.s.p. recobrir todo o gel. Às amostras adicionado tampão de carregamento [azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol 0,25 %; Ficoll] 6X o suficiente para sua concentração final ficar 1X. O marcador utilizado nessas análises foi o *1kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)*. Depois de aplicadas as amostras, o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V durante 90-120 min. Após a eletroforese, o gel foi retirado da cuba e transferido ao sistema *Kodak Gel Logic 100 Imaging System* (Kodak), que possui um sistema de emissão de luz UV acoplado a uma câmera, ligado a um computador. As imagens foram capturadas através do *software* que acompanha o sistema, e as condições de exposição e iluminação dependeram da quantidade de DNA aplicada no gel, sendo otimizadas para melhor visualização

3.2 EXPERIMENTOS

3.2.1 Clonagem do gene *NtWUSCHEL*

3.2.2 Análise de sequência

O gene *WUSCHEL* ainda não foi caracterizado em *N. tabacum* e por isso não há bibliografias que puderam ser tomadas como referências para estudos com este gene na espécie. Para dar início a clonagem foi feita uma busca no NCBI por anotações desse gene em *N. tabacum* e foi identificada uma sequência predita para proteína WUSCHEL-like, referente ao acesso XM_016637596.1 no NCBI, sequência esta, obtida a partir de dados de *RNAseq*. A putativa proteína WUSCHEL de *N. tabacum* referente ao acesso XP_016493082.1 foi alinhada

com o auxílio do *software* BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*) com as já caracterizadas, proteínas WUSCHEL de *A. thaliana* e *Solanum lycopersicum* sob número de acesso NP_565429.1 e NP_001234015.2, respectivamente, no NCBI com o objetivo de encontrar identidade e similaridade entre as proteínas. O alinhamento com a proteína WUSCHEL de *A. thaliana* revelou idade de 42% e similaridade de 54% entre as duas proteínas. Quando o alinhamento foi feito com a proteína WUSCHEL de *Solanum lycopersicum* as sequências apresentaram 70% de identidade e 77% de similaridade.

3.2.1.3 Amplificação da CDS (Sequência codificadora) de *NtWUSCHEL* e inserção em vetor de interesse

Para a clonagem do gene *NtWUSCHEL*, inicialmente o RNA de ápices meristemático o qual continha meristemas florais, local onde é descrita a expressão deste gene em outras espécies, foi extraído pelo método TRIzol, item 3.1.4.6. Desse material extraído, 5µg de RNA foi utilizado para produção de cDNA, como já descrito no item 3.1.4.7.

Para a clonagem do gene as reações de PCR foram feitas com a enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Para a PCR1, o cDNA molde (2µl) foi acrescido com 10 picomols/µl do *primer forward*, 10 picomols/µl do *primer reverse*, 10 µl 10 mM de dNTPs (*Deoxyribonucleotide 5'-triphosphate*), 0,5 µl da enzima *Phusion* (2U/µl), 10 µl de tampão (*Buffer HF 5X*) e dH₂O estéril em q.s.p. 50 µl. A desnaturação inicial foi feita a 98°C por 30 segundos. Seguido de 35 ciclos de amplificação composto por: 1) 98°C por 10 segundos; 2) 50 °C por 30 segundos (temperatura de anelamento); 3) 72°C por 90 segundos. A extensão final ocorreu em 72°C por 10 minutos. O fragmento esperado foi checado por eletroforese em gel de agarose. Confirmada a presença, o fragmento foi excisado do gel e purificado utilizando *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo- Scientific) seguindo as especificações do fabricante. Do DNA purificado, 2µl foi utilizado para a segunda reação de PCR (PCR2) a qual foi realizada nos mesmos moldes da PCR1, mas desta vez foram utilizados os *primers* BP-1 e BP-2 para completar os sítios AttBs como escrito em 3.1.5.3. O fragmento amplificado foi novamente checado por eletroforese. O fragmento foi excisado e purificado. O DNA purificado foi utilizado para realização da reação de recombinação BP que consiste em uma recombinação entre os sítios attB1 e attB2 presente no fragmento de interesse a ser clonado com os sítios attP1 e attP2 presentes no vetor de entrada do sistema Gateway® (*Gateway® Technology, Life Technologies*), item 3.1.5.2. A reação BP foi feita em um volume de 5µl

composta por 50,7ng de DNA do fragmento de *NtWUS* purificado, 1µl BP *clonase II* (*Invitrogen*), 1µl (150ng) pDONR221 (vetor de entrada). A reação foi incubada *overnight* em temperatura ambiente. A seguir foi adicionado 1µl de proteinase K e a reação foi incubada a 37°C, por 10 minutos para que as enzimas da reação fossem degradadas e assim parasse a recombinação.

A reação foi transformada em células de *E. coli DH10B* eletrocompetentes e a transformação plaqueada como descrito em 3.1.3.2. Da placa, seis colônias foram escolhidas e inoculadas e posteriormente extraído o DNA plasmidial, itens 3.1.3.4 e 3.1.4.1. Os DNAs obtidos foram digeridos com enzima de restrição, item 3.4.4, para checagem e o DNA de uma colônia foi escolhido e sequenciado para prosseguir com os experimentos.

3.2.2 Construção de sondas para a hibridização *in situ*

Para a realização da Hibridização *in situ* as sondas foram sintetizadas a partir da (CDS) clonadas no vetor *TOPO® TA Cloning® Dual Promoter Kit*. A CDS de *SCII* foi clonada neste vetor por uma ex- aluna do laboratório a partir da construção Gt-GFP[Ct11-ss]pDONR201 e a CDS de *NAGI* foi clonada a partir do clone *NtAG*-pDONR221 por Lubini (2016). A CDS do gene *NtWUS* foi amplificada utilizando como molde o DNA *WUScs*-pDONR221. A sequência amplificada foi inserida no vetor *TOPO® TA Cloning® Dual Promoter Kit* através de uma reação de ligação, item 2.4.1, esse vetor possui dois promotores o que permite a transcrição *in vitro* utilizando um dos promotores a depender da orientação em que a sequência se inseriu no vetor. As ligações foram transformadas em células de *E. coli* cepa *DH10B* eletrocompetentes, plaqueadas e confirmadas como previamente descrito nos itens 3.1.3.2, 3.1.4.1, 3.1.5.5. Após confirmadas as clonagens e as orientações das inserções os estoques em glicerol de interesse foram estriados para a obtenção de colônias isoladas. Uma colônia de cada construção foi novamente inoculada em 5ml de LB para um crescimento prévio, destes foram coletados 700µl de cada foram adicionados em três *Erlenmeyers* diferentes contendo 50ml de meio LB com antibiótico de seleção específico. Os inóculos cresceram por 16 horas e então foi realizada a mid preparação do DNA plasmidial com o objetivo de obter DNA em maior quantidade para preparação das sondas de RNA, item 3.1.4.6. A síntese da sonda foi realizada utilizando *SP6/T7 Transcription Kit from Roche Life Science* seguindo especificações do fabricante. Esse sistema faz com que a cadeia de nucleotídeos sintetizadas apresente todas as bases uracila ligadas à molécula digoxigenina, esta é identificada por um anticorpo ligado a enzima peroxidase que

degrada o substrato BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium) e dá as lâminas hibridizadas uma coloração roxa.

3.2.3 Hibridização *in situ*

Todas as reações foram feitas cuidadosamente livres de RNase.

3.2.3.1 Fixação

Ápices de meristema de inflorescência da planta SR1 foram coletados na casa de vegetação e levados ao laboratório, onde foram processados. O material foi fixado em uma solução de paraformaldeído 4%(w/v) e DMSO 4% (v/v) preparada em PBS 1X. Para isso o material foi mantido em um frasco com a solução de fixação e foram aplicados vácuos de 15 minutos, as sessões de vácuo foram repetidas até o tecido afundar. A solução de fixação foi trocada e o material mantido sob agitação a 4°C *overnight*.

3.2.3.2 Desidratação

A desidratação e embebição dos tecidos foram feitas em um período de seis dias:

Dia 1

Todos os passos foram executados a 4°C e sob agitação.

Lavagem em PBS 1X por 30 min; Lavagem em PBS 1X por 30 min; Etanol (EtOH) 30% 60 min; EtOH 40% 60 min; EtOH 50% 60 min; EtOH 60% 60 min; EtOH 70% 60 min; EtOH 85% 60 min; EtOH 95% *overnight*.

Dia 2

Neste dia os passos foram executados sob agitação em temperatura ambiente.

EtOH 100% 30 min; EtOH 100% 30 min; EtOH 100% 30 min; EtOH 100% 30 min; Xilol 25%: EtOH 75% 30 min; Xilol 50%:EtOH 50% 30 min; Xilol 75%: EtOH 25% 30 min; Xilol 100% 60 min; Xilol 100% 60 min. Após o processo de desidratação os ápices foram dissecados em estereomicroscópio (Leica MSV266) com o auxílio de pinças e agulhas para

deixar o material livre de folhas e botões florais em estádios avançados de desenvolvimento. Após a dissecação deu-se início ao processo de embebição dos materiais.

3.2.3.3 Embebição

Para a embebição, ao invés de parafina, foi utilizado o reagente paraplast. No dia 2 após a dissecação, o material foi mantido *overnight* em Xilol 100% + 1/4 volume de pastilhas de paraplast.

Dia 3

O frasco com o tecido e a mistura de Xilol 100% + 1/4 volume de pastilhas de paraplast. foi mantido a 42°C até a mistura estar totalmente derretida e foi adicionado 1/4 de pastilhas de paraplast e aguardou-se o total derretimento. Após derretida mistura, o frasco foi mantido a 60°C por várias horas. Após esse tempo a mistura foi substituída por uma mistura igual, porém fresca e o material foi mantido *overnight* a 60°C.

Dia 4

Foram realizadas duas trocas da mistura de embebição com intervalos de 6h entre cada uma e o material foi mantido *overnight* na mistura da segunda troca. Esse processo foi repetido nos dias 5 e 6.

Dia 7

Os tecidos foram posicionados em moldes preenchidos com paraplast derretido e armazenados a 4°C para posterior corte em micrótomo. Após o emblocamento os tecidos foram cortados em secções de 10µm e armazenados a 4°C para posterior adesão às lâminas

3.2.4 Pré-hibridização

3.2.4.1 Desparafinização

As lâminas foram deparafinizadas em dois banhos de Xilol 100% por 10 min cada, um banho de xilol:etanol na proporção de 1:1 por 7 min e um banho de etanol 100% por 5 min. Após os banhos as lâminas foram secas em temperatura ambiente, em seguida tratadas com 500µl proteínas K (1µg/ml em Tris-HCl 0,05M pH 7,5), cobertas com lamínula de parafilme e

mantidas a 37°C por 20min. Depois desse período as lâminas passaram por dois banhos de 10 minutos cada em água DEPC para remoção da proteinase K.

3.2.5 Hibridização

As laminas foram hibridizadas em solução contendo: 1,8 µl de sonda marcada com DIG = 300-600 ng/ml da sonda = 6 µl sonda/ml; 6,6 µl Tris-HCL 1M pH 7,5-8 (Ambion); 36 µl NaCl 5M; 150µl formamida deionizada; 6µl EDTA 0,5M; 7,2 µl denharts; 20 µl de dextran Sulfato (solução estoque 50%), dando um volume de 324,2µl que foi pipetado sobre cada lâmina, estas foram cobertas com parafilme e mantidas *overnight* a 42°C

3.2.6 Pós-hibridização

Após a hibridização as lâminas passaram por quatro banhos sucessivos em SSC nos seguintes tempos e concentrações: 4x SSC por 30 min. a 42°C; 4x SSC por 30 min. a 42°C; 2x SSC por 30 min. a 42°C; 2x SSC por 30 min. a 42°C. A partir desse passo, os reagentes e soluções não foram mantidos livre e RNAses e também não foram utilizadas luvas.

3.2.7 Imuno-deteccção

Antes da detecção com anticorpo as lâminas foram mantidas em solução DB1 por 5 minutos e após esse tempo deu-se início a fase de bloqueio que durou 2h, a solução de bloqueio, DB2, é composta por 30g de Agent Block (Roche®) +DB1 q.s.p 300ml. Depois de bloqueadas, às lâminas foram adicionadas 300µl de anticorpo Anti-Dig:AP (Roche®) 1:1000, cobertas com parafilme e mantidas em câmara úmida por 1h a 37°C. Após esse período as lâminas passaram por dois banhos de 15min em DB1 e um banho de 5min em DB3. Para detecção, em cada lâmina foram adicionados 300µl de BCIP/NBT e cobertas com lamínulas de vidro e mantidas no escuro. No intervalo de 1h as lâminas passaram ser acompanhadas. As lâminas foram fotografadas em CARL ZEISS (Axiolab) equipado com câmera (Zeiss - Axiocam Color).

3.2.8 Microscopia de campo claro

As amostras foram fixadas como descrito na seção anterior. Em seguida, flores em diferentes estádios de desenvolvimento foram lavadas em tampão PBS 1x, desidratadas em

série etfílica crescente e incluídas em resina acrílica a base de hidroxietilmetacrilato (Historesin Embedding Kit, Leica). Seções longitudinais ao eixo floral, com espessura de 2 a 3 μm , foram obtidas em micrótomo de rotação Leica[®] RM2265, com auxílio de navalha descartável de aço, de perfil alto (LEICA 818), posteriormente estendidas em água destilada, aderidas em lâmina de vidro em placa aquecedora a 60°C e coradas com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,4. As lâminas foram montadas em meio de montagem Entellan (Merck) e as imagens adquiridas em microscópio (Zeiss – AxioLab), equipado com câmera (Zeiss - AxioCam Color).

3.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Flores em diferentes estádios de desenvolvimento, de plantas SR1, foram cuidadosamente dissecadas sob microscópio estereoscópico Wild M7A ou Leica 165 FC e imersas em solução fixadora contendo glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão PBS 1X pH 7,2, submetidas a vácuo (pressão negativa de 760 mmHg) por pelo menos 24 h e estocadas em solução fixadora à 4°C até o momento do uso. As amostras foram desidratadas em série etfílica ascendente (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100%, 30 min cada). Em seguida, as amostras foram secas em equipamento de ponto crítico CPD 030 (BAL-TEC), utilizando CO₂ como meio de equilíbrio entre as fases. Posteriormente, os primórdios florais foram aderidos em suporte de alumínio com auxílio de fita dupla face de carbono, orientadas e recobertas com uma camada de 15 nm de ouro em metalizador SCD 050 (BAL-TEC). As amostras foram analisadas sob tensão de 10 kV e o registro eletromicrográfico foi realizado em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6060.

3.2.10 Mono Híbrido (*Yeast One Hybrid*)

A putativa sequência genômica de *SCII* foi identificada por Strini (2014). Lubini (2016) realizou análises utilizando programas de bioinformática para identificar domínios *cis*-regulatórios nessa sequência e a partir dos resultados, a mesma autora iniciou um *screening* utilizando fragmentos desta sequência como isca e uma biblioteca de estigma/estilete como presas no sistema *Clontech's Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid (Y1H) Library Screening*. Para dar início ao experimento Lubini (2016) amplificou a putativa sequência promotora de *NtSCII* dividindo-a em três fragmentos diferentes. O fragmento 1, denominado frag1, possui 443pb iniciou a amplificação a -73pb *upstream* ao ATG inicial até o nucleotídeo -515. O fragmento 2, denominado frag2 contém 492pb iniciou a amplificação -706 bp e amplificou até

a posição -1197 *upstream* ao ATG inicial. Já o terceiro fragmento, aqui chamado frag3, iniciou a amplificação a -1178 pb parou na posição -1667 *upstream* ao ATG inicial e possui 490pb. Strini (2010) também identificou no terceiro íntrom um putativo sítio *Cis*-regulatório o qual também foi clonado por Lubini (2016). Esse fragmento aqui referido como frag4 foi amplificado da posição 1584 pb até 2070 pb *downstream* ao ATG apresentando um total de 487 pares e bases. Note que os quatro fragmentos apresentam tamanhos em torno de 490pb, isso porque o sistema não aceita sequências maiores que 500pb. Apesar do *screening* ter sido iniciado, este não se encontra finalizado, portanto parte do objetivo desse trabalho foi testar a *Cis* regulação da sequência promotora e terceiro íntrom de *SCII* através do ensaio mono híbrido (*Yeast One- Hybrid- Y1H*), para isso deu-se início aos seguintes passos:

3.2.10.1 Integração do DNA plasmidial em célula de levedura PJ69-4a por recombinação homóloga

O vetor utilizado para a inserção dos fragmentos testados nas células de levedura foi o pAbAi-GW. Este vetor não pode ser propagado de forma episomal nas células de levedura, logo, para fazer os ensaios de Y1H foi necessário a recombinação homóloga do vetor no genoma da levedura. Para isso os vetores portando os fragmentos precisaram ser linearizados, em um processo utilizando a enzima de restrição BstBI que cliva dentro do gene para biossíntese da Uracila e assim o fragmento do gene *URA3* do vetor se recombina com *locus ura3-52* presente no genoma da levedura. *URA3* também é um marcador nutricional que pode ser utilizado para seleção das leveduras recombinantes. Os DNAs-alvo, fragmento do promotor de 1 a 3 e o terceiro íntrom, linearizados foram então transformados em células de levedura *S. cerevisiae* PJ69-4a conforme descrito no item 3.1.3.5 e as transformações foram plaqueadas em meio seletivo, SD-ura e incubadas a 30°C por três dias.

3.2.10.2 Teste de Auto ativação do DNA alvo

Foi utilizada a resistência ao fungicida Aurobasidina A (AbA) conferida pelo gene repórter *AURI-C* para os ensaios de auto ativação do sistema. Primeiramente, 10 colônias de cada transformação foram selecionadas. Essas leveduras foram testadas para resistência ao fungicida AbA a uma concentração entre 0 a 500 ng/ml de meio. Cada uma das 10 colônias escolhidas foi ressuspensas em 500 µl de água e 1 µl foi adicionado em placas contendo SD-Ura + AbA nas seguintes concentrações: 0, 100, 150, 200 e 500 ng/ml e incubadas por um

período de 10 dias a 30°C para verificar o crescimento das colônias. Foram selecionadas as colônias que cresciam muito bem em meio sem fungicida e que apresentavam os índices mais baixos de auto ativação do sistema. Após escolhidas as colônias, foram realizadas as transformações, item 3.2.5, com o vetor pDEST22 recombinado com a sequência do fator de transcrição a ser testado, aqui foram testados os fatores de transcrição NAG1 E WUS que no vetor pDEST22 se encontram fusionados ao domínio de ativação do fator de transcrição GAL4. As transformações realizadas foram: pABAI-GW-frag1+p22-NAG1; pABAI-GW-frag2 + p22-NAG1; pABAI-GW-frag3 + p22-NAG1; pABAI-GW-frag1 + p22-WUS e pABAI-GW-frag4 + p22-WUS. As transformações foram plaqueadas em meio seletivo SD-ura-trp e incubadas a 30°C para crescimento das colônias transformadas.

3.2.10.3 Ensaio de mono híbrido (*Yeast One Hybrid*)

Após os três dias de crescimento, foram escolhidas oito colônias de cada transformação e inoculadas e meio SD-ura-trp. Também foram inoculadas nos devidos meios seletivos as transformações que foram usadas como controles negativos para o ensaio, essas foram quatro colônias portando somente o fator de transcrição NAG1, quatro colônias portando o fator de transcrição NtWUSCHEL e quatro colônias de cada transformação em que a colônia possuía somente o fragmento, ou seja, as colônias não portavam o vetor com domínio de ativação. Esses inóculos foram mantidos sob agitação de 250rpm a 30°C por 24h. Após esse período os inóculos foram diluídos a uma OD_{600nm} 0,2 e esse valor de 0,2 também foi diluído 10X. Assim que preparadas, as diluições, um volume de 2µl foram adicionados em meio sólido SD-ura-trp +150ng/ml e 175ng/ml de Aurobasidina e SD-ura-trp-ade +150ng/ml e 175ng/ml de Aurobasidina. As placas foram então incubadas a 30°C por 5 dias para testar as interações

3.2.11 Clonagem da sequência genômica de *SCII*

A sequência genômica de *SCII* foi clonada a partir do DNA genômico extraído de folha de *N. tabacum* pelo método Edwards et al. (1991), item 3.1.4.4. A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima *KAPA3G Plant PCR Kit (Kapa Biosystems)* esta enzima finaliza a amplificação adicionando a base adenina nas extremidades do fragmento o que permite a ligação do fragmento nos vetores do sistema TOPO TA. Para a reação, 200ng do DNA genômico foram adicionados a 25µl de tampão (2X KAPA Plant PCR Buffer), 10 *picomols*/µl do primer *forward*, 10 *picomols*/µl do primer *reverse*, 0,4µl de taq polimerase, 0,5µl de

enhancer e dH₂O estéril q.s.p 50µl. A desnaturação inicial foi feita a 95°C por 5 minutos. Seguido de 39 ciclos de amplificação composto por: 1) 95°C por 20 segundos; 2) 55 °C por 15 segundos (temperatura de anelamento); 3) 72°C por 5 minutos. A extensão final ocorreu em 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado foi checado por eletroforese em gel de agarose ultrapura. A banda correspondente ao tamanho de 4455pb esperada foi excisada do gel e purificada utilizando *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo- Scientific)*. Do DNA purificado, 47ng foi utilizado para a ligação no *PCR[®]2.1- TOPO-TA[®] cloning Invitrogen*, item 2.4.1. A reação foi mantida a 25°C overnight e então transformada em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes e plaqueadas em meio LB suplementado com o antibiótico de seleção. A placa também foi suplementada com X-gal e IPTG como descrito no item 3.1.5.2. Da placa transformada seis colônias foram inoculadas e após a obtenção do DNA foi feita a confirmação por enzima de restrição, itens 3.1.5.4 e 3.1.5.5 e sequenciamento.

Com a sequência genômica de *SCII* inserida no vetor *TOPO TA cloning*, esse DNA foi utilizado para amplificação e adição dos sítios de recombinação do sistema *Gateway[®]* através de uma reação de PCR. Para a reação foi usado como molde 10 ng de DNA do clone identificado como *SCII*genTOPO9, a este foi adicionado 10µl tampão (*5X KAPA HiFi Buffer*), 10 mM *KAPA dNTP Mix*, 10 picomols/µl do *primer forward*, 10 picomols/µl do *primers reverse*, 1µl, 1 U/µl *KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase* e dH₂O estéril q.s.p 50µl. A amplificação se deu da seguinte forma: a desnaturação inicial foi feita a 95°C por 3 minutos. Seguido de 35 ciclos de amplificação composto por: 1) 98°C por 20 segundos; 2) 50 °C por 30 segundos (temperatura de anelamento); 3) 72°C por 5 minutos. A extensão final ocorreu em 72°C por 10 minutos. O fragmento correspondente ao tamanho esperado foi excisado do gel e purificado com *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo- Scientific)*. O DNA purificado foi utilizado para fazer a reação BP e assim inserir a sequência genômica de *SCII* no vetor pDONR221. Para a reação, em um tubo de 200µl foi adicionado 104ng (1µl) do DNA purificado, 150 ng (1µl) do vetor pDONR221, 1µl da enzima *BP clonase II* e 2µl de dH₂O ultrapura estéril. A reação foi mantida *overnight* em termociclador (T3 Biometra) a 25°C. No dia seguinte a reação foi parada com 1µl de proteinase K. e transformada em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes e plaqueadas em meio com antibiótico de seleção. Das colônias transformadas, foram feitos 24 inóculos e obtido o DNA plasmidial. Posteriormente foram checadas com enzimas de restrição, item 3.1.5.4. Das colônias confirmadas apenas uma foi escolhida para dar seguimento aos experimentos. O DNA da colônia foi purificado pelo método fenol/clorofórmio, item 3.1.4.5, e posteriormente sequenciado. O DNA purificado foi utilizado para ser recombinado no vetor de expressão

pK7FWG,0 através de uma reação LR. A reação foi feita nos seguintes parâmetros: 506ng (2µl) da construção *SCI1*_{genpDONR221}, 164ng (1 µl) do vetor pK7FWG,0, 1 µl *LR II Clonase Enzyme Mix*, 1 µl dH₂O estéril. A partir de então seguiu-se os mesmos passos da reação de recombinação descrita nesse item. Todas as colônias se confirmaram e apenas uma foi escolhida para seguir os experimentos. Foi feito o sequenciamento do DNA da colônia escolhida para a checagem do *frame* de leitura e então a construção foi transformada em células de *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes, item 3.1.3.3, e plaqueadas em meio LB mais antibiótico de seleção nas concentrações adequadas para essas células. Foram escolhidas 10 colônias que foram inoculadas e mantidas sob agitação constantes de 250rpm por 24h. Após, foi obtido o DNA plasmidial e a confirmação foi feita por uma reação de PCR da seguinte forma: 25µl de tampão (2X KAPA Plant PCR Buffer), 10 *picomols*/µl do primer *forward*, 10 *picomols*/µl do primer *reverse*, 0,4µl de taq polimerase, 0,5µl de enhancer e dH₂O estéril q.s.p 50µl. A desnaturação inicial foi feita a 95°C por 5 minutos. Seguido de 35 ciclos de amplificação composto por: 1) 95°C por 20 segundos; 2) 50 °C por 15 segundos (temperatura de anelamento); 3) 72°C por 2 minutos. A extensão final ocorreu em 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado foi checado por eletroforese em gel de agarose e a colônia escolhida foi estriada para dar seguimentos aos experimentos.

3.2.12 Obtenção de plantas transgênicas *SCI1*_{prom::SCI1-GFP}

Para a transformação dos discos foliares, previamente, uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* portando a construção *SCI1*_{prom::SCI1-GFP} foi inoculada em meio seletivo. A transformação dos discos foliares foi realizada como descrito no item 3.1.2. Após o período de incubação para a transformação, os discos foliares foram transferidos para placas contendo meio MS suplementado com 200mg/ml de canamicina para seleção dos transformantes (a partir de desse momento, a seleção com antibiótico foi feita em todos os passos *in vitro* para obtenção das plantas). A placa também foi suplementada com fito reguladores envolvidos na proliferação e diferenciação celular, estes nas seguintes concentrações, 0,1mg/ml de ácido naftaleno acético (NAA), 1,0mg/ml de benzilaminopurina (BAP) e 500mg/ml de cefotaxina para eliminar as células de *A. tumefaciens* remanescentes nos discos foliares. Aqui, desenvolveram-se calos (massas de células indiferenciadas) nas bordas dos discos foliares transformados, os quais foram excisados com o auxílio de um bisturi e transferidos para outra placa nas mesmas condições. Após duas semanas, quando os calos já apresentavam um tamanho ideal para

indução da parte aérea da planta, eles foram transferidos para placas suplementadas com 1,0mg/ml de benzilaminopurina (BAP), também 500mg/ml de cefotaxina. Neste passo os calos regeneraram plantas que posteriormente foram transferidas para potes com meio MS suplementado com 200mg/ml de canamicina, nesse passo obteve-se plantas enraizadas. Toda a fase de cultivo *in vitro* foi feita em incubadora (Mod. 347 CDG) nas condições de 26°C e 16h luz e 8h escuro. As plantas enraizadas foram transferidas para substrato Bioplant® e mantidas em Fitotrom (Weiss KallenKamp) nas condições de 30 °C e fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro para aclimatação. Nesse período as plantas foram irrigadas diariamente até serem transferidas para vasos maiores com o mesmo substrato e levadas a casa de vegetação, onde alcançaram a fase reprodutiva e foram enfim analisadas. Abaixo segue as imagens na Figura 9 dos passos descritos para obtenção de plantas transgênicas.

Figura 10 - Passos na produção das plantas transgênicas. A) Discos foliares de *N. tabacum* L.cv. Petit Havana (SR1) infectados por *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção SCI1gen::SCI1-GFP. B) Calos originados das transformações, em meio seletivo. A placa foi suplementada com canamicina 200µg/ml e fitorreguladores para proliferação e diferenciação celular com o objetivo de aumentar a massa dos calos. C) Placa com meio MS suplementada com 200µg/ml e fitorreguladores de diferenciação celular, nessa fase, o objetivo é o desenvolvimento da parte aérea. D) Planta em meio de indução de raiz suplementado com 200µg/ml. E) Planta transferida para substrato em fase de crescimento mantidas em Fitotron. F). Planta já em fase reprodutiva mantida em casa de vegetação.

As plantas levadas para casa de vegetação foram checadas para confirmar se todas possuíam o transgene. Para isso, foi extraído o DNA pelo método descrito por Edwards et al. (1991), item 3.1.4.4, e a confirmação foi realizada através de reação de PCR. Para testar os

transgênicos decidiu-se amplificar o mesmo fragmento escolhido para confirmar as colônias de *Agrobacterium* portadoras do transgene, portanto a reação foi realizada nos mesmos moldes como descrito no item 3.2,11 para esse mesmo fragmento. As plantas obtidas ao final, analisadas em microscópio confocal e multifóton.

3.2.13 Microscopia confocal

Essa análise foi realizada para observar a fluorescência da proteína GFP no meristema floral e flores jovens das plantas transgênicas obtidas. Para a análise das plantas SCI1gen_GFP, os meristemas de inflorescência foram coletados na casa de vegetação e dissecados em estereomicroscópio (Leica MSV 266) com o auxílio de pinças e agulha. O objetivo foi isolar o meristema floral e flores em estágio jovens do desenvolvimento. O material foi então preparado em lâmina côncava preenchida com uma pequena quantidade de ágar para estabilização da orientação do órgão. A detecção da fluorescência foi realizada microscópio confocal a *laser* “Leica TCS SP5” (Leica Microsystems Heidelberg, (Germany) utilizando o *software* Leica LAS- AF Lite. O *laser* utilizado foi o de Argônio e o comprimento de onda usado para a excitação da GFP foi 488nm e a captação nos comprimentos entre 500 e 590nm.

3.2.14 Análise em Microscópio Multifóton

As análises em microscópio multifóton foram realizadas para observar a fluorescência nas flores em estágio mais avançados do desenvolvimento. As coleta e dissecação foram realizadas como descrita no anteriormente. Aqui devido ao tamanho, as amostras foram estabilizadas em placa preenchida com ágar. Para observação da proteína GFP foi utilizado microscópio Multifóton LSM 7MP, eficiente para excitação em tecidos espessos. A excitação foi feita com *laser* de 800nm e a detecção da fluorescência no espectro entre 500 e 540nm. Tanto neste microscópio quanto no microscópio SP5 foi feita a detecção da fluorescência dos cloroplastos no espectro de 640 a 730nm, dessa forma foi possível captar a autofluorescência do tecido. As imagens obtidas foram processadas utilizando o *software* Fiji is just ImageJ.

3.3 Materiais utilizados

Todas as soluções e meios de cultura foram esterilizados por sistema de autoclave.

Meios de cultura

Meio LB (*Luria- Bertani*)

Para a preparação de 1L de meio LB em água destilada, foram adicionados 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl (cloreto de sódio). Para a preparação do meio sólido, a solução foi suplementada com 1,5% de ágar bacteriológico

Meio MS (Murashig &Skoog 1962)

Para um litro de meio: foram adicionados 4,4g de sais MS, 30g de sacarose, 0,5 g de MES em q.s.p. 1 litro de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4N. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 1,75 g de ágar (DIFCO) para cada 250 ml de meio líquido.

Meio SD (Synthetic Dropout)

Foram adicionados 6,7 g *Yeast Nitrogen Base without aminoacids* (YNB), 20 g de dextrose (D+glucose) e água destilada em q.s.p. 900 ml. Para meio SD sólido, adicionou-se 20 g/l de ágar. A seguir, meio foi autoclavado. Antes de ser utilizado, foram adicionados 10% da solução *dropout* 10X de acordo com a seleção necessária.

Solução Dropout

Para uma solução *dropout* 10X completa, foram adicionados todos os componentes da Tabela 1 abaixo, dissolvidos em 1 litro de água destilada. As soluções *Dropout* seletivas, foram feitas na ausência do componente específico.

Tabela 1- Lista de componentes para solução Dropout completa

Componente	Massa (mg/L)
Isoleucine	300
L-Valine	1500
L-Adenine hemisulfate salt	200
L-Arginine HCl	200
L-Histidine HCl Monohydrate	200
L-Leucine	1000
L-Lysine HCl	300
L-Methionine	200
L-Phenylalanine	500
L-Threonine	2000
L-Tryptophan	200
L-Tyrosine	300
L-Uracil	300

SSC Buffer (20x)

175,3 g NaCl

88,2 g Citrato de Sódio

800 ml água deionizada

Ajustar para pH 7 com HCl ou NaOH

qsp 1 L água deionizada

DB1 (detection buffer 1)

100 ml Tris-HCl 1M pH 8

30 ml NaCl 5M

800 ml água deionizada

Ajustar para pH para 7,5 com HCl

qsp 1 L água deionizada

DB2 (detection buffer 2)

3 g Blocking agent (Roche)

qsp 300 ml DB1

Dissolver em banho-maria

DB3 (*detection buffer 3*)

100 ml Tris-HCl 1M pH 7,5

20 ml NaCl 5M

50 ml MgCl₂ 1M

Ajustar para pH para 9,5 com NaOH

qsp 1 L água deionizada

MgCl₂ 1M

10,17 g MgCl₂

qsp 50 ml água deionizada

Tris-HCl 1M pH 7,5

0,28 g Tris base

150 ml água deionizada

~15 ml HCl fumegante

qsp 250 ml água deionizada

Tris-HCl 1M pH 8

60,55 g Tris base

400 ml água deionizada

~21 ml HCl fumegante

-qsp 500 ml água deionizada

Dextran Sulfato 50%

2,5 g dextran sulfato

qsp 5 ml água DEPC

dissolver no ultra-som e armazenar a -20

Solução de Azul de Toluidina pH7

0,5g de Azul de Toluidina

100 ml de água destilada (ajustar o pH com HCl)

Tabela 2- Lista de primers utilizados neste trabalho, para a amplificação e/ou sequenciamento dos clones. (1 e 2) primers utilizados para amplificação da sequência de *SCII*, a partir do DNA genômico. (3 e 4) primers utilizados para amplificação e inserção das sequências AttBs 1 e 2 completas na sequência genômica de *SCII*, a partir do vetor TOPO TA *cloning*. (5 e 6) primers utilizados para sequenciamento e checagem da fase de leitura da sequência genômica de *SCII* no vetor pK7FWG. (7 e 8) primers utilizados para completar a inserção das sequências AttBs nas sequências amplificadas. (9) primer utilizado na produção de cDNA, seletivo para RNAs mensageiros. (10) primer utilizado para sequenciamento do fragmento de DNA clonado no vetor TOPO TA *cloning*. (11 e 12) primers utilizados para amplificação e inserção de parte das sequências AttBs na CDS do gene *WUS*. (13 e 14) primers utilizados para o sequenciamento de inserto no pDONR221. (10, 14, 15,16, 17,18, 19, 20, 21, 22, 23) primers utilizados para sequenciar a sequência genômica de *SCII* no vetor TOPO TA *cloning*.

Num	Primer	Sequência 5' → 3'
1	promNtomSCI1-Fw	GCCATAAGCTATAAGTTGGTCACCCCCAAC
2	Ct11attB2GFP_Rv	AAGCTGGGTCTCTTTTGTATTTCCAAGCGTG
3	attB1compl-SCI1prom	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCATAA
4	attB2compl-SCI1exon4ss	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTGTAA
5	SCI1promNtominterno-RV	GCACCTGATATGTTTGGTAG
6	GFP-pKGWFS7	GAAGCACTGCACGCCGTAGGTC
7	BP-1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
8	BP-2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
9	Oligo_dTV	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV
10	T7	TTAATACGACTCACTATTAATACGACTCACTATAGGG
11	attB1-NtWUS1-Fw	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGAAGCTGCTCA ACAACAAAAC
12	attB2-NtWUS1-Rv (CS)	AAGCTGGGTCTTAAGGGGAATTAGGAGATCTG
13	M13-Fw	GTAAAACGACGGCCAGT
14	M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC
15	SCI1->2Kb-FW	AGTATTATGCCGCTCAGCAATC
16	SCI1-2KB-F-W2	GTGTGACTCATGGTGACATCT

17	SCI1-2KB-Rv2	TCTGATAGTGTGGACGCCAT
18	promNtomSCI1-Fw	GCCATAAGCTATAAGTTGGTCACCCCCAAC
19	promNtomSCI1-Rv	GACATTTGGATTTATGGGATTTGTGCTTCTCC
20	SCI1p-N.to-Frag1-Fw	GCAGGCTTCGTAGCATACGATGCGGTTTC
21	SCI1p-N.to-Frag1-Rv	AAGCTGGGTCCCTAGTTATGATAGCCGCAGCAC
22	SCI1p-N.to-Frag2-Rv	AAGCTGGGTCCCTCACTGTAAGTACGATG
23	SCI1p-N.to-Frag3-Rv	AAGCTGGGTGATTAGTTTCCTCCAGAAGG

4. RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento do meristema floral e da flor de *N. tabacum*, com foco no pistilo

Uma vez que o primórdio floral é iniciado, a flor será formada a partir de uma transformação gradual, dependente de divisões e expansão celular, que ocorrem de forma coordenada, levando a diferenciação dos verticilos florais, em uma sequência centrípeta (ENDRESS, 2006). Em *Solanaceae*, o desenvolvimento floral foi descrito pela primeira vez em uma espécie do gênero *Datura*, sendo que a autora dedicou sua atenção ao desenvolvimento do estigma e estilete (SATINA, 1944).

KOLTUNOW et al. (1990) analisaram o desenvolvimento floral na espécie *N. tabacum* e o dividiram nos estádios -7 ao 12, com base no tamanho e morfologia do botão floral e seus verticilos, com foco principal nas anteras. No entanto, ainda não foram feitos estudos detalhados sobre o meristema floral desta espécie e, especialmente, sobre a formação do estigma e estilete. Este estudo se faz necessário para que seja possível analisar a ação de SCII no meristema floral e no desenvolvimento do pistilo.

As flores de *N. tabacum* se organizam em inflorescências terminais. O meristema floral se forma a partir do meristema de inflorescência, como uma coleção de células indiferenciadas, que darão origem aos verticilos florais. Em microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar que no meristema floral, começam a surgir os primórdios de sépalas, os quais podem ser distinguidos claramente do domínio meristemático, ao centro (Figura 11A). Este domínio meristemático é organizado em três camadas celulares (L1, L2 e L3), que são facilmente distinguidas em cortes anatômicos (Figuras 12A-12C). Os primórdios de sépalas surgem sequencialmente, em ângulos de divergência de aproximadamente 144 graus no sentido horário (Figura 11A e 13) em relação ao primórdio anterior, em um total de cinco sépalas. Essa dinâmica de iniciação se deve a repulsão que um primórdio exerce sobre o outro (KITAZAWA; FUJIMOTO, 2015). Ao alcançar um determinado tamanho, o primórdio de sépalas apresenta tricomas em sua face abaxial, como pode ser visto na sépala 1 da Figura 11A.

A especificação das sépalas, pétalas e estames marca o estágio -7 da flor de *N. tabacum*, como descrito por KOLTUNOW et al. (1990). Nesse estágio, o cálice (sépalas) já está quase fechado (Figura 12D), os primórdios de pétalas e estames estão bem definidos e o domínio meristemático se restringe à região onde serão formados os carpelos (Figura 11B). Os cinco

primórdios de pétalas aparecem simultaneamente, sendo que as pétalas surgem internamente, posicionadas nos intervalos entre as cinco sépalas (alternas) (Figuras 11B e 11C). Os cinco primórdios de estames também se formam simultaneamente, em posição interna às pétalas, nos intervalos entre estas últimas, e posicionadas na mesma direção das sépalas (opostas) (Figuras 11B e 11C). É interessante notar que, apesar dos primórdios de pétalas e estames aparecerem simultaneamente, as anteras crescem mais rapidamente nos estádios iniciais, enquanto os primórdios de pétalas têm um crescimento mais lento (Figuras 11B, 11C e 12D).

No estágio -6, surgem os dois primórdios de folhas carpelares, os quais apresentam intensa atividade mitótica e crescem um em direção ao outro, para se fundir na porção superior (Figuras 11C-11E). Nesse estágio também é possível observar a invaginação dos carpelos (Figura 11D), que darão origem aos lóculos dos ovários. O estágio -5 é evidenciado pelos carpelos já fundidos (Figura 11F) e o início da formação do estilete. No estágio -2, os dois lóbulos do estigma já estão estabelecidos e cobertos por papilas, inclusive junto à linha de fusão (Figuras 11G e 11H).

Nos estádios -2 e -3, ao longo da linha de fusão dos carpelos é observada uma intensa proliferação celular (Figuras 12D e 12E). Além disso, os tecidos especializados do estigma (zona secretória) e do estilete (tecido transmissor) já estão diferenciados (Figuras 12D e 12E). A intensa proliferação celular, ocorre até estádios posteriores e resulta no dobramento do estigma até alcançar sua forma típica de “guarda-chuva”, que é detectada no estágio 1 (não mostrado).

Figura 11 - Eletromicrografias de varredura em diferentes estádios de desenvolvimento das flores de *N. tabacum*. A- Visão apical do meristema floral, evidenciando o desenvolvimento das sépalas (seta) em arranjo espiralado; os números indicados de 1 a 5 indicam a sequência de surgimento. Barra de escala 100 μ m. B- Visão apical de flor em estágio de desenvolvimento -7 (KOLTUNOW et al., 1990), mostrando primórdios de pétalas (P), anteras (A) e domínio meristemático (DM). Barra de escala 100 μ m. C – E Flores em estágio de desenvolvimento -6, sendo possível observar as folhas carpelares ainda não fusionadas e o estabelecimento dos primórdios dos demais órgãos florais. CNF – Carpelos não fusionados. Barras de escala 50 μ m em C e D e 100 μ m em E. F- detalhe da região estigmática do estágio -5 de desenvolvimento. Barra de escala 50 μ m. G – H região estigmática no estágio -2 de desenvolvimento, mostrando o estigma já estabelecido e coberto por papilas estigmáticas (PE). Notar em H a ocorrência de células papilares na linha de fusão dos carpelos. Barras de escalas 200 μ m em G e 50 μ m em H.

Figura 12 - Microscopia de campo claro, de cortes em historesina, de material corado com azul de toluidina. A-C ápice da inflorescência mostrando os meristemas florais (MF) em estádios iniciais de desenvolvimento. Em C notar as três camadas meristemáticas L1, L2 e L3. Barras de escala 50 μ m. D- Corte longitudinal de flor em estágio de desenvolvimento -7, mostrando os primórdios de sépala (S), Pétala (P), Anteras (A) e o domínio meristemático (DM). Barra de escala 100 μ m. E-F Cortes longitudinais da região estigmática dos estádios -2 e -1 de desenvolvimento, respectivamente. Tecido transmissor do estilete (TTE) e zona secretória do estigma (ZSE). Barras de escala 200 μ m e 100 μ m, respectivamente.

Figura 13 – Representação esquemática da ordem de especificação das sépalas na flor de *N. tabacum*. (DM) domínio meristemático. Números de 1 a 5- ordem em os primórdios de sépalas diferenciam.

4.2 O gene *SCII* inicia sua expressão no meristema floral

Para testar a hipótese de que *SCII* inicia sua expressão no meristema floral, foram feitas hibridizações *in situ*, usando transcritos antisenso de *SCII* como sonda, em cortes histológicos de ápices da inflorescência (Figura 14). Os resultados obtidos demonstram que *SCII* se expressa no meristema floral (Figuras 14A-14C), com sinais muito intensos nos primórdios dos verticilos em formação.

Figura 14 - Hibridização *in situ* da região apical da inflorescência com sonda antisenso de *SCII*. A-B visão geral destacando a marcação positiva nos meristemas florais (MF). C- Detalhe de um meristema floral (MF), marcado positivamente, e flor em estágio -7, com marcação nas pétalas (P) e anteras (A). D- Controle negativo com sonda senso de *SCII*. Barras de escala 200μm.

Na Figura 15, podem ser visualizados detalhes de meristemas florais jovens, em que podem ser identificadas as três camadas meristemáticas, L1, L2 e L3. Quando comparadas com lâminas hibridizadas com a sonda senso – controle (Figura 15D), foi possível observar que nas três camadas há expressão de *SCII*, sem distinção de intensidade de coloração entre elas

(Figuras 14A-14D). Também foi verificado que *SCII* se expressa nos primórdios de sépalas em formação. Esse resultado indica que, no início do desenvolvimento floral, *SCII* pode estar envolvido na regulação do desenvolvimento de todos os órgãos florais.

Figura 15 - Hibridização *in situ*, com sonda antisense de *SCII* em meristemas florais de *N. tabacum*. A-C sonda antisense de *SCII*. D - Controle negativo com sonda senso de *SCII*. Barras de escala 100µm.

Quando analisada a expressão desse gene durante a progressão do desenvolvimento floral (Figura 16), o que se nota é que há uma regulação tanto espacial quanto temporal, pois, à medida que os verticilos se diferenciam, o gene diminui seu nível de expressão, até deixar de ser expresso no órgão diferenciado, exceto no pistilo. Nas Figuras 16A e 16B (estádios -7 e -6, respectivamente), é possível observar que a concentração de transcritos de *SCII* é alta nos primórdios de pétalas e estames, assim como do domínio meristemático central. As sépalas, que já fecham o botão floral no estágio -6, não apresentam mais intensa marcação do mRNA de *SCII*.

No estágio -6 tardio, as anteras já se especificaram e estão pleno em desenvolvimento (Figura 16C). Nestas anteras a marcação é bem intensa, principalmente na parte superior da estrutura, enquanto a intensidade de sinal já está bastante reduzida nas pétalas (Figura 16C). Nesta mesma figura, pode-se observar uma intensa marcação concentrada nas folhas carpelares ainda não fusionadas, principalmente na porção superior do órgão, onde se desenvolverá o estilete. Aqui também uma nova estrutura pode ser identificada, onde se observa a presença do mRNA *SCII*, os lóculos do ovário, região onde residem as últimas células meristemáticas que se desenvolverão nos óvulos (Figura 16C). A expressão de *SCII* nessa região pode indicar sua atuação também na formação das células esporofíticas precursoras dos gametófitos. No estágio -5 (Figura 16D), o mRNA de *SCII* se concentra nos carpelos já fusionados, e pode-se notar a marcação na porção superior desse órgão, região onde ocorrem as divisões celulares que darão origem ao tecido transmissor do estilete. A Figura 16E reafirma a expressão de *SCII* na porção central dos ovários e, também, na parte interna do estilete já em desenvolvimento.

Com esses resultados, foi possível confirmar a hipótese da expressão de *SCII* no meristema floral. Ficou evidenciada a expressão de *SCII* nos primórdios dos órgãos florais

ainda não diferenciados, especialmente quando apresentavam grande proliferação celular. Nos órgãos florais já diferenciados a expressão de *SCII* diminuiu acentuadamente, com exceção do pistilo. Neste último órgão, a proliferação celular permanece na porção superior, que dará origem ao estilete e, posteriormente, ao estigma. Proliferação celular continua ocorrendo também na porção interna do ovário, onde serão originados os óvulos. Em conjunto, estes resultados sugerem que *SCII* é expresso em tecidos florais com intensa atividade de proliferação celular e, portanto, tem uma função mais ampla do que a inicialmente proposta por nosso grupo de pesquisa. O fato de, nas análises iniciais, a expressão de *SCII* ter sido detectada apenas nos estigmas/estiletos pode ser explicada por terem sido estudados apenas órgãos vegetativos e florais já diferenciados (DEPAOLI et al., 2011). Portanto, seria possível redefinir o nome deste gene como *Floral Stem Cell-cycle Inhibitor 1 (fSCII)*.

Figura 16 - Hibridização *in situ*, com sonda antisense de *SCII*, em diferentes estágios de desenvolvimento floral de *N. tabacum*. A- Meristema floral. B- Estádio -7 do desenvolvimento floral. C- Estádio -6 do desenvolvimento floral. D-E - Estádio -5 do desenvolvimento floral. A (antera), S (sépala), DM (domínio meristemático), LO (lóculo do ovário), C (carpelos), OJ (ovário jovem), O (ovário), E (estilete). F- Controle negativo com sonda senso de *SCII*, em flor do estágio -6 do desenvolvimento floral. A-D e F - Barras de escala 100µm. E - Barra de escala 50µm.

4.3 *SCII* co-expressa com o gene *NAG1* (*AGAMOUS* de *N. tabacum*)

Devido à semelhança do padrão de expressão de *SCII*, detectado no meristema floral e ao longo do desenvolvimento da flor, com o gene *NAG1* de *N. tabacum* (KEMPIN; MANDEL; YANOFSKY, 1993), homólogo do gene *AGAMOUS* de *A. thaliana*, decidimos investigar se ocorre a co-expressão desses genes no meristema floral. O gene *AGAMOUS*, que codifica um

fator de transcrição da família MADS-box, foi descrito pela primeira vez em *A. thaliana* (YANOFSKY. *et al*, 1990) e caracterizado como responsável pela especificação do terceiro e quarto verticilo floral (estames e carpelos, respectivamente). O cDNA do gene *NAG1* havia sido clonado anteriormente em nosso laboratório, pelo Dr. Edward J. Strini. Assim, experimentos de hibridização *in situ* foram realizados para investigar a co-expressão de *SCII* e *NAG1*.

Os resultados obtidos na hibridização *in situ*, com a sonda antisenso de *NAG1*, mostraram a presença do mRNA deste gene no meristema floral (Figuras 17A-17C), confirmando os resultados já descritos para este gene na literatura tanto em *A. thaliana*, quanto em *N. tabacum* (KEMPIN; MANDEL; YANOFSKY, 1993).

Figura 17- Hibridização *in situ*, com sonda antisenso de *NAG1*, em meristemas florais com marcação positiva. D – Controle negativo com sonda senso de *SCII*. A- Barra de escala 100µm. B-D- Barras de escala 200µm.

Na Figura 18B, nota-se que não há a expressão de *NAG1* nas sépalas e, nas pétalas, é detectado um sinal muito fraco, provavelmente por “background” da técnica, uma vez que a expressão de *AGAMOUS* não é descrita nesse órgão. Na mesma Figura (18B), é notável a expressão nos primórdios de anteras e no domínio meristemático central, onde serão formadas as folhas carpelares. A Figura 18C traz uma flor já em estágio mais avançado do desenvolvimento (equivalente à Figura 16D), onde já ocorreu a fusão das folhas carpelares e os lóculos dos ovários já são vistos claramente. Aqui, pode-se observar a expressão de *NAG1* nos ovários e na região que dará origem ao estilete, nas fases subsequentes do desenvolvimento floral. O mesmo padrão é observado nas análises da expressão de *SCII* (Figuras 16D-16E). A comparação dos resultados obtidos na hibridização *in situ* com as sondas de *SCII* e *NAG1*, em cortes histológicos equivalentes, confirmaram a hipótese da co-expressão destes dois genes. Ficou bem evidente que a expressão de *SCII* e *NAG1* ocorrem nas mesmas células do meristema floral e nos mesmos tecidos dos órgãos florais, em fases mais avançadas do desenvolvimento floral. Estes resultados sugerem que o gene *SCII* possa ser um alvo do fator de transcrição *NAG1*, sendo controlado transcricionalmente por este último.

Figura 18 - Hibridização *in situ*, com sonda antisense de *NAG1*, em botões florais. A- Estádio -7 do desenvolvimento floral. B- Estádio -5 do desenvolvimento floral. DM (domínio meristemático), A (antera), PI (pistilo), S (sépala). C- Controle negativo com sonda senso de *SCII*. Barras de escala 100µm.

4.4 O fator de transcrição AGAMOUS (NAG1) interage com o promotor de *SCII*

Com o intuito de estudar as sequências regulatórias do gene *SCII*, no presente trabalho foi amplificada sua sequência genômica (4455pb), incluindo os 4 exons, 3 introns e uma sequência de 1937pb acima do códon ATG, aqui denominada de promotor. Esta sequência genômica foi sequenciada e uma representação esquemática da estrutura gênica pode ser vista na Figura 19A. Análises de bioinformática, realizadas na sequência genômica de *SCII*, identificaram a existência de putativos sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, entre eles AGAMOUS (NAG1) (LUBINI, 2016) e WUSCHEL (WUS) no fragmento 1 do promotor (Figura 19B), NAG1 também nos fragmentos 2 e 3 do promotor (LUBINI, 2016), assim como WUS no intron 3 (fragmento 4) (STRINI, 2010). Para investigar a hipótese da expressão do gene *SCII* ser regulada pelos fatores de transcrição NAG1 e WUS, decidiu-se usar o sistema de mono híbrido em leveduras. A CDS de *NAG1* foi clonada no vetor pDEST22, que permite a expressão da proteína em leveduras, em fusão com o DNA *Activation domain* (AD) do fator de transcrição GAL4. A CDS (*coding sequence*) do putativo gene WUSCHEL de *N. tabacum* (equivalente ao XM_016637596) foi clonada durante o presente trabalho e sequenciada. A sequência de aminoácidos da proteína clonada apresenta 42% de identidade e 54% de similaridade com a proteína de *A. thaliana*, enquanto que com a proteína de *S. lycopersicum* foi encontrada 70% de identidade e 77% de similaridade. Posteriormente, esta CDS também foi clonada no vetor pDEST22. Quatro fragmentos da sequência genômica de *SCII* (Figura 19A) foram inseridos, individualmente, no genoma de uma cepa de levedura

adequada para o ensaio de mono híbrido (ver Material e Métodos), gerando as cepas pABAi-GW-frag1, pABAi-GW-frag2, pABAi-GW-frag3 e pABAi-GW-frag4, respectivamente. Neste ensaio, caso o fator de transcrição sendo expresso, se ligue ao fragmento genômico em questão, ocorrerá a ativação do gene repórter *AURI-C*, conferindo às leveduras a capacidade de crescer em meio com aurobasidina.

Figura 19A - Representação esquemática da sequência genômica de *SCII* e fragmentos utilizados no ensaio de mono híbrido. Na figura são evidenciados a sequência promotora com 1937 pb e o terceiro intron, que possui 724 pb. Na sequência promotora estão marcados pelos retângulos azul, verde e vermelho os fragmentos 1, 2 e 3, respectivamente. O fragmento 1 possui 443 pb; o fragmento 2 possui 492 pb e o fragmento 3 possui 490 pb. No terceiro intron, marcado pelo retângulo marrom, é evidenciado o fragmento 4, que possui 487 pb. Escala de 100 pares de bases.

Figura 19B – Representação esquemática do fragmento 1 de 443pb do promotor de *SCII* utilizado nos ensaios de mono híbrido. Na posição -203 a -212 é representada putativa a sequência de 10 pares de bases para interação do fator de transcrição WUS. Na posição -267 a -285 é representada a sequência putativa de 19 pares de bases para interação do fator de transcrição NAG1.

Cada uma das colônias, contendo os fragmentos 1, 2 e 3 do promotor de *SCII*, foram testadas quanto à interação com NAG1, separadamente. A cepa contendo o fragmento 1 (pABAi-GW-frag1), expressando o fator de transcrição NAG1, foi positiva para a ativação do

gene repórter *AURI-C* (Figura 20A). Esta mesma cepa, com NAG1, foi capaz de ativar o gene repórter *ADE2*, sendo, portanto, capaz de crescer em meio sem adenina e com aurobasidina (Figura 20B). As células portando somente o fragmento 1 do promotor (pABAi-GW-frag1) não foram capazes de crescer nos meios seletivos, demonstrando a incapacidade de ativar o sistema (controle de auto-ativação). A cepa contendo o fragmento 2 (pABAi-GW-frag2), expressando o fator de transcrição NAG1, foi negativa para a ativação dos genes repórteres *AURI-C* e *ADE2* (Figuras 20A e 20B). Este resultado demonstra que a ativação de NAG1 ocorre de forma específica no fragmento 1 e não ocorre em qualquer fragmento genômico usado. A interação de NAG1 com o fragmento 3 (pABAi-GW-frag3) também foi negativa (resultados não mostrados).

Figura 20 - Ensaio de mono híbrido (*Yeast One Hybrid*), evidenciando a interação do fator de transcrição NAG1 com o fragmento 1 do promotor de *SCII*. A- As colônias foram capazes de crescer em meio seletivo (SD -ura -trp e suplementado com 150ng/ml de Aurobasidina). B- As colônias foram capazes de crescer em meio seletivo (SD -ura -trp -ade e suplementado com 150ng/ml de Aurobasidina). coluna1: Quatro colônias independentes da cepa pABAi-GW-Frag1, expressando o fator de transcrição NAG1 a partir do vetor pDEST22; coluna 2: Quatro colônias independentes da cepa pABAi-GW-Frag1, sem expressar o fator de transcrição NAG1 (controle de auto-ativação, mostrando que somente o fragmento 1 não ativa o sistema); coluna 3: Quatro colônias independentes da cepa pABAi-GW-Frag2, expressando o fator de transcrição NAG1 a partir do vetor pDEST22. Estas colônias, além de evidenciar que não ocorre interação de NAG1 com o fragmento 2 do promotor, aqui podem ser consideradas como controle negativo, evidenciando que o fator de transcrição NAG1 não é capaz de auto-ativar o sistema por si só.

As cepas contendo o fragmento 1 (pABAi-GW-frag1) e o fragmento 4 (pABAi-GW-frag4) foram testadas quanto à interação com WUS, separadamente. Em relação ao fragmento 2, das oito colônias independentes testadas com WUS, apenas duas colônias foram capazes de

crescer em meio seletivo contendo 150ng/mL de aurobasidina (Figura 21). Este resultado foi considerado inconclusivo e precisará ser repetido no futuro. A cepa contendo o fragmento 4 mostrou resultado de interação negativa com WUS em todas as colônias testadas.

Figura 21 - Ensaio de mono híbrido (*Yeast One Hybrid*), evidenciando a interação do fator de transcrição WUS com o fragmento 1 do promotor de *SCI1*. As colônias foram capazes de crescer em meio seletivo (SD -ura -trp e suplementado com 150ng/ml de Aurobasidina). coluna 1: Duas colônias independentes da cepa pABAi-GW-Frag1, expressando o fator de transcrição WUS a partir do vetor pDEST22; coluna 2: Duas colônias independentes da cepa pABAi-GW-Frag1, sem expressar o fator de transcrição WUS (controle de auto-ativação, mostrando que somente o fragmento 1 não ativa o sistema); coluna 3: Duas colônias independentes da cepa pABAi-GW-Frag2, expressando o fator de transcrição WUS a partir do vetor pDEST22. Estas colônias, além de evidenciar que não ocorre interação de WUS com o fragmento 2 do promotor, aqui podem ser consideradas como controle negativo, evidenciando que o fator de transcrição WUS não é capaz de auto-ativar o sistema por si só.

4.5 A sequência genômica de *SCI1*, em fusão com GFP, é capaz de reproduzir sua expressão endógena

Ainda com o intuito de estudar a expressão endógena do gene *SCI1* e sua regulação, a sequência genômica acima mencionada (~4,5kb), sem o códon de parada de tradução, foi clonada em fusão traducional com a GFP (*Green Fluorescent Protein*), produzindo o gene quimérico *SCI1prom::SCI1-GFP*. Esta construção gênica foi utilizada para produzir plantas transgênicas, tendo sido obtidas 17 plantas transgênicas independentes. Em todas estas plantas foi possível detectar *SCI1-GFP* nos meristemas florais, por microscopia de fluorescência. Análises mais detalhadas, por microscopia confocal e em microscópio multifóton, foram realizadas em algumas das plantas transgênicas, como mostrado abaixo.

SCII inicia sua expressão bem cedo nas células do meristema floral, possivelmente desde quando este meristema é especificado. Nos meristemas florais das plantas transgênicas *SCI1gen_GFP1.1* e *SCI1gen_GFP108.3*, a proteína *SCI1*-GFP é detectada desde as fases bem jovens (Figuras 22A-22C e 22D-22F, respectivamente). O mesmo pode ser observado na Figura 23 que mostra um meristema floral esmagado deixando evidente o domínio meristemático com as células marcadas (Figuras 23A-23C). Na mesma figura também é mostrado um ápice meristemático contendo dois meristemas florais jovens e uma flor em estágio inicial do desenvolvimento e aqui fica claro a expressão de *SCII* a partir do meristema floral e não em outros tecidos anterior a fase de meristema floral presentes no ápice (Figura 23D-23F)

Nestas análises também fica claro que, pelo menos nos estádios iniciais do desenvolvimento floral, *SCII* é expresso em outros verticilos florais além do estigma/estilete, como pode ser visto nos primórdios de sépalas da planta transgênica *SCI1gen_GFP81.1* (Figuras 22G-I). em que é mostrada uma flor jovem com as sépalas já diferenciadas e pode ser vista a fluorescência da GFP nesse órgão como também sua permanência no domínio meristemático indicando que a expressão de *SCII* segue até que as células na flor percam a característica meristemática.

Figura 22 – Imagens de microscópio multifóton de meristemas florais de *N. tabacum*. A-C meristema floral jovem do transgênico SCI1genGFP1.1 a seta evidencia o domínio meristemático. D-F Meristema floral do transgênico SCI1genGFP108.3, seta evidenciando o domínio meristemático e a bráctea. G-I flor em estágio inicial do desenvolvimento no transgênico SCI1genGFP81.1 evidenciando as sépalas já totalmente diferenciadas e o domínio meristemático no centro. (DM) domínio meristemático; (B) bráctea; (S) sépala. Barra de escala 66µm.

Figura 23 - Microscopia confocal de meristemas florais da planta *SCI1gen_GFP17.1*. A-C Meristema floral esmagado. (DM) domínio meristemático evidenciado pela proteína *SCI1*-GFP (seta), (B) bráctea. Barras de escala 100µm. D-F Ápice meristemático contendo três meristemas florais (DMs assinalados). Flor em estágio inicial do desenvolvimento, observar as anteras (A). Barras de escala 50µm.

Em flores nos estádios -3, é possível observar a expressão de *SCI1* em pétalas, anteras e pistilo, como é mostrado nas plantas transgênicas *SCI1gen_GFP81.1* e *SCI1gen_GFP108.3* (Figuras 24A-24B). Em flores de estágio -2, também é possível detectar *SCI1*-GFP nos diferentes verticilos florais (pétalas, anteras e pistilo), como mostrado para a planta transgênica *SCI1gen_GFP1.1* (Figura 24C). É importante ressaltar que, assim como verificado para os transcritos na hibridização *in situ*, a proteína *SCI1*-GFP se expressa no meristema floral e em todos os primórdios de verticilos florais. Conforme o desenvolvimento avança, *SCI1* diminui sua expressão nos verticilos já formados (Figura16), sendo que esta expressão permanece apenas no pistilo em estádios mais tardios.

Figura 24- Microscopia multifóton de estádios iniciais do desenvolvimento floral de três plantas transgênicas de *N. tabacum*. A- Flor da planta transgênica SCI1gen_GFP81.1, no estágio -3 do desenvolvimento floral. Barra de escala 300µm. B- Flor da planta transgênica SCI1gen_GFP108.3, no estágio -3 do desenvolvimento floral. Barra de escala 400µm. C- Flor da planta transgênica SCI1gen_GFP1.1, no estágio -2 do desenvolvimento floral. Barra de escala 200µm. Os três verticilos florais, evidenciados pelas setas, estão expressando a proteína SCI1-GFP. (A) antera; (PI) pistilo; (P) pétala

A proteína SCI1-GFP é detectada no tecido transmissor do estilete e na zona secretória do estigma, mas também no tecido parenquimático (Figura 25A-C). Adicionalmente, SCI1-GFP é claramente detectada em óvulos (Figura 25D-F).

Figura 25- Microscopia confocal de estigma/estilete e óvulos de plantas transgênicas de *N. tabacum*, expressando *SCI1*prom::SCI1-GFP no estágio 4. A-C seção longitudinal basolateral da porção superior dos carpelos da planta transgênica SCI1gen_GFP108.3, mostrando a marcação pela proteína SCI1-GFP no tecido parenquimático, tecido transmissor do estilete e zona secretória do estigma (setas). (PA) parênquima, (TTE) tecido transmissor do estilete, (ZSE) zona secretória do estigma. Barra de escala 50µm. D-F Visão dos óvulos (seta) marcados com a proteína SCI1-GFP, da planta transgênica SCI1gen_GFP5.1. Barra de escala 50 µm.

Para verificar se o gene *SCI1* se expressa de forma mais ampla nos meristemas das plantas, e não apenas nos meristemas florais, sementes das plantas transgênicas SCI1gen_GFP5.1 e SCI1gen_GFP17.1 foram germinadas em meio seletivo e as plântulas transgênicas foram analisadas para verificar se a proteína SCI1-GFP estaria sendo produzida. Em nenhuma das plântulas transgênicas analisadas foi detectada a proteína SCI1-GFP nos meristemas apical do caule e da raiz. Também foram analisadas amostras de folhas, caule, meristema apical do caule e meristema apical da raiz de plantas transgênicas adultas

(SCI1gen_GFP5.1 e SCI1gen_GFP3). Com exceção de algumas poucas células esparsas nas folhas (em divisão?), não foi detectada a proteínas SCI1-GFP nas amostras analisadas.

4.6 A localização subcelular de SCI1 foi confirmada em núcleo e nucléolo

As plantas transgênicas *SCI1_{prom}::SCI1-GFP* permitiram uma reanálise da localização subcelular da proteína SCI1. Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que a proteína SCI1 se localiza em núcleo e nucléolo (DEPAOLI et al., 2011; STRINI, 2014). Entretanto, estes trabalhos haviam analisado a proteína SCI1-GFP expressa sob controle do promotor constitutivo CaMV35S. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmaram a localização subcelular da proteína SCI1-GFP, em núcleo e nucléolo (Figura 26), sendo a proteína expressa sob controle das sequências regulatórias endógenas de SCI1. Estes resultados eliminam qualquer controvérsia que tenha surgido sobre a localização natural da proteína SCI1 endógena.

Figura 26- Microscopia confocal de tecido floral de planta transgênica SCI1gen_GFP planta 108.3. Imagens de microscopia evidenciando núcleo e nucléolo marcados pela proteína SCI1-GFP. A- GFP; B- cloroplastos; C- merge. Barra de escala 10μm.

5. DISCUSSÃO

SCII, um importante fator no controle da proliferação celular das células meristemáticas florais

O gene *SCII* foi inicialmente descrito como específico de estigma/estilete e, assim, descrita sua ação na regulação do desenvolvimento desses órgãos. Caracterizado como um inibidor de ciclo celular, até o momento foram identificados diversos parceiros com os quais *SCII* interage direta e indiretamente, contribuindo na formulação de hipóteses sobre seu funcionamento (STRINI, 2014; PINOTI, 2016). Os parceiros de interação de *SCII* sugerem que esta proteína atue em vias de processamento de RNA e, também, dá suporte ao seu papel de controle da proliferação celular. O envolvimento de *SCII* em processos tão básicos e amplos levou ao questionamento da especificidade de sua expressão no estigma e estilete. Se a expressão não é específica do estigma e estilete, como explicar os fenótipos identificados e analisados por DEPAOLI et al. (2011) nas plantas de silenciamento e superexpressão? Uma provável explicação, seria o envolvimento de *SCII* no controle do metabolismo de RNA e proliferação celular no meristema floral, sendo estigma e estilete derivados das últimas células meristemáticas.

Dando suporte a essa ideia, os resultados obtidos revelaram que *SCII* inicia sua expressão no meristema floral, como foi verificado na hibridização *in situ* (Figuras 14 e 15) e segue se expressando até estádios mais avançados do desenvolvimento da flor (aqui analisados até os estádios -5 e -4), se restringindo a medida que os verticilos se desenvolvem, exceto no pistilo (Figura 16). Nas plantas transgênicas expressando *SCII*-GFP sob controle do promotor endógeno, esta proteína também inicia sua expressão no meristema floral (Figuras 22 e 23). O desenvolvimento floral das plantas transgênicas foi registrado até o estágio -2 (Figura 24) e acompanhado, porém sem registro fotográfico, até o estágio 2 (maior estágio em que foi possível a visualização em microscópio, devido ao tamanho da flor). Nestes estádios mais tardios (até o estágio 2), a proteína *SCII*-GFP permanece sendo detectada nos três verticilos florais passíveis de visualização no microscópio (pétalas, estames e pistilo), mas o sinal de GFP vai diminuindo de intensidade, nos verticilos mais externos, à medida que a flor se desenvolve. No geral, o padrão de expressão de *SCII**prom::SCII*-GFP foi semelhante ao verificado na hibridização *in situ* nos estádios de desenvolvimento em que ambos foram analisados, porém com uma defasagem de tempo relacionada à redução da quantidade de transcrito e de proteína

nos verticilos externos. Os resultados demonstram que a construção *SCII^{prom::}SCII-GFP* possui os elementos regulatórios necessários para a correta expressão do gene quimérico, ou seja, para ativar a transcrição após a indução do meristema floral e para restringir a expressão ao meristema floral e aos verticilos florais em seus primórdios. Quanto à detecção mais prolongada da proteína SCII-GFP nos verticilos florais externos, uma possível explicação seria relacionada ao controle da meia-vida de SCII nas células em que a proteína é sintetizada, ou seja, ao controle da sua degradação. Adicionalmente, deve-se considerar que a expressão do gene *SCII* não foi analisada por hibridização *in situ* nos estádios mais tardios (estádios entre -4 e 2) no presente trabalho ou no trabalho anterior (DEPAOLI et al., 2011) e que, nos resultados de hibridização *in situ* aqui apresentados, o nível de transcritos diminuiu acentuadamente, mas não desapareceu. Assim, a tradução dos transcritos remanescentes poderia explicar a detecção da proteína SCII-GFP até o estágio 2, aqui analisado nas plantas transgênicas.

A proteína SCII-GFP também foi detectada nas células parenquimáticas do estilete das plantas transgênicas (Figura 25C-C), porém o mRNA de *SCII* não foi detectado nesse tecido (DEPAOLI et al., 2011). É possível que a proteína SCII-GFP, produzida no tecido transmissor do estilete, se movimente através de plasmodesmos, chegando ao tecido parenquimático. Plasmodesmos evoluíram nas plantas como eficientes mecanismos de comunicação/sinalização célula-célula, com canais capazes de se dilatarem para a passagem de proteína e complexos de RNA (ribonucleoproteínas) maiores que 20kDa (LUCAS; LEE, 2004). Esse sistema de comunicação está presente tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva das plantas. Em *A. thaliana*, o gene *SHORT ROOT (SHR)*, que controla o desenvolvimento da camada endodérmica em raiz, foi fusionado a proteína GFP. Foi observado que, embora a expressão desse gene seja confinada a região central da raiz, o produto desse gene também pode ser encontrado nos núcleos das células endodérmicas iniciais (NAKAJIMA et al., 2001). Em *N. tabacum*, OPARKA et al. (1999) analisaram o transporte da proteína GFP em folhas que passaram pela transição dreno-fonte e verificaram que essa proteína podia se mover livremente pelos plasmodesmos. Como demonstrado por ORMENESE et al. (2000), no meristema floral ocorre o incremento de plasmodesmos, fato este compreensível, uma vez que nessa fase do desenvolvimento há uma eficiente comunicação entre as células e camadas do meristema (LUCAS; LEE, 2004). Confirmando essa comunicação, as proteínas LFY, SHOOTMERISTEMLESS (STM), DEFICIENS (DEF), FLORICAULA (FLO), GLOBOSA (GLO) e AGAMOUS (AG) se movem através das camadas do meristema floral e também através dos verticilos, podendo funcionar como sinais de curta distância (CHEN; KIM, 2006).

No caso de *SCI1*, já havia sido observado um efeito no parênquima do estilete, especialmente nas plantas de silenciamento deste gene (DEPAOLI et al., 2011). Neste último trabalho, os autores atribuíram, o aumento de número de camadas no parênquima nas plantas de silenciamento, a uma possível sinalização que o gene *SCI1* estaria exercendo sobre esse tecido. No entanto, os autores não fizeram nenhuma alusão a qual sinal estavam se referindo. É possível que a sinalização entre os dois tecidos seja feita pela própria proteína *SCI1*, que é uma proteína pequena, de apenas 154 aminoácidos, passível de ser transportada através dos plasmodesmos. O fato de *SCI1*-GFP, com tamanho total 50kDa e passível de ser transportada pelos plasmodesmos, ter sido detectada no parênquima das plantas transgênicas reforça esta hipótese. Dessa forma, nas plantas transgênicas de silenciamento de *SCI1*, uma menor quantidade de proteína *SCI1* chegaria ao parênquima, resultando na maior proliferação celular neste tecido. Para esclarecer esta questão de transporte da proteína *SCI1* entre estes tecidos, seria interessante usar um método de detecção direta da proteína *SCI1* endógena, como imuno-histoquímica. Caso o deslocamento da proteína *SCI1* entre células seja confirmado, este processo também poderia explicar a detecção da proteína *SCI1*-GFP nos verticilos florais mais externos, nos estádios mais tardios, descrito acima.

Adicionalmente, os resultados de microscopia de varredura do desenvolvimento floral de *N. tabacum*, descritos no presente trabalho, confirmam que o estilete e o estigma são derivados das últimas células meristemáticas presentes na parte superior do pistilo. É interessante observar que estes são os mesmos tecidos que expressam *SCI1*, sugerindo que esta proteína seja um importante fator no controle da proliferação celular das células meristemáticas florais.

Para melhor entender os fenótipos das plantas transgênicas de superexpressão e silenciamento de *SCI1*, é preciso conhecer as origens dos tecidos que resultam no pistilo totalmente desenvolvido. Como demonstrado em *Datura* (SATINA; BLAKESLEE, 1943), o crescimento dos carpelos depende primariamente das células da camada interior (L3) do meristema floral. Porém, em estádios posteriores do desenvolvimento do pistilo, é notada uma evidente diferença, pois as células da camada L3 são responsáveis por manter a população de células meristemáticas e, também, atuam como responsáveis por formar as porções inferiores da parede dos carpelos e septos que se tornam a maior parte do ovário (SATINA, 1944). No entanto, quando se refere ao estigma e estilete, porção superior dos carpelos, o desenvolvimento é proporcionado pelas células da camada L2, que se localizam no topo das paredes dos carpelos. Em estádios posteriores, essas células aumentam rapidamente em número, resultando em um

crescimento ascendente da porção superior dos carpelos. Esse crescimento dá lugar a uma estrutura fina e alongada, o estilete, com dois lóbulos estigmáticos. Após a fase de divisão para a formação da estrutura, dá-se início a elongação que fará com que o pistilo alcance o tamanho observado na flor madura. O estigma de *N. tabacum* corresponde à parte final do estilete e, em sua superfície, é coberto por uma epiderme de células papilares que tem sua origem na camada L1 do meristema floral (CRESTI et al., 1986). O que fica evidente aqui é a origem meristemática de todos os tecidos do pistilo, inclusive o parênquima, tecido que dá sustentação ao tecido transmissor do estilete. Considerando em conjunto os fenótipos observados nas plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão de *SCII* e a origem desses tecidos, é coerente propor que esses fenótipos sejam consequências de processos que ocorreram em momentos bem iniciais da formação do pistilo. Estudos da expressão de *SCII*, associados à expressão de marcadores moleculares de células meristemáticas das diferentes camadas, contribuiriam para compreender a base molecular do desenvolvimento do pistilo e o papel de *SCII* neste processo.

A teoria de Goethe para o desenvolvimento floral: ciclos de contração e expansão

Em 1790 Goethe desenvolveu sua teoria formalista para explicar o desenvolvimento da flor. De forma poética, em sua obra (versão em inglês - GOETHE, 2009) “*Metamorphose der Pflanzen*”, ele descreveu que os quatro verticilos florais, na verdade se tratavam de folhas modificadas. Desde o século passado, o acesso à biologia molecular e bioquímica levou a criação da teoria conhecida como “*evo-devo*” ou “*evodevotics*”, que pressupõe que a regulação de genes relacionados ao desenvolvimento se caracteriza como um aspecto importante nas mudanças morfológicas durante a evolução. O acesso a essas informações tem levado a confirmação da teoria de Goethe para a origem dos verticilos florais (THEISSEN et al., 2000; COEN, 2001; THEISSEN, 2001). Goethe ainda definiu que as flores se tratavam de folhas “contraídas” e então, em sua teoria, ele adicionou o conceito de expansão à contração. Aqui ele exemplifica que a primeira expansão observada é da semente, que se expande para formar a planta, caule e folhas. As folhas, então, passam pelo *round* de contração para dar origem às flores. Para ele, esse “movimento” de contrair e expandir se trata de uma força cíclica que garante o correto desenvolvimento das plantas.

Em uma reinterpretação dessa teoria, feita por Dornelas e Dornelas (2005), se esse conceito for aplicado ao comportamento de determinância do meristema e analisada a

interpretação moderna da ontogênese, a percepção de Goethe estaria correta. Neste caso, os ciclos de contração e expansão se refeririam à necessidade do meristema de multiplicar e se diferenciar, ao mesmo em que mantém uma população de células indiferenciadas, para garantir o correto desenvolvimento de órgãos futuros.

Quando aplicada essa teoria ao desenvolvimento da flor, fica claro que o crescimento e diferenciação no meristema floral deve ser coordenado para garantir a população de células meristemáticas e o desenvolvimento dos verticilos florais. No meristema floral jovem, esse controle representa o primeiro *round* de contração no desenvolvimento floral. Até então, esse controle no meristema floral foi descrito como uma ação do sistema *CLAVATA (CLV)-WUSCHEL (WUS)* determinado por um *feedback* negativo que modula a expressão dos dois genes (CLARK, 2001; THOUET et al., 2012). O segundo *round* de contração é exemplificado pela via do gene da função C, *AGAMOUS* (DORNELAS; DORNELAS, 2005). *AGAMOUS* é responsável pela especificação dos terceiro e quarto verticilos florais, mas também limita a proliferação das células meristemáticas nesses órgãos (BOWMAN; SMYTH; MEYEROWITZ, 1989), sendo que um *pool* de células meristemáticas é mantido, de forma transiente, para a formação de outros órgãos, tais como os óvulos, que ocorre depois da especificação dos carpelos (DORNELAS; DORNELAS, 2005). Com base nos resultados do presente trabalho, é possível propor que, em paralelo ao que acontece no ovário, células meristemáticas da porção superior dos carpelos fundidos sejam responsáveis pela formação do estilete e, finalmente, pelo estigma.

Para esses ciclos de “contração”, até então, estão bem descritos os mecanismos moleculares em nível de controle genético. Porém, quando se trata do controle no ciclo celular, que resulta na limitação da proliferação das células meristemáticas, não há nenhuma alusão da presença de um inibidor específico do ciclo. *SCII*, sendo caracterizado como um inibidor do ciclo celular, poderia estar atuando nesse processo e, quando levado em conta que sua expressão foi detectada em ambos os pontos identificados como ciclo de “contração”, este gene é um forte candidato a atuar sob efeitos dos genes *AGAMOUS* e *WUSCHEL*.

A relação *SCII*, *NAGI* e *WUSCHEL* na manutenção de células no meristema floral

Os resultados da hibridização *in situ* e análises com as plantas transgênicas tornaram possível verificar o momento em que *SCII* inicia sua expressão, a qual se inicia no meristema

floral, sem distinção entre as camadas celulares. *SCII* continua se expressando até estádios um pouco mais avançados do desenvolvimento floral, como esquematizado na Figura 27.

Figura 27 - Representação esquemática da expressão de *SCII*. (A) Expressão de *SCII*, em amarelo, logo após a especificação do meristema floral. Em verde, uma bráctea. (B) Expressão de *SCII*, delimitado em amarelo, em estágio mais avançado do desenvolvimento em que todos os verticilos já se especificaram. Em verde os verticilos onde não é detectada a expressão de *SCII*, na hibridização *in situ*.

Em *A. thaliana*, a especificação do meristema floral é iniciada a partir da ativação dos genes *LFY* e *APETALA1*, conhecidos como genes de identidade do meristema floral. Estes genes atuam como os principais reguladores desse processo, o qual também é controlado pelo fluxo de fitohormônios, como a auxina, e pela polaridade que é necessária para o transporte desse fitohormônio (LIU; THONG; YU, 2009).

O meristema floral é uma estrutura que, diferentemente do meristema de inflorescência, se encontra especificado, com um destino estabelecido, e resulta em um número fixo de verticilos florais. Para o correto desenvolvimento desses verticilos, é necessária uma população de células suficientes para dar início a diferenciação. Assim, o meristema floral é altamente dinâmico e apresenta um programa de divisões que visa fornecer células para a diferenciação dos verticilos e a manutenção da população de células meristemáticas, até a completa especificação de todas as estruturas que compõem a flor (HOLT et al., 2014). O controle do tamanho da população de células meristemáticas já foi descrito em espécies como *A. thaliana* (MAYER et al., 1998; BRAND et al., 2000) e *Lycopersicon esculentum* (REINHARDT et al., 2003) e, com um papel central no controle dessa proliferação e diferenciação, está o gene *WUSCHEL*. No entanto, o *WUSCHEL* em *N. tabacum* ainda não foi caracterizado e, por isso, algumas dificuldades foram encontradas para os experimentos com esse gene. A sequência com número de acesso XM_016619508.1 no GenBank, identificada como *WUSCHEL* nessa espécie, foi clonada para os experimentos de hibridização *in situ* e interação DNA:proteína. Nos

experimentos de interação, duas colônias, de um total de oito analisadas, apresentaram ativação do fragmento 1 do promotor de *SCII*. Adicionalmente, os experimentos de hibridização *in situ*, com a sonda antisenso para a sequência clonada de *WUSCHEL* (XM_016619508.1), não produziram bons resultados (dados não mostrados), sendo considerados inconclusivos.

Considerando que a função de *WUSCHEL* é conservada durante a evolução, é esperado que esse gene se expresse no meristema floral de *N. tabacum*. Levando em conta o que se conhece da literatura, a expressão de *SCII* no meristema floral, como determinado por hibridização *in situ*, e a presença de putativos elementos *cis*-regulatórios para *WUSCHEL* na sequência genômica de *SCII*, é possível propor que o fator de transcrição *WUSCHEL* efetivamente regule a expressão de *SCII*. Desta maneira, aqui é proposto um modelo de expressão desses dois genes no meristema floral de *N. tabacum* (Figura 28).

Figura 28 - Representação esquemática do modelo proposto para a regulação transcricional de *SCII* exercida por *WUSCHEL*. Em azul, *WUS* ativa (seta) *SCII*, em amarelo, no meristema floral jovem.

No modelo proposto, *SCII* é ativado pelo fator de transcrição *WUSCHEL*. *SCII* sendo ativado, ele atuaria como um controlador da proliferação das células meristemáticas. Esse modelo é suportado pelo fato de que nas plantas *SCII*^{RNAi} ocorre um adiantamento nos estádios iniciais do desenvolvimento dos carpelos. Acredita-se que isso ocorra porque o meristema floral das plantas silenciadas atinja o número de células necessárias para a especificação dos carpelos antes das plantas selvagens e das plantas *SCII*^{OE}. Outro dado que suporta isso é o de que em estádios iniciais do desenvolvimento floral, dados do RNAseq das plantas silenciadas revelaram que o gene identificado como *WOX1*, membro da família *WOX* da qual *WUSCHEL* também faz parte, está *down* regulado (dados não publicados de Pedro B. Ferreira). O gene *WOX1* tem sido associado ao crescimento de órgãos laterais, tanto na fase vegetativa, como as folhas, quanto na fase reprodutiva através do controle da proliferação celular (TADEGE et al., 2011; LIN et

al., 2013). Como na planta silenciada há um adiantamento no desenvolvimento da flor é coerente a *down* regulação de *WOX1* já que ele está relacionado com esse processo. A ação de *SCII* nessa fase do desenvolvimento caracterizaria o primeiro ciclo de “contração” do desenvolvimento floral.

Os dados da hibridização *in situ* revelaram a co-expressão dos genes *NAGI* e *SCII* como mostra a Figura 29.

Figura 29 - Representação esquemática da localização dos transcritos de *NAGI* e *SCII* no meristema floral. (A) Localização do transcrito de *SCII*. (B) Localização do transcrito de *NAGI*.

O fator de transcrição *AGAMOUS*, representante do grupo C do modelo ABCDE, responsável pela especificação do terceiro e quarto verticilos da flor, é membro do clado monofilético MADS-Box que inclui *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHP2* e *SEEDSTICK* (*STK*), relacionados com o desenvolvimento de óvulos e sementes (VILLARINO et al., 2016). O mecanismo de ativação de *AGAMOUS* foi descrito em *A. thaliana* e é dependente da ação de *LFY* e *WUS* (LOHMANN et al., 2001). *WUS*, que é requerido para manutenção das células em estado proliferativo não diferenciado, é agora inativado por um mecanismo regulado por *AGAMOUS* (LIU et al., 2011). Em *N. tabacum* a expressão de *AG* foi detectada a partir do surgimento do primórdio da primeira sépala (Figura 17B) e sua função foi atribuída na especificação do terceiro e quarto verticilos florais (LENHARD et al., 2001; KEMPIN; MANDEL; YANOFSKY, 1993). No entanto, existem tecidos no pistilo que não se desenvolvem logo após a ativação de *AGAMOUS* e, por isso, nas margens de fusão das folhas carpelares dá-se o desenvolvimento do meristema marginal do carpelo (MMC), que dará origem à placenta, replum, septo do ovário, óvulo e as sementes em *A. thaliana* (REYES-OLALDE et al., 2013). Em *N. tabacum*, a ontogenia do desenvolvimento do óvulos e sementes não é bem conhecida, e faltam evidências que mostrem que ocorra da mesma maneira que em *A. thaliana*. Mas em fim, o fato é que os óvulos se originam a partir das últimas células meristemáticas a se diferenciarem no ovário (REYES-OLALDE et al., 2013), essa limitação ocorre por uma ação

exercida pelo próprio AGAMOUS (BOWMAN; SMYTH; MEYEROWITZ, 1989). A co-expressão de *SCII* com esse fator de transcrição, a partir do surgimento da primeira sépala (Figura 17B), inclusive nos óvulos (Figura 25D-F), e o resultado no ensaio de Y1H indicam que *SCII* é um alvo direto do fator de transcrição NAG1. Adicionalmente, os resultados obtidos sugerem o envolvimento de *SCII* na regulação da população de células meristemáticas, evitando que elas se diferenciem precocemente e mantendo-as em estado quiescente, para dar origem aos óvulos e, também, ao estilete e estigma. Assim, *SCII* seria um importante efetor na determinação do meristema floral. Abaixo é proposto um modelo da ação desses genes na manutenção das células meristemáticas nos primórdios dos verticilos reprodutivos (Figura 30).

Figura 30 - Representação esquemática do modelo proposto para atuação de *SCII*, *NAG1* e *WUS* no meristema floral. Nesse modelo, o gene *WUS* atuaria ativando *SCII* no meristema floral jovem e segue regulando *SCII* até o momento em que *NAG1* é ativado e inibe a expressão de *WUS*. Depois da inibição de *WUS*, *NAG1* toma o controle da regulação de *SCII* e direciona sua expressão para as células meristemáticas que darão origem aos carpelos e estames.

No modelo proposto acima (Figura 30), *SCII* é ativado tanto por WUSCHEL quanto por NAG1. Na Figura 14 e 15, pode ser observado que a expressão de *SCII* se inicia na flor primordial, em estágio bem jovem, antes do surgimento de qualquer primórdio dos verticilos. Para que essa expressão se inicie é necessária sua ativação por um ou mais fatores de transcrição expressos nesta fase do desenvolvimento floral. WUSCHEL, evolutivamente conservado com relação a seu local de expressão e função de regular a proliferação celular, poderia ser o ativador de *SCII*. Em meristemas florais já com os primórdios de sépalas e pétalas, até então não foi observada a expressão de *WUS* em nenhuma das espécies em que este foi caracterizado (LAUX et al., 1996; STUURMAN; JÄGGI; KUHLEMEIER, 2002; KIEFFER et al., 2006; WANG et

al., 2012; SOMSSICH et al., 2016). Fato, também observado no agora caracterizado *WUS* em *N. tabacum* (ZHOU et al., 2018). Portanto, aqui, um outro ativador da expressão de *SCII* seria necessário para explicar os resultados obtidos no presente trabalho. Neste estágio do desenvolvimento, ocorre a expressão de *NAG1* e a consequente especificação do terceiro e quarto verticilos. Segundo BOWMAN (1989) em *A. thaliana*, *AG* também atua limitando a proliferação celular no pistilo. Assume-se que seu homólogo em *N. tabacum*, *NAG1*, apresente as mesmas funções. A co-expressão de *NAG1* e *SCII* no meristema floral (Figura 15 e 17), além da ligação confirmada de *NAG1* ao promotor de *SCII* (Figura 20), permitem propor que este fator de transcrição seja um ativador da expressão de *SCII*, depois que *WUS* é desligado, e dirige sua expressão para controlar a proliferação celular no pistilo. Seria interessante realizar análises teciduais e/ou anatômicas nos estádios iniciais do desenvolvimento floral das plantas de silenciamento e superexpressão de *SCII*, para comparar com o desenvolvimento floral das plantas controle e, possivelmente, também identificar diferentes fenótipos nessas fases, como foram identificados nas fases em que o pistilo já se encontra diferenciado. Baseado nos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a ação de *SCII* é regular a proliferação celular no meristema floral e nos primórdios de verticilos, para que os órgãos florais possam alcançar o número necessário de células para se desenvolver adequadamente.

6. CONCLUSÕES

SCII inicia sua expressão no meristema floral e, à medida que a flor se desenvolve, a expressão deste gene se restringe aos verticilos internos e deixa de ser detectado nas sépalas e pétalas.

SCII e *NAG 1* se expressam nos mesmos tecidos e células dos primórdios dos terceiro e quarto verticilos florais.

A interação do fator de transcrição NAG1, com o promotor de *SCII*, pode ser responsável pela expressão de *SCII* nos primórdios jovens dos terceiro e quarto verticilos florais e, especialmente, nas fases iniciais do desenvolvimento do pistilo.

A sequência genômica de *SCII*, usada no presente trabalho, contém os elementos regulatórios *cis*-atuantes necessários para reproduzir a expressão do gene *SCII* endógeno, em plantas transgênicas.

Foi possível confirmar a localização subcelular de SCI1, em núcleo e nucléolo, das plantas transgênicas expressando SCI1-GFP, sob controle do promotor SCI1 endógeno.

7.REFERÊNCIAS

- AHRAZEM, O. et al. Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: A deeper study in *Crocus sativus* and its allies. **Genomics**, v. 96, n. 4, p. 239–250, 2010.
- BECKER, A.; ALIX, K.; DAMERVAL, C. The evolution of flower development : current understanding and future challenges. **Annals of Botany**, v. 107, p. 1427–1431, 2011.
- BOWMAN, J. L.; SMYTH, D. R.; MEYEROWITZ, E. M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, v. 1, p. 37–52, 1989.
- BOWMAN, j. L.; SMYTH, D. R., MEYEROWITZ, E. M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. **Development**, v.112, p. 1-20, 1991.
- BRAND, U. et al. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. **Science**, v. 289, n. 617, 2000.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Editora Embrapa Produção de Informação. Brasília, 1998.
- CHEN, X. Y.; KIM, J. Y. Transport of macromolecules through plasmodesmata and the phloem. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 4, p. 560–571, 2006.
- CIANNAMEA, S. et al. Protein interactions of MADS box transcription factors involved in flowering in *Lolium perenne*. **Journal of Experimenta**, v. 57, n. 13, p. 3419–3431, 2006.
- CLARK, S. E. Cell signalling at the shoot meristem. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. April, p. 276–284, 2001.
- COEN, E. Goethe and the ABC model of flower development. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III**, v. 324, n. 6, p. 523–530, 2001.
- CRESTI, M. et al. Stigma of *Nicotiana*: Ultrastructural and biochemical studies. **American Journal of Botany**, v. 73, n. 12, p. 1713, 1986.
- DEPAOLI, H. C. **SCI1, um novo inibidor tecido-específico da proliferação celular relacionado à sinalização por auxina**. [Tese Doutorado] Universidade de São Paulo, Departamento de Genética, 2010.
- DEPAOLI, H. C et al. *Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1)*, a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. **New Phytologist**, v.190, p.882 - 895, 2011.
- DEPAOLI, H C; DORNELAS, M. C; GOLDMAN, M. H. SCI1 is a component of the auxin-dependent control of cell proliferation in *Arabidopsis* upper pistil. **Plant Science**, v. 229, p.122-130, 2014
- DEPAOLI, H. C; GOLDMAN, G. H; GOLDMAN, M. H. S. *SCI1*, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling

pathway. **Plant Signal Behavior**, v. 7, n.1, p.1-6, 2012.

DORNELAS, M. C. et al. MADS: The missing link between identity and growth? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 2, p. 89–97, 2011.

DORNELAS, M. C.; DORNELAS, O. From leaf to flower : revisiting Goethe's concepts on the " metamorphosis " of plants. **Brazil Journal Plant Physiology**, v. 17, n. 4, p. 335–343, 2005.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, V.19, n.6, p.1349, 1991.

ENDRESS, P. K. Angiosperm floral evolution : morphological developmental framework. **Advances in Botanical Research**, v. 2296, n. 4, 2006.

ESAU, K. (1989). **Anatomia das plantas com sementes**. 3^a ed. São Paulo, Edgard Blücher. 293p.

FERREIRA, P. B. **A identificação de parceiros de interação de NtCDKG;2 revela suas possíveis funções biológicas em Nicotiana tabacum**. [Dissertação Mestrado] Universidade de São Paulo, Departamento de Genética, 2016.

FLETCHER, J. C. Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 53, p. 45–66, 2002.

FRANSSEN, H. J. et al. Cis-regulatory *PLETHORA* promoter elements directing root and nodule expression are conserved between *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 12, n. 2, p. 1–4, 2017.

FRIIS, E. M.; PEDERSEN, K. R.; CRANE, P. R. Cretaceous Angiosperm flowers : Innovation and evolution in plant reproduction. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 232, p. 251–293, 2006.

GOETHE, J. W. VON. **The Metamorphosis of the Plants**. [s.l.: s.n.].

GULYAEVA, L. F.; KUSHLINSKIY, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2016.

GUO, A. et al. DATF: A database of Arabidopsis transcription factors. **Bioinformatics**, v. 21, n. 10, p. 2568–2569, 2005.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Research**, v. 10, n. 11, p. 1788–1795, 2000.

HARTMANN, U. et al. Molecular cloning of *SVP* : a negative regulator of the foral transition in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 4, p. 351–360, 2000.

HOLT, A. L. et al. Signaling in shoot and flower meristems of *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 96–102, 2014.

- HWANG, J. E. et al. Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phytocystatin genes, *AtCYS1* and *AtCYS2*, during development and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 8, p. 905–915, 2010.
- INGRAM, G. C.; WAITES, R. Keeping it together: Co-ordinating plant growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 12–20, 2006.
- IRISH, V. F. The flowering of *Arabidopsis* flower development. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1014–1028, 2010.
- JACKSON, D. **In-situ hybridisation in plants. Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**. Eds. Bowles, D. J., S. J. Gurr and M. McPherson. Oxford University Press., 1991.
- JENIK, P. D.; IRISH, V. F. Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during *Arabidopsis* floral development. **Development**, v. 127, n. 6, p. 1267–1276, 2000.
- JEONG, S.; TROTOCHAUD, A. E.; CLARK, S. E. The *Arabidopsis* *CLAVATA2* Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the *CLAVATA1* Receptor-like Kinase. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1925–1933, 1999.
- JIN, J. et al. PlantTFDB 4 . 0 : toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 1040–1045, 2016.
- KARDAILSK, I. et al. Activation tagging of the floral inducer FT. **Science**, v. 286, p. 1962–1965, 1999.
- KAUFMANN, K.; MELZER, R.; THEISSEN, G. MIKC-type MADS-domain proteins: Structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. **Gene**, v. 347, p. 183–198, 2005.
- KEMPIN, S. A.; MANDEL, M. A.; YANOFSKY, M. F. Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the Tobacco floral homeotic gene *NAG1*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1041–1046, 1993.
- KIEFFER, M. et al. Analysis of the transcription factor *WUSCHEL* and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. **The Plant Cell Online**, v. 18, p. 560–573, 2006.
- KITAZAWA, M. S.; FUJIMOTO, K. A Dynamical phyllotaxis model to determine floral organ number. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 5, p. 1–27, 2015.
- KOLTUNOW, A. M. et al. Different temporal and spatial gene-expression patterns occur during anther development. **Plant Cell**, v. 2, n. 12, p. 1201–1224, 1990.
- KUSTERS, E. et al. Changes in cis-regulatory elements of a key floral regulator are associated with divergence of inflorescence architectures. **Development**, v. 142, n. 16, p. 2822–2831, 2015.
- KWIATKOWSKA, D. Flowering and apical meristem growth dynamics. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 187–201, 2008.

LAUX, T. et al. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. **Development**, n. 122, p. 87–96, 1996.

LENHARD, M. et al. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 805–814, 2001.

LEVY, Y. Y. The Transition to Flowering. **the Plant Cell Online**, v. 10, n. 12, p. 1973–1990, 1998.

LIN, H. et al. Evolutionarily conserved repressive activity of *WOX* proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 366–371, 2013.

LIU, C.; THONG, Z.; YU, H. Coming into bloom: the specification of floral meristems. **Development**, v. 136, n. 20, p. 3379–3391, 15 out. 2009.

LIU, X. et al. *AGAMOUS* terminates floral stem cell maintenance in *Arabidopsis* by directly repressing *WUSCHEL* through recruitment of Polycomb Group Proteins. **The Plant Cell**, v. 23, n. 10, p. 3654–3670, 2011.

LOHMANN, J. U. et al. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 793–803, 2001.

LUCAS, W. J.; LEE, J. Y. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 712–726, 2004.

MANDEL, M. A et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. **Nature**, v. 360, p. 273–277, 1992.

MATEOS, J. L. et al. Combinatorial activities of *SHORT VEGETATIVE PHASE* and *FLOWERING LOCUS C* define distinct modes of flowering regulation in *Arabidopsis*. **Genome Biology**, v. 16, n. 31, p. 1–23, 2015.

MARIATH, J. E. A; SANTOS, R.P; BITTENCOURT JR, N. S. **Flor**. In: APEZZATO DA GLÓRIA, B & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (2006) Anatomia Vegetal. pp 448 2ª Ed. Universidade Federal de Viçosa.

MAYER, K. F. X. et al. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 805–815, 1998.

MEEKS-WAGNER, D. Gene expression in the early floral meristem. **The Plant cell**, v. 5, n. October, p. 1167–1174, 1993.

MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. **The Plant cell**, v. 14 Suppl, p. S111–S130, 2002.

MOYROUD, E. et al. LEAFY blossoms. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 346–352, 2010.

MUIÑO, J. M. et al. Structural determinants of DNA recognition by plant MADS-domain transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 4, p. 2138–2146, 2014.

NAKAJIMA, K. et al. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. **Nature**, v. 413, n. 6853, p. 307–311, 2001.

NEMHAUSER JL, FELDMAN LJ, ZAMBRYSKI PC. Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. **Development**, v.127, p. 3877-3888, 2000.

NORMAN, C. et al. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. **Cell**, v. 55, n. 6, p. 989–1003, 1988.

OPARKA, K. J. et al. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. **Cell**, v. 97, n. 6, p. 743–754, 1999.

ORMENESE, S. et al. The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. **Planta**, v. 211, n. 3, p. 370–375, 2000.

PARCY, F.; BOMBLIES, K.; WEIGEL, D. Interaction of *LEAFY*, *AGAMOUS* and *TERMINAL FLOWER 1* in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. **Development**, v. 129, p. 2519–2527, 2002.

PELLEGRINI, L.; TAN, S.; RICHMOND, T. J. Structure of serum response factor core bound to DNA. **Nature**, v. 376, p. 490–497, 1995.

PEÑA, P et al. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 263–267, 2001.

PINOTI, V. F. **SCI1 (Stigma / style Cell cycle Inhibitor 1) interage com a maquinaria de splicing e seu silenciamento afeta o transcriptoma do pistilo de Nicotiana tabacum L.** Ribeirão Preto. [Dissertação Mestrado] Universidade de São Paulo, Departamento de Genética, 2016.

PURANIK, S. et al. Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA 3 in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 9, p. 3603–3615, 2014.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7^a. ed. Coord. Trad. J.E. KRAUS. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.2007.

REDDY, G. V. et al. Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 131, p. 4225–4237, 2004.

REINHARDT, D. et al. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. **Development**, v. 130, n. 17, p. 4073–4083, 2003.

REYES-OLALDE, J. I. et al. Inside the gynoecium: At the carpel margin. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 11, p. 644–655, 2013.

RIECHMANN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. Determination of floral organ identity by

- Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. **Molecular biology of the cell**, v. 8, n. 7, p. 1243–1259, 1997.
- SATINA, S.; BLAKESLEE, A. F. Periclinal chimeras in *Datura* in relation to the development of the carpel. **American Journal of Botany**, v. 30, n. 7, p. 453–462, 1943.
- SATINA, A. S.; BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. G. demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimera. **American Journal of Botany**, v. 27, n. 10, p. 895–905, 1940.
- SATINA, S. Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development and structure (a) of the style and stigma (b) of calyx and corolla. **American Journal of Botany**, v. 31, n. 8, p. 493–502, 1944.
- SEARLE, I. et al. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. **Genes and Development**, v. 20, p. 898–912, 2006.
- SHANNON, S.; MEEKS-WAGNER, D. R. genetic Interactions that regulate Inflorescence development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 5, p. 639–655, 1993.
- SHANNON, S.; MEEKS-WAGNER, O. R. A Mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. **The Plant Cell**, v. 3, p. 877–892, 1991.
- SHORE, P.; SHARROCKS, A. D. The MADS-box family of transcription factors. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 229, n. 1, p. 1–13, 1995.
- SIEBURTH, L. E.; MEYEROWITZ, E. M. Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. **The Plant cell**, v. 9, n. 3, p. 355–365, 1997.
- SOMSSICH, M. et al. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. **Development**, v. 143, n. 18, p. 3238–3248, 2016.
- STRINI, E. J. **A análise do interactoma de SCI1 (Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1) revela possíveis mecanismos de controle da proliferação celular**. Ribeirão Preto. [Tese Doutorado] Universidade de São Paulo, Departamento de Genética, 2014.
- STUURMAN, J.; JÄGGI, F.; KUHLEMEIER, C. Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. **Genes and Development**, v. 16, n. 17, p. 2213–2218, 2002.
- TADEGE, M. et al. *STENOFOLIA* regulates blade outgrowth and leaf vascular patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana glauca*. **The Plant Cell**, v. 23, n. 6, p. 2125–2142, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5ª ed., Artmed, 918 p. 2013.
- THEISSEN, G. et al. A short history of MADS-box genes in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 1621, n. 42, p. 115–149, 2000.

THEISSEN, G. S. H. Floral quartets. **Nature**, v. 3, n. 5, p. 469–471, 2001.

THOUE, J. et al. Repression of floral meristem fate is crucial in shaping tomato inflorescence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, p.1-20.

TILLY, J. J.; ALLEN, D. W.; JACK, T. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects. **Development**, v. 125, n. 9, p. 1647–1657, 1998.

VILLARINO, G. H. et al. Transcriptomic signature of the *SHATTERPROOF2* expression domain reveals the meristematic nature of *Arabidopsis* gynoecial medial domain. **Plant Physiology**, v. 171, n. 1, p. 42–61, 2016.

WANG, H. et al. *Arabidopsis* flower and embryo developmental genes are repressed in seedlings by different combinations of polycomb group proteins in association with distinct sets of cis-regulatory elements. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 1, p. 1–25, 2016.

WEIGEL, M. A. B. & D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 404, p. 889–892, 2000.

WIGGE, P. A. et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. **Science**, v. 309, p. 1056–1060, 2005.

WOLTERS-ARTS, M. et al. Stigma development in *Nicotiana tabacum*. Cell death in transgenic plants as a marker to follow cell fate at high resolution. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, n. 5, p. 243–254, 1996.

YAN, W.; CHEN, D.; KAUFMANN, K. Molecular mechanisms of floral organ specification by MADS domain proteins. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 154–162, 2016.

YANOFSKY, M. F. et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. **Nature**, v. 346, p. 35–39, 1990.

YANOFSKY, M. F. Floral meristems to floral organs: genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 167–188, 1995.

YE, L. et al. Gain of an auto-regulatory site led to divergence of the *Arabidopsis* *APETALA1* and *CAULIFLOWER* duplicate genes in the time, space and level of expression and regulation of one paralog by the other. **Plant Physiology**, v. 171, p.1055-1069, 2016.

ZHANG, H. et al. PlantTFDB 2.0: Update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 1114–1117, 2011.

ZHOU, X. et al. Comparative analysis of *WUSCHEL*-related homeobox genes revealed their parent-of-origin and cell type-specific expression pattern during early embryogenesis in Tobacco. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 311, 2018.

ZIK, M.; IRISH, V. F. Flower development: initiation, differentiation, and diversification. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 119–140, 2003.

Apêndice A- Sequência genômica de SCI1 obtida a partir do sequenciamento no vetor TOPO TA cloning

Alinhamento feito no *software* CLUSTAL O (1.2.1). Os quatro exons são destacados em amarelo, azul, rosa e verde, respectivamente.

```
Contig1 -----
Contig2 CCCTTGCCATAAGCTATAAGTTGGTCACCCCAACTTATGATTTTTCAGCTTATAAGCAC
SCI1-PROM ----gccataagctataagttggtcaccccaacttatgatttttcagcttataagcac
```

```
Contig1 -----
Contig2 TTTTAGTTTGACCAAGACTTTTACTAATTTATCCTTAATAATATTTTTTAATTTACAAAA
SCI1-PROM ttttagtttgaccaagacttttactaattttatccttaataatattttttaatttacaaaa
```

```
Contig1 -----
Contig2 TATTTTTTCAAATAAAATTTTAAATTTTCTCTTCATTCCATATTCGTTGTTTATCATT
SCI1-PROM tattttttcaaataaaatttttaaatTTTctcttcattccatattcgttgtttatcatt
```

```
Contig1 -----
Contig2 TTCTCTACAAAGAAACTTTTAAATTCATAATCTTTTATAAAAAATTTAAGGGTATTTTTTA
SCI1-PROM ttctctacaaagaaactttttaattcataatcttttataaaaaatttaagggatattttta
```

```
Contig1 -----
Contig2 TCTTTTTTAACAAGAGAACAGTTTATCAGCACTTTTCTACCAACATATCAGGTGCTTATT
SCI1-PROM tctttttaacaagagaacagtttatcagcacttttctaccaaacatatcaggtgcttatt
```

```
Contig1 -----
Contig2 ATCAGTTTCAGCACGTCTATCCAAACACATAAATAGATATTTAAAAAATTAATTCAGCA
SCI1-PROM atcagtttcagcacgtctatccaaacacataaaatagatattttaaaaaattaattccagca
```

```
Contig1 -----
Contig2 CTTCAAGATTATCAGTTATTTACAATAAGCTAATCCAAACGGGTAAAGTTTAATTAAGGT
SCI1-PROM cttcaagattatcagttattttacaataagctaataccaacgggtaagtttaattaaggt
```

```
Contig1 -----
Contig2 TGCTCCTTAATTAAATTATTTGTAAGGGAAGGAGTACTCACTGCAATTACAACGTTATT
SCI1-PROM tgctccttaattaaattattttgtaaggggaaggagtactcactgcaattacaacgttatt
```

```
Contig1 -----
Contig2 ACATGGTTGCGGCGAATACGTGCCAGCATCGATGTGGGCAAGATATATAAGACTTAATCA
SCI1-PROM acatggttgcggcgaatacgtgccagcatcgatgtgggcaagatatataagacttaatca
```

```
Contig1 -----
Contig2 TTGAGCTATTTTATTGGAAAAATTGAGAATAAAAAAGAAAAATATACAAAACAACTTATAC
SCI1-PROM ttgagctattttatttgaaaaatttgagaataaaaaagaaaatatacaaaaacaacttatac
```

```
Contig1 -----
Contig2 TATTAAGAATCATAATTTGAGTTATACTACAAGTTAGAGTCTCTCACTTAATCACTATTA
SCI1-PROM tattaagaatcataatttgagttatactacaagtttagagtctctcacttaatcactatta
```

```
Contig1 -----
Contig2 TTCTACTCGATTAAACCAGTGAGGTGTTTTTTGAAAATAGTGTTAGATAATTTGATAA
SCI1-PROM ttctactcgattaaaaccagtgaggtgttttttgaaaatagtgtttagataaatttgataa
```

Contig1	-----
Contig2	CAAAGTATGAAATTGAGAAAAACAGCCCTTCTGGAGGAAACTAATCATCAATAAGATAGAG
SCI1-PROM	caaagtatgaaattgagaaaaacagcccttctggaggaaactaatcatcaataagatagag
Contig1	-----
Contig2	GTAAAAATTTATAAAATCTTCTTTATAATCAATGCCATGTCCCATGTTTCTATCTCAAGT
SCI1-PROM	gtaaaaatTTATAAAATcTtctTTtataatcaatgccatgtcccatgTtttctatctcaagt
Contig1	-----
Contig2	GGAATTGAAAAACATAGGTAATATACATAATAAACCAACATATATATGTGCATGTATAAT
SCI1-PROM	ggaattgaaaaacataggtaatatacataataaaaccaacatatatatgtgcatgtataat
Contig1	-----
Contig2	AAGCCCTCCGTCCCATTTTAAGTATCGGATATAGTTTTTCAATTGTATTTATGTTCTTAT
SCI1-PROM	aagccctccgtcccattttaaagtatcgatatagtttttcaattgtattttatgttcttat
Contig1	-----
Contig2	TGATTAAATTTTTATCTACCGTTGATTTCTTAGGGCCTCATTTTAGTTGGAAATAATTT
SCI1-PROM	tgattaaatTTTTtctaccgttgatttcttagggcctcatTTtagttggaataattt
Contig1	-----
Contig2	TTTATACATTAATATGTTTCAGCTAATGAGATTTTCAGAAGTTCACCTACAGCTCAAAAATCT
SCI1-PROM	tttatacattaatatgttcagctaataagatttcagaagttcactacagctcaaaaatct
Contig1	-----
Contig2	ATAATATATATGCTAATTAAAAGCTCGAAAAAGTGCAAAAACATAGATAAACCAAAAAAG
SCI1-PROM	ataatataatatgctaattaaaagctcgaaaaagtgcaaaaacatagataaaacaaaaaag
Contig1	-----
Contig2	AAAAATGAAAAATAAAAAATAGCAACTTTAGTTGAAAGAATAATAGTATGACAAAATAT
SCI1-PROM	aaaaatgaaaaataaaaaaataagcaactttagttgaaagaataatagtatgacaaaatat
Contig1	-----
Contig2	TTTACATGTGAAGTAGAACATCGTACTTACAGTGAGGACTACAAACATTAAATGTTAATT
SCI1-PROM	tttacatgtgaagtagaacatcgTacttacagtgaggactacaaacattaaatgttaatt
Contig1	-----
Contig2	GTAACCATTTTCATAGTTGTTTGAATGATTGGCTTATCAAAATAATGAGAAAAAGAAAAC
SCI1-PROM	gtaaccattttcatagttgtttgaatgattagcttatcaaaataatgagaaaaagaaaaac
Contig1	-----
Contig2	TTTATCTCTATGAGTTGCAAGATTTTATTGTGCGGAAAATACCTTGATTTTCGGGTATCG
SCI1-PROM	tttatctctatgagttgcaagattttattgtgCGGaaaataccttgattttcgggtatcg
Contig1	-----
Contig2	CTCGATCATTTTCATTTTCTGGTACGGAATTGAGAATAACTAATTGAGTAGCATACGATG
SCI1-PROM	ctcgatcatTTTcattttctggTacggaattgagaataactaattgagtagcatacgatg
Contig1	-----
Contig2	CGGTTTCACTTTAATACGAGACTTCATAAAATTAGTTGGATAAATAAATCTAACATAATA
SCI1-PROM	cggTTTcactTTAatacGagacttcataaaattagttggataaataaatctaacataata
Contig1	-----

Contig2 SCI1-PROM	ATAATAATTTATAAGTTTGCACAAAGTGACTCTAGGATTCAAATTTACACACAACGTTAGT ataataatttataagtttgcacaaagtgactctaggattcaaatttcacacaacgttagt
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- ATACAACAATTAGCTTTTAGGTAATGGTTGTGAGTTGTGACTAACAAATTGTTATACGTT atacaacaattagcttttaggtaatggttgtagttgtgactaacaattgttatacgtt
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- TTCTCATTTACTGATCTTAAGTGGCTTCGTAATATCTTTTATACCATTGGAGATAGACT ttctcatttactgatcttaagtggcttcgtaatatcttttataccatttgagatagact
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- AACATAAGAGTTATTTAGAGGCATTTTCAAAGAGACAAATTTAGACCATTGGATTGATA aacataagagttatttagaggcatTTTCAAAGAGACAAATTTAGACCATTGGATTGATA
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- GGATCAGAACTTAAATAATGGCTAAAAGAATATACAGTGCAAATAATCTAATTTTTTTAT ggatcagaacttaataatggctaaaagaatatacagtgcaaataatctaatttttttat
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- AACTAAAAAACTACACTCAAACCTTTTAGAACGGTATTATTGGGCCCGTGCTGCGGCTA aactaaaaaaactacactcaaacttttagaacgggtattattggggcccgctgctgcggcta
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- TCATAACTAGTAAAATAAAATAAAAGGAAGACAACAATTTCAAGAATATTTTTCTGCGAA tcataactagtaaaataaaataaaaggaagacaacaatttcaagaatatttttctgcgaa
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- ATAGAATCAGAGGTGCGAGTAAATGGGGAGCGATAAGAAGACGACGGAGGAGAAGAGGAA atagaatcagaggtgcgagtaaATGGGGAGCGATAAGAAGACGACGGAGGAGAAGAGGAA
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- GCATAAGAGAAATTCGCCTTCTTCTCCACGAGGTTTTTCTTTCTTGTGTCTTCCAAA GCATAAGAGAAATTCGCCTTCTTCTCCACGAGGTTTTTCTTTCTTGTGTCTTCCAAA
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- TCTGCAAAGAGATAATTTTGAATATATATGGGCTTATACGTCTTTGTGTCTGCTTAAAC TCTGCAAAGAGATAATTTTGAATATATATGGGCTTATACGTCTTTGTGTCTGCTTAAAC
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- AGATGAAGTGAAAAGCAAACGCCAGAATATCAAAGGGGATGAAGAGCGAAGGAAAAGAAA AGATGAAGTGAAAAGCAAACGCCAGAATATCAAAGGGGATGAAGAGCGAAGGAAAAGAAA
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- AGGACAATCCCAGAAAGGAA----- GGACAAATCCAAGAAAGGAGAAGCACAAATCCCATAAATCCAAATGTCATTCTAGTGAAGG
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- ----- TACTTGACAATTTTTGTTTTGCTTTAAATTTTGTATATGAGTTCTGTTCAGTATTAAG
Contig1 Contig2 SCI1-PROM	----- ----- CTGAGAATTTACTGATTTTATTATGAAAATTTAGGGATTTTGTCTTTACTTGGGCCTCA

Contig1	-----
Contig2	-----
SCI1-PROM	GAAGGGTTCGTTTAGTTCCGTAAAACGTTTGCGATTTAGAATTTGATGTTGTTGCTGTTA
Contig1	-----
Contig2	-----
SCI1-PROM	GGGTTTGCTGCACTGATTAGTATAATGAGTTTGAAAAGGGAAAGCAAGTATTATGCCGCT
Contig1	-----CTTTGTTGTTTTTCATTCATTGATAGTTATGTTTCAGGTTATGTGATC
Contig2	-----
SCI1-PROM	CAGCAATCCTTTTGCTTTGTTTTCCAATTCAATTGATAGTTATGTGTAGGTTATGTGATC
Contig1	TGCCATTTATTAAGCAACTAACTATAAAATTAGGGCTGCACACAAACACATATAAAAAAG
Contig2	-----
SCI1-PROM	TGCCATTTATTAAGCAACTAACTATAAAATTAGGGCTGCACACAAACACATATAAAAAAG
Contig1	AAAAAGAAGAAAAATGATGGGTACGTATGTGCAAATAGTTAGAACACCATTTGCCTTTGG
Contig2	-----
SCI1-PROM	AAAAAGAAGAAAAATGATGGGTACGTATGTGCAAATAGTTAGAACACCATTTGCCTTTGG
Contig1	AAATGATGGGTGCTTGCTAGTGGCTAAGCCTTCTTCTTTGAAATGGAGTTCTTTGTTTCAG
Contig2	-----
SCI1-PROM	AAATGATGGGTGCTTGCTAGTGGCTAAGCCTTCTTCTTTGAAATGGAGTTCTTTGTTTCAG
Contig1	ATCTTCCATTTACAATGGTGTTATTTACTGAACTCCAAGATCTTAGAGTGTAATCCATGT
Contig2	-----
SCI1-PROM	ATCTTCCATTTACAATGGTGTTATTTACTGAACTCCAAGATCTTAGAGTGTAATCCATAT
Contig1	ACAGATGTGAGTCAAAGCTAGGATATCTTATTCTAATAACTGAAAAGGTCTTCGATTGCT
Contig2	-----
SCI1-PROM	ACAGATGTGAGTCAAAGCTAGGATATCTTATTCTAATAACTGAAAAGGTCTTCGATTGCT
Contig1	GTGCACATTTTGTTCAAATAGAATTAGGGTTCCCTTGGGTTCTTTCAACTCTTTATATAG
Contig2	-----
SCI1-PROM	GTGCACATTTTGTTCAAATAGAATTAGGGTTCCCTTGGGTTCTTTCAACTCTTTATATAG
Contig1	TGATGGAGTAACTAATAGTCTTAGAGATAGAGTTGTGACTTGTCAGTGATGATCTGTTAG
Contig2	-----
SCI1-PROM	TGATGGAGTAACTAATAGTCTTAGAGATAGAGTTGTGACTTGTCAGTGATGATCTGTTAG
Contig1	ATTTGGCAATCTTTTACAATGAAAACAAAGGATCAAAGACTGGATCGCTGGTTCTACTTC
Contig2	-----
SCI1-PROM	ATTTGGCAATCTTTTACAATGAAAACAAAGGATCAAAGACTGGATCGCTGGTTCTACTTC
Contig1	ATGTTACTAACCTTTGTTCTTGATATTATTAGGTTTCACTCCATTATTTTGTGTGACTCA
Contig2	-----
SCI1-PROM	ATGTTACTAACCTTTGTTCTTGATATTATTAGGTTTCACTCCATTATTTTGTGTGACTCA
Contig1	TGGTGACATCTTGTTGGTAGCTTTATAGATTTATACCACTATTGTTTTTTTTTTTGATGA
Contig2	-----
SCI1-PROM	TGGTGACATCTTGTTGGTAGCTTTATAGATTTATACCACTATTGTTTTTTTTTTTGATGA
Contig1	ACTGGGAATTTATTCATTAGAAAATTACTCACTACGACAGTTTGTATCCTGTGGATCATTA
Contig2	-----

SCI1-PROM	ACTGGAATTTATTCATTAGAAATTACTCACTACTACAGTTTGTATCCTGTGGATCATTA
Contig1	CATATACCACTATAGTTATTTTGTATGATTATTATAGCAAGTGGTCGTTTCTGATATTTT
Contig2	-----
SCI1-PROM	CATATACCACTATAGTTATTTTGTATGATTATTATAGCAAGTGGTCGTTTCTGATATTTT
Contig1	AAATATTGTATGTTTATACATAGGGAGATGTGTGCACTTAAATTAAATGGTTCCCTGTA
Contig2	-----
SCI1-PROM	AAATATTGTATGTTTATACATAGGGAGATGTGTGCACTTAAATTAAATGGTTCCCTGTA
Contig1	TGTTACTGGTTTGGTGCTAGAAGTTATGTTAGACACGCTGACTCACTGATATTGCTTCAG
Contig2	-----
SCI1-PROM	TGTTACTGGTTTGGTGCTAGAAGTTATGTTAGACACGCTGACTCACTGATATTGCTTCAG
Contig1	AGAAGAAGTCAGGGGAAAAGCACAAAACCAAGAGCCACAAACATAAGGATAAATCGGTGA
Contig2	-----
SCI1-PROM	AGAAGAAGTCAGGGGAAAAGCACAAAACCAAGAGCCACAAACATAAGGATAAATCGGTGA
Contig1	GTGCTTCTTGTTTAATACCTACATTTCTTTTGCTTCAAATAACATTCTCAAGCTTATCA
Contig2	-----
SCI1-PROM	GTGCTTCTTGTTTAATACCTACATTTCTTTTGCTTCAAATAACATTCTCAAGCTTATCA
Contig1	TTTTACTCTGTATCATATCTCGTGGAAGGAAAATTGTTATCTGCTCGCGTAGTTATTATC
Contig2	-----
SCI1-PROM	TTTTACTCTGTATCATATCTCGTGGAAGGAAAATTGTTATCTGCTCGCGTAGTTATTATC
Contig1	CTTCGCACTAATTTGTTGCTGTATGTAGGTAGCATTGGTTTAAGTTGGTGTGAATCTGT
Contig2	-----
SCI1-PROM	CTTCGCACTAATTTGTTGCTGTATGTAGGTAGCATTGGTTTAAGTTGGTGTGAATCTGT
Contig1	TGAATATAATAGGTTGCTCGTCTTTTTCTGTTTTGGCTGGAAGTATAGTTAGATATAGC
Contig2	-----
SCI1-PROM	TGAATATAATAGGTTGCTCGTCTTTTTCTGTTTTGGCTGGAAGTATAGTTAGATATAGC
Contig1	TTTCTTGTGGTATGACCTTTCAGCTATCTATGTTAATTCTTGTAGAGAGTCTTCATTACA
Contig2	-----
SCI1-PROM	TTTCTTGTGGTATGACCTTTCAGCTATCTATGTTAATTCTTGTAGAGAGTCTTCATTACA
Contig1	TATGTGGCTGGCTGATGCTTAGAAATAAGTCTGTAAACTTGGAATAACTGGAGTTCCA
Contig2	-----
SCI1-PROM	TATGTGGCTGGCTGATGCTTAGAAATAAGTCTGTAAACTTGGAATAACTGGAGTTCCA
Contig1	TTTTCTTCAGTTGTGATATCTGAAATCTTGGTTGGACTATTGCTGTCTTGATTGCTGATA
Contig2	-----
SCI1-PROM	TTTTCTTCAGTTGTGATATCTGAAATCTTGGTTGGACTATTGCTGTCTTGATTGCTGATA
Contig1	TAAATATTTGTGAAATAAACCAAGGTATTCATATATGGAGGAATCATTCCTT-TGAAGAG
Contig2	-----
SCI1-PROM	TAAATATTTGTGAAATAAACCAAGGTATTCATATATGGAGGAATCATTCCTTTTGAAGAG
Contig1	AACCTGTCAGATTCAAAAAGGGCAATAATTTCTGTGTGGTGAATTGTTAATGGCGTCCAC
Contig2	-----
SCI1-PROM	AACCTGTCAGATTCAAAAAGGGCAATAATTTCTGTGTGGTGAATTGTTAATGGCGTCCAC

Contig1	ACTCTCAGAGCTCTTTAATACTTGAAAAATTGTTAGACTGTAGCAGTAGCAGTAACTGTT
Contig2	-----
SCI1-PROM	ACTATCAGAGCTCTTTAATACTTGAAAAATTGTTAGACTGTAGCAGTAGCAGTAACTGTT
Contig1	TTCGCCTCTGTTCTTTCTCATGACTTCCTTTATGAAAATAGCTCTTTAATACTTGAAAA
Contig2	-----
SCI1-PROM	TTCGCCTCTGTTCTTTCTCATGACTTCCTTTATGAAAATAGCTCTTTAATACTTGAAAA
Contig1	TTGTTAGACTGTAGCAGTAGCAGTAACTGTTTTTCGCCTCTGTTCTTTCTCATGACTTCCT
Contig2	-----
SCI1-PROM	TTGTTAGACTGTAGCAGTAGCAGTAACTGTTTTTCGCCTCTGTTCTTTCTCATGACTTCCT
Contig1	TTATGAAAATAAGTAGGACATCCATTTTGACTCAGGCTTTATTCCTCCATCTTTGATTTT
Contig2	-----
SCI1-PROM	TTATGAAAATAAGTAGGACATCCATTTTGACTCAGGCTTTATTCCTCCATCTTTGATTTT
Contig1	TAATTATTTTGCTTTACCTTCTTTCTCAGAAAAACAAGTTTGAAGAGTTATCAAAAAGATG
Contig2	-----
SCI1-PROM	TAATTATTTTGCTTTACCTTCTTTCTCAGAAAAACAAGTTTGAAGAGTTATCAAAAAGATG
Contig1	ATTATTTCTCTAAGAACAATGAATTTGCTTCTTGGCTGAAAGATAAGAAGAATTTGTTCT
Contig2	-----
SCI1-PROM	ATTATTTCTCTAAGAACAATGAATTTGCTTCTTGGCTGAAAGATAAGAAGAATTTGTTCT
Contig1	TCTCAGATCTTTTCGTCTGAGACTGCACGCAATTTATTCTCTGACTTTTGTACATACAATGG
Contig2	-----
SCI1-PROM	TCTCAGATCTTTTCGTCTGAGACTGCACGCAATTTATTCTCTGACTT-TGTCATACAATGG
Contig1	AACAAGGGAAAGCTTGACAGCCAATACGTTGAGGGAATTGCAACCGGGCCTCGGTCATCC
Contig2	-----
SCI1-PROM	AACAAGGGAAAGCTTGACAGCCAATACTATGAGGGAATTGCAACCGGGCCTCGGTCATCC
Contig1	CACGCTTGGAATATCAAAAAGGACCCAGTTTAAGGG
Contig2	-----
SCI1-PROM	CACGCTTGGAATATCAAAAAGTAA-----

ANEXO A- Plasmídeos utilizados nas clonagens

Mapa do plasmídeo *TOPO® TA Cloning® Dual Promoter Kit (Invitrogen)* vetor utilizado para clonagem de sequências para produção de sondas de RNA. O mapa evidencia o sítio de clonagem, como vetor *LacZα*, gene que codifica a enzima β galactosidase e também os sítios de ligação para as RNAs polimerases SP6 e T7 responsáveis pela transcrição da sequência clonada.

Mapa do plasmídeo *pCR®2.1-TOPO® do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen)*, utilizado para a clonagem inicial e sequenciamento da sequência genômica de *SCI1*. O mapa evidencia o sítio de clonagem *Plac*, *lacZα*, gene codificador da enzima β galactosidase que funciona marcador das colônias portando vetor com o incerto de interesse. O vetor também confere as células portando o vetor as resistências aos antibióticos ampicilina e canamicina.

Mapa do vetor pDONR221, vetor de entrada no (*Sistema Gateway; Invitrogen*). O vetor possui os sítios de recombinação **attP1** e **attP2**; **Cm^R**: resistência a cloranfenicol; **ccdB**: sequência codificadora da proteína ccdB, codifica uma proteína tóxica para cepas de *E.coli*. Os sítios M13-Forward e M13-Reverse são utilizados para sequenciamento. O vetor pDONR221 possui marcador de resistência à canamicina. Após reação BP, os genes ccdB e CmR são substituídos pelo fragmento de interesse.

Mapa do vetor de expressão em leveduras pDEST22 (vetor de destino no *Sistema Gateway; Invitrogen*). O vetor é utilizado para clonagem das sequências que portarão o domínio de ativação do fator de transcrição Gal4 (GAL4 AD) fusionado na porção carbóxi terminal da proteína, o vetor também possui um sinal de localização nuclear (NLS) que é fusionado a sequência AD. As sequências são clonadas nesse vetor através de reação LR, recombinação entre os sítios attL presentes no vetor de entrada e os sítios attR presentes neste vetor. O vetor possui o gene que confere resistência à ampicilina em bactérias e o gene TRP1, que codifica uma enzima da via de biossíntese do triptofano, que confere seleção por auxotrofia das leveduras que possuem o vetor.

Mapa do vetor de expressão em plantas utilizado para clonagem da sequência genômica de *SCII*. O vetor possui a sequência da Egfp que se expressa fusionada a sequência de interesse clonada no vetor. No mapa, podem ser observadas os sítios de seleção dos antibióticos

canamicina (plantas) e espectinomomicina/ estreptomomicina (*E. coli*). Também são observadas as bordas RB e LB necessária para inserção do vetor em células de *Agrobacterium* e o terminador T35S que finalizada a transcrição da sequência da Egfp.

Mapa do vetor utilizado para integração de sequencias no genoma de levedura. pABAi-GW (vetor de destino no sistema *Gateway*; modificado de Clontech). O mapa evidencia a presença **AurR**: gene de resistência ao fungicida Aureobasidina A; **URA3**: CDS do gene *URA3* que codifica a enzima *orotidine 5-phosphate decarboxylase (ODCase)*, envolvida na síntese de novo da base racila. Essa porção é utilizada para recombinação homóloga com o genoma de leveduras; **Ori**: Origem de replicação em *E. coli*; **GW**: Sítios *attR1* e *attR2* para recombinação pelo sistema *Gateway*.