Juliane Karine Ishida

Estudo do perfil transcricional do retrotransposon Retrolyc1
em mutantes de tomate Micro-Tom e em suspensão celular
de fumo

São Paulo

2008

Juliane Karine Ishida

Estudo do perfil transcricional do retrotransposon Retrolyc1
em mutantes de tomate Micro-Tom e em suspensão celular
de fumo

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientador(a): Marie-Anne Van Sluys

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Ishida, Juliane Karine

Estudo do perfil transcricional do retrotransposon Retrolyc1 em mutantes de tomate Micro-Tom e em suspensão celular de fumo

Número de páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Elementos de transposição 2. Retrotransposon I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).Marie-Anne Van Sluys
Orientador(a)

Aos meus pais.

かわいい子には旅をさせ

(Kawaii ko ni wa tabi wo sase).

Autor desconhecido

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à prof^a Dr^a Marie-Anne Van Sluys pela orientação ao longo de toda esta dissertação, pela amizade, animação, por acreditar em mim e no meu trabalho.

Agradeço à prof^a Dr^a Maria Magdalena Rossi por acreditar no meu potencial e por sempre ajudar a manter a organização e dinâmica do laboratório.

Ao prof^o Lázaro Pereira Perez da ESALQ por disponibilizar as plantas utilizadas neste trabalho. Aproveito para agradecer ao Marcelo Lataruto pela ajuda com as mutanes de tomate.

Ao Dr^o Vitor Vitorello, CENA-ESALQ/USP, por ceder a suspensão celular de fumo, BY2.

Agradeço à Prof^a Dr^a Hana Paula Masuda por ter ensinado tantas coisas, entre as quais a manipulação de suspensão celular e sistema Gateway[®]. Além da amizade, agradeço por ser o meu exemplo que pessoas esquecidas podem tornar-se pesquisadores, ainda tenho esperança.

A todas as pessoas do GaTE lab: Alessandro, Ana Paula, Andrés, Breno, Bruno, Cíntia, Claudia, Dani K, Dani Milstein, Douglas, Edgar, Érika, Fabiana, Guilherme, Hana, Jonas, Leonor, Luisa, Mayra, Marcelo, Maria Elisa, Marisa, Myna, Nilo, Regina, Silvia, Úrsula, Vanessa, Vivian, Wanessa. Nunca pensei que seria possível ter afinidade com tantas pessoas. Vou sentir muita saudade, de verdade.

Gostaria de agradecer especialmente a Regina pela paciência e dedicação com que me supervisionou durante a iniciação científica.

Agradeço em especial também à Myna pela amizade e paciência em tirar minhas duvidas seja pessoalmente, via email, telefone ou “Orkut”.

Agradeço a Dani K, Marcelo, Guilherme, Douglas e Bruno por tornar o ambiente de trabalho um lugar tão descontraído e divertido.

Agradeço a Marisa pela ajuda na manipulação do aparelho “Slot blot”, pelas inúmeras discussões do Thi1; além da amizade.

Agradeço a pessoa mais importante do laboratório, Leonor. A única pessoa que quando falta ou tira férias faz do laboratório um lugar caótico. Pelo excelente apoio técnico e por ser um exemplo de vida para mim.

Agradeço ao Jonas por ter enxergado o botão “ROI boundairs”, tão essencial para análise dos resultados deste trabalho.

Agradeço à Silvia pela amizade, apoio técnico e psicológico.

A todas as pessoas do laboratório de Fisiologia Vegetal. Agradeço especialmente à Ana Maria, Luciano e Auri por sempre estarem dispostos a ajudar. Agradeço também à Cássia, Camila e Cíntia pela amizade, discussões e pelo apoio durante o trabalho.

Agradeço à Prof^a Dr^a Mari Cleide Sogayar, por ter possibilitado que eu desenvolvesse meu primeiro projeto de iniciação científica em seu laboratório, aproveito para deixar o meu sincero agradecimento ao Leonardo de Oliveira Rodrigues por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa, que sem duvida foram essenciais para a minha formação.

Não posso deixar de agradecer a Dani Uehara e Helô por tornar possível que eu estivesse presente nas aulas do curso de biologia mesmo que ausente, trabalhando no laboratório.

Quero agradecer sinceramente ao Ricardo dos Santos Freire Jr por ter sido uma pessoa tão importante na minha vida profissional e também pessoal.

Um sincero e profundo “muito obrigado” aos meus pais pelo apoio irrestrito em todo e qualquer momento da minha vida. Digo o mesmo ao meu “roommate”, amigo e irmão, Junior e para a minha melhor amiga, “roommate” e também irmã, Tatiane.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

LISTA DE ABREVIATURAS

α : “alfa” (letra grega)

π : “pi” (letra grega)

AIA: ácido indolil acético

AIB: ácido indolil burítico.

BLAST: do ingles; *Basic Local Alignment Search Tool*

BRT: mutante bushy root

BY-2: do ingles; *Bright Yellow 2*

CDK: do inglês; *Cyclin dependent kinase*

cDNA: DNA complementar

DAPI: do inglês; 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DGT: mutante diageotropica.

DIRS: do ingles; *Dictyoatellium* intermediate repeat sequence.

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAse: desoxirribonuclease

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA: ácido etileno diamônio tetracético

EN: endonuclease

GFP: do inglês; *Green Fluorescent Protein*

GUS: β -glucuronidase

kb: 1000 bases

kbp: mil pares de base

LB: Luria-Bertani

LINEs: do ingles; *long interspersed nuclear elements*

LTRs: do inglês; *long terminal repeats*

Le: *Lycopersicon esculentum*

Lh-*Lycopersicon hirsutum*

Lp: *Lycopersicon peruvianum*

Lpp- *Lycopersicon pimpinellifolium*

MITE: do inglês; *miniature inverted-repeat transposable elements*

Mb: milhões de bases

MR: Motivos Repetidos

Nt: *Nicotiana tabacum*

RNAm: RNA mensageiro

RPL2: do inglês; Ribossomal protein Large 2.

ORF: do ingles; *open reading frame*
pb: pares de base
PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês; *polymerase chain reaction*)
PBS: do inglês; *primer binding site*
PLE: do ingles; Penelope-like element.
PPT: do inglês; *polypurine tract*
PROT: protease
R: do inglês; *repeated RNA*
RNA: ácido ribonucleico
RNAseH: ribonuclease H
rpm: rotações por minuto
RT: transcriptase reversa (do inglês; reverse transcriptase)
RT-PCR: PCR realizada sobre produto transcrito de modo reverso.
SINES: do ingles; *short interspersed nuclear elements*
TDS: do inglês; *target site duplication*
TIRs: do inglês; *terminal inverted repeat*
tRNA: RNA transportador
U3: do inglês; *unique 3' RNA*
U3A2MR: região U3 de Retrolyc1A contendo dois motivos repetidos
U3A3MR: região U3 de Retrolyc1A contendo três motivos repetidos
U3B: região U3 de Retrolyc1B
U5: do inglês; *unique 5' RNA*
VLP: do inglês; *virus-like particle*
X-GLUC: do inglês; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
2,4D: 2,4 ácido acético dichlorofenoxil

Sumário

<i>I. Introdução.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1-Elementos de Transposição.</i>	<i>12</i>
<i>I.2-Ciclo de transposição de Retrotransposon com LTR.....</i>	<i>16</i>
<i>I.3-Função dos elementos de transposição.</i>	<i>17</i>
<i>I.4-Retrotransposons Tnt1.</i>	<i>22</i>
<i>I.4-Retrolyc 1</i>	<i>23</i>
<i>II Objetivos.....</i>	<i>27</i>
<i>III Materiais e Métodos</i>	<i>28</i>
<i>III.1. Material Botânico.....</i>	<i>28</i>
<i>III 2. Plasmídeos.....</i>	<i>28</i>
<i>III 3. Meios de Cultura</i>	<i>29</i>
<i>III3.1 Escherichia coli</i>	<i>29</i>
<i>III 3.2. Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>30</i>
<i>III. 3.3 Plantas</i>	<i>31</i>
<i>III 4 Clonagem do promotor do retrotransposon Retrolyc1B.....</i>	<i>32</i>
<i>III 4.1 Amplificação do fragment por PCR.....</i>	<i>33</i>
<i>III 4.2 Transformação de bactéria</i>	<i>34</i>
<i>III 4.3 Isolamento do plasmídeo em pequena escala.....</i>	<i>35</i>
<i>III 4.4.Transformação de Agrobacterium tumefaciens.....</i>	<i>36</i>
<i>III. 4.5.Análise da expressão transiente em plantas por bombardeamento.....</i>	<i>37</i>
<i>III 4.5 Ensaio Histoquímico</i>	<i>38</i>
<i>III.5 Transformação da cultura celular Bright Yellow 2.....</i>	<i>39</i>
<i>III 5.1 Extração do DNA Vegetal</i>	<i>40</i>
<i>III 6. Análise da atividade da região promotora de Retrolyc1B em suspensão celular de fumo transgênica.</i>	<i>410</i>
<i>III 6.1 Tratamento Celulase.....</i>	<i>410</i>
<i>III 6.2 Tratamento com Salicilato de Sódio</i>	<i>420</i>
<i>III 6.3 Tratamento com 2,4D.....</i>	<i>42</i>
<i>III 6.4 Tratamento com AIA e AIB.....</i>	<i>42</i>
<i>III.6.5. Ensaio Fluorimétrico</i>	<i>421</i>
<i>III 6.6. Análise em Microscopia.....</i>	<i>443</i>
<i>III. 7 Análise da atividade promotora de Retrolyc1 ao longo do ciclo celular.....</i>	<i>443</i>
<i>III. 7.1 Sincronização da cultura celular com Afidicolina</i>	<i>443</i>
<i>III7.2. Quantificação mRNA dos Marcadores de ciclo celular por PCR em tempo real.</i>	<i>443</i>

<i>III.8. Análise da Expressão de Retrolyc1</i>	45
<i>III.8.1 Extração do RNA</i>	45
<i>III.8.2. Análise da expressão de Retrolyc1A em Lycopersicon por Northern Blot</i>	46
<i>III.8.3. Análise da expressão de Retrolyc1A em Lycopersicon por Slot Blot</i>	47
<i>III.8.4. Preparação da sonda</i>	477
<i>III.8.5 Hibridação, lavagem e exposição da Membrana</i>	498
<i>IV. Resultados</i>	51
<i>IV.1. Clonagem da região promotora de Retrolyc1B no vetor binário PHGWFS7</i>	51
<i>IV.2. Transformação permanente da linhagem celular Bright Yellow 2</i>	563
<i>IV.3. Análise da expressão da região promotora de Retrolyc1</i>	565
<i>IV.3.1 Auxinas</i>	57
<i>IV.3.3. Estresse biótico e abiótico</i>	59
<i>IV.3.4. Modulação ao longo do ciclo celular</i>	621
<i>IV.4. Análise da expressão de Retrolyc1 em mutantes hormonais de tomateiro variedade Micro-Tom</i>	66
<i>V. Discussão</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>VI. Conclusão</i>	80
<i>VII. Resumo</i>	Error! Bookmark not defined.1
<i>VIII. Abstract</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>IX. Referências Bibliográficas</i>	Error! Bookmark not defined.3

I. Introdução

1.1-Elementos de Transposição.

Os elementos genéticos móveis são segmentos de DNA que codificam enzimas e outras proteínas que facilitam o seu próprio movimento dentro de um mesmo genoma (mobilidade intracelular) ou no genoma de indivíduos diferentes (mobilidade intercelular). São considerados elementos genéticos móveis intercelulares os vírus, plasmídeos e a região T de *Agrobacteria*. Já os elementos com mobilidade intracelular definem o conjunto dos elementos de transposição (TE, de “transponible element”, em inglês).

A caracterização genética dos TEs iniciou-se na década de 40, com os trabalhos de citogenética em milho desenvolvidos por Bárbara McClintock (McClintock B, 1956). McClintock demonstrou a existência de fatores capazes de se mover e influenciar a expressão de genes, um conceito que questionava o pensamento da comunidade científica da época, que associava a instabilidade genômica com mutações deletérias ao organismo. Somente após a caracterização da existência de seqüências genéticas móveis em bactérias e leveduras na década de 60, em *Drosophila* na década de 1970, e finalmente no homem, na década de 80, que o impacto do seu trabalho foi plenamente compreendido. O reconhecimento final ocorreu em 1983, quando McClintock ganhou o prêmio Nobel pela caracterização dos elementos transponíveis no genoma do milho.

Os elementos transponíveis podem mover-se no genoma de um organismo através de intermediários de RNA ou através de DNA. A classificação desses elementos é feita de acordo com o intermediário do processo de mobilização, sendo definidos como retrotransposons ou elementos da classe I aqueles que possuem intermediários de RNA e como pertencentes à classe II ou transposons aqueles cujos intermediários são

moléculas de DNA. O mecanismo de transposição da classe I é comumente denominado de replicativo ou copia-cola, no qual o sítio doador do transcrito é preservado e somente a cópia gerada é que se insere em uma nova posição dentro do genoma. Já os elementos da classe II geralmente utilizam o mecanismo recorta-cola, em que ocorre a excisão do elemento de um local do genoma e seguido pela sua inserção em nova posição genômica. É importante ressaltar que embora o mecanismo mais comum aos transposons seja recorta-cola, estes também podem apresentar uma transposição replicativa.

Os elementos replicativos apresentam como consequência do seu modo de transposição o aumento do tamanho do genoma hospedeiro (Kldwell *et al.* , 2000) (Feschotte C , 2002) . O seqüenciamento de vários genomas evidenciou que os TEs são o componente majoritário dos genomas de eucariotos, compondo pelo menos 45% do genoma humano (Kumar *et al* , 1999) e de 50 a 80% dos genomas em algumas gramíneas (San Miguel *et al* , 1998) (Vicient *et al* , 1999)

Devido esta abundância e evidente diversidade e a dificuldade de nomeá-los nos projetos genomas Wicker e colaboradores propuseram em Dezembro de 2007 um sistema unificado de nomenclatura dos elementos de transposição em eucariotos. Este sistema pretende integrar conceitos anteriormente adotados e inclui níveis de classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília.

Desta forma os elementos da classe II foram divididos em 2 subclasses que diferem entre si pelo número de fitas de DNA que são cortados durante a transposição. Incluem na subclasse I os transposons flanqueados por TIRs (TIRs, de “terminal inverted repeat” em inglês) e o pouco conhecido elemento *Crypton*, descrito somente em fungos até o momento (Goodwin T , 2003) . Os elementos da subclasse II abrangem a ordem *Helitron* e *Maverick*, estes

TEs apesar de serem considerados transposons utilizam mecanismo de transposição replicativo do tipo copia-cola (Wicker et al, 2007). Já os elementos de classe I foram separados em 5 ordens que são diferenciadas pelo mecanismo de transposição, pela organização dos domínios da região codificadora e nas enzimas associada ao processo (Fig1).

Figura1. Classificação dos Elementos de transposição. Nova proposta de classificação hierárquica dos Elementos de Transposição em classe, subclasse, ordem e superfamília. São expostas as ordens de cada classe e apenas alguns exemplos de superfamília. DIRS- “*Dictyoatellium* intermediate repeat sequence”. LINE – “Long interspersed nuclear element”. SINE – “Short interspersed nuclear

element”. PLE – “Penelope-like element”. TIR – “terminal inverted repeat”. LTR – “Long terminal repeat”.

Os retroelementos que portam LTR (LTR , de “Long Terminal Repeat” em inglês) são os TEs mais representados no genoma nuclear das plantas. Já a região codificante carrega dois quadros abertos de leitura (ORF). O primeiro codifica uma proteína Gag semelhante ao capsídeo protéico viral, que contém um ou mais motivos ricos em cisteína associados com os sítios de ligação de ácidos nucleicos. O segundo codifica para uma poliproteína (POL) com atividade de protease (PROT), envolvida na maturação de diferentes proteínas: Transcriptase reversa (RT), codificando a enzima responsável pela síntese da cópia de DNA da fita molde de RNA; Integrase (INT), codificando proteínas necessárias para a integração da cópia de DNA no genoma hospedeiro e a RNase H (RH), também envolvida na transcrição reversa (Fig2).

As LTRs flanqueiam a região codificadora do elemento, sendo estas divididas em 3 regiões U3, R e U5. Elas podem ser funcionalmente definidas como elementos promotores e terminadores da transcrição, pois o mRNA inicia-se na região R da LTR 5’ e termina na região R da LTR 3’. (Fig. 3).

Após a LTR 5’, encontra-se o sítio de ligação do iniciador ou PBS (PBS de “Primer binding site” em inglês), similar ao tRNA da metionina. A síntese da primeira fita de DNA normalmente é iniciada utilizando o tRNA do hospedeiro. Antes da LTR3’, encontra-se uma seqüência de polipurinas ou PPT (PPT de “Polipurine tract” em inglês), sítio do iniciador responsável pelo início da síntese da segunda fita (Fig.2). (Kumar A , 1999)

Figura 2. Esquema geral de um retrotransposon com LTR da superfamília Copia. U3,R e U5: regiões que contém sinais de termino e início de transcrição. PBS (“Primer binding site”): sitio de ligação do iniciador. PPT (“Polypurine tract”):

sequencia de polipurinas. **GAG**: codifica proteínas estruturais do capsídeo. **Pol**: poliproteína que contém **PROT** (protease), **INT** (integrase), **RT**(Transcriptase reversa) e **RH** (RNase H).

1.2-Ciclo de transposição de Retrotransposon com LTR

É proposto que o ciclo de transposição de um retrotransposon com LTR seja similar ao ciclo de vida dos retrovírus. Há inicialmente a transcrição e expressão dos genes necessários para a mobilização, a posterior captura do mRNA no capsídeo viral, seguido pela transcrição reversa, reentrada no núcleo e reconhecimento do sítio alvo para a integração. Apesar das semelhanças das estratégias destes elementos há diferenças entre os mecanismos adotados, sendo a principal delas a ausência da fase extracelular por parte dos retrotransposons para completar o ciclo de transposição. Desse modo os retrotransposon não são infecciosos.

O ciclo de transposição envolve primeiramente a transcrição do elemento pela RNA polimerase II celular que reconhece o promotor localizado na região U3 da LTR posicionada a 5' do elemento. Parte destas moléculas transcritas é traduzida em proteínas Gag (proteínas semelhante ao capsídeo viral protéico) e Pol (poliproteína). A maturação da proteína Pol é catalizada pelo seu domínio de protease (PROT), que gera as demais enzimas necessárias para completar o ciclo de transposição, a saber, integrase (INT), transcriptase reversa (RT) e RNase H (RH).

A região PBS do mRNA é complementar a porção 3' de um tRNA do hospedeiro, a RT utiliza este tRNA como iniciador para sintetizar o cDNA que complementa as regiões U3, R e U5 da LTR 5'. A RNase H digere este RNA do híbrido RNA::DNA, liberando o DNA fita simples. A hibridação do cDNA à porção 3'LTR do RNA permite que a transcrição reversa continue até que seja sintetizado um DNA simples fita inteiramente complementar ao mRNA. Desta forma a RT faz uma cópia de cDNA a partir do mRNA (Kumar A , 1999) .

Para a síntese da segunda fita de DNA é necessária a atuação novamente da RNaseH que digere o RNA híbrido. Prossegue-se então a síntese da segunda fita de DNA, tendo a primeira fita o molde. O DNA dupla fita é então, finalmente, inserido em uma nova localização no genoma hospedeiro pela integrase (Fig3).

Figura 3. Mecanismo de replicação de um retrotransposon com LTR. RNA (linha preta simples), DNA recém sintetizado (linha vermelha), DNA genômico (linha preta dupla), Proteína integrase (estrutura oval), LTR (caixa cinza), região R da LTR (caixa preta), tRNA utilizado como iniciador (indicado na seta cinza cheia).

1.3-Função dos elementos de transposição.

No início da sua descoberta os elementos de transposição foram relegados a mera curiosidade, mais tarde foi interpretada como DNA lixo ou seqüências repetitivas egoístas (Orgel , 1980). Atualmente, no entanto,

sabe-se que TEs são os elementos mais abundantes do genoma dos eucariotos (Kumar A , 1999) .

Ainda na década de 50 a própria McClintock associou os TEs à alteração da informação genética, denominando estes elementos como controladores. Analisando cromossomos de milho ela chegou a conclusão que os elementos transponíveis poderiam reestruturar o genoma atuando nos rearranjos cromossômicos. Podem também influenciar a formação de novos alelos pela inserção em algum gene ou na vizinhança do mesmo alterando a sua expressão. Esta análise feita no meio do século passado antecipou a visão que temos atualmente em relação aos TEs, que são interpretados como essenciais na evolução do genoma eucariótico. Entre as funções associadas ao TEs estão: inserções, deleções, duplicações e inversões cromossômicas; regulação epigenética do genoma hospedeiro, além de serem importantes fontes de variabilidade genética (Vitte C , 2006) .

Impacto no tamanho dos genomas.

O retrotransposon pode alterar significativamente o tamanho do genoma hospedeiro, seja atuando na sua amplificação já que o ciclo de transposição é replicativo, ou agindo na diminuição deste por eventos de recombinação homóloga.

O aumento do tamanho do genoma devido à atividade de retroelementos é exemplificado na análise do genoma de *Oryza australiensis*. Em que o tamanho duas vezes maior em relação a outras espécies de arroz é devido a presença significativa dos retroelementos *Kangouru*, *Wallabi* e *RIRE1*, cuja atividade foi induzida posteriormente a especiação dessas espécies (Piegu B , 2006) .

Não são apenas os elementos da classe I que atuam no aumento dos genomas, os elementos que se movem diretamente via DNA, ou de classe II

também contribuem substancialmente na expansão de genomas do hospedeiro. Um exemplo recentemente descrito é o de *Trichomonas vaginalis* que possui cerca de 65% do genoma composto por transposons (Carlton *et al*, 2007). Há também uma porcentagem alta em *C.elegans*, *Entamoeba invadens* e em *Anapholes gambiae* (Feschotte C , 2007) .

O impacto dos TEs não se restringe apenas ao aumento do genoma hospedeiro, eles atuam também na remoção do material genético por rearranjo. Este processo pode ser dividido em recombinação homóloga intraelementos, recombinação homóloga interelementos e recombinação ilegítima (Fig. 4). Na recombinação homóloga intraelementos ocorre entre as LTR de um mesmo retrotransposon que freqüentemente gera uma única solo LTRs (Fig 4A.). Já a recombinação interelementos ocorre entre retrotransposon homólogos inseridos em diferentes locais no genoma. Este tipo de recombinação pode levar a deleções do material nuclear, inversões e translocações recíprocas (Devos KM , 2002) . Apesar de ambos os processos serem importantes na dinâmica evolutiva dos genomas, a principal força motriz que induz a redução do material genético é a recombinação ilegítima. Ainda não está claro o mecanismo primário utilizado neste processo, observa-se como o resultado final pequena deleções (Vitte C , 2006) .

Em relação à estrutura genômica, observa-se que em alguns organismos eucariontes existem muito TEs associados em regiões de heterocromatina como centrômeros, telômeros e *knobs*. Estas observações sugerem que estes retrotransposons podem ter adquirido uma função estrutural e/ou funcional nestas regiões (Kumar & Bennetzen, 1999).

Figura 4. Rearranjo cromossômico entre Retrotransposon LTR. (A) Recombinação intraelemento que resulta num solo LTR. **(B a D)** Recombinação homóloga interelementos: **(B)** Recombinação desigual entre duas LTRs. **(C)** elemento “completo” sem duplicação do sítio alvo resultante da recombinação desigual entre duas 5’LTR ou duas 3’ LTR de dois elementos adjacentes. **(D)** Solo LTR sem duplicação do sítio alvo resultante da recombinação desigual entre 3’ e 5’ LTR de dois elementos. Adaptado de (Devos KM , 2002)

Domesticação de elementos transponíveis.

TEs podem ser capturados pela maquinaria celular e dar origem a novos genes ao hospedeiro, quando isso ocorre classificamos esta nova sequência como um elemento domesticado. Muitos são os exemplos de genes do hospedeiro derivado de TEs, sendo eles encontrados em quase todos os eucariotos (Volff *et al* , 2006) .

O exemplo mais bem estudado de TEs da classe II domesticado é o gene responsável pela ativação da recombinação V(D)J, *rag1*, necessário para originar a região variável do receptor das células T/B e das imunoglobulinas (Zhou L , 2004) . Em plantas temos o exemplo do gene DAYSLEEPER encontrado em *Arabidopsis thaliana* que é originado de uma transposase da família *hAT*. Este gene codifica uma proteína envolvida na regulação de muitos genes incluindo a expressão do gene de reparo *Ku70*. O silenciamento

ou a superexpressão de DAYSLEEPER leva a drásticas alterações no crescimento e no desenvolvimento da planta (Bundock et al , 2005) .

Em mamíferos podemos citar como exemplos de transposases domesticadas P52rIPK envolvida na regulação da proteína serino/treonina induzida por interferon (Smit AF , 1999) e o gene “jerky” que codifica uma proteína cerebral envolvida na epilepsia de humanos em camundongos (Toth M , 1995) . Em *Drosophila* há o fator de transcrição Dref e em *Caenorhabditis elegans* o regulador do desenvolvimento vulval Lin-15B (Smit AF , 1999) .

Para os elementos de classe I há diversos genes originados a partir de diferentes domínios encontrados na região codificadora. A transcriptase reversa de um retrotransposon sem LTR que provavelmente deu origem a Telomerase, enzima responsável pela manutenção da integridade dos telômeros durante a replicação do material genético (Eickbush TH , 1997) . Já o domínio *gag* de um retrotransposon com LTR, filogeneticamente próximo aos elementos da família *Sushi*, deu origem a uma família multigênica identificada coletivamente *Mart* encontrada no genoma dos mamíferos placentários (Volff JN , 2006) .

Estes múltiplos exemplos de genes derivados de TEs no genoma de diversos eucariotos evidenciam a importância dos elementos móveis como reserva de material genético para o surgimento de novos genes ao longo da evolução.

Impacto dos TEs na expressão gênica.

Os Elementos de Transposição devido a sua mobilidade podem ainda afetar o padrão de expressão gênica de um organismo. Se um TE se inserir

dentro ou próximo de genes pode acarretar a inativação ou alteração da regulação gênica, mudança no processamento do RNA e no processo de embaralhamento de exons. O resultado final da atividade destes elementos pode levar a mudanças temporais e espaciais do padrão da expressão gênica do hospedeiro e até a geração de novos genes (Feschotte, 2007).

1.4- Retrotransposon *Tnt1*.

A grande maioria dos retrotransposons presentes no genoma vegetal é do tipo LTR Ty1-Copia, dentre estes o mais bem caracterizado é o retroelemento *Tnt1*. *Tnt1* foi isolado do genoma de tabaco (*Nicotiana tabacum*) após sua inserção no gene estrutural *nitrato redutase* (NR), sendo este retrotransposon um de poucos elementos com atividade transposicional demonstrada em plantas (Grandbastien *et al.* 1989).

As seqüências semelhantes a *Tnt1* foram detectadas em diversas espécies em *Solanaceae*. Em Batata foi descrito o retroelemento Retrosol (Manetti, 2007) e em tomate os elementos *Tlc1* e *Retrolyc1*. Em *Nicotiana tabacum* foram descritos pelo menos três grupos principais de elementos relacionados à *Tnt1* são eles: *Tnt1A*, *Tnt1B* e *Tnt1C* (Casacuberta *et al.* 1993; Grandbastien *et al.* 2005) (Fig 5).

Figura 5. Comparação entre o retrotransposon *Tnt1* e *Retrolyc1*. As subfamílias de *Tnt1* estão representadas fora da caixa. *Tnt1A* apresenta os motivos repetidos presente na região U3 em azul claro, *Tnt1B* possui a região U3 em verde, e *Tnt1C* em amarelo. Já *Retrolyc1* encontra-se destacado no interior da caixa transparente,

sebo a subfamília A representada em verde (com motivos repetidos) e a subfamília B representada em Pink. Modificados de Grandbastien et al, 2005.

A diferença entre estes subgrupos encontra-se na região regulatória U3 o que reflete a diferentes padrões de expressão. Tnt1A é expresso em folhas lesionadas, atacadas por patógenos, tratadas com eliciadores e tratadas com jasmonato de metila (Pouteau *et al* 1994), (Vernhetter *et al* 1997), (Beguiristain *et al* 2001). No caso de Tnt1B a expressão é induzida em cultura de células, enquanto que em Tnt1C a expressão é ativada por ácido salicílico e por auxinas (Beguiristain *et al.* 2001).

Há outros elementos em plantas que apresentam o padrão de expressão alterado após os tratamentos com fatores envolvidos em estresse, como *Tto1* em tabaco (Pouteau et al, 1991, 1994; Hiroshika, 1993; Moreau-Mhiri et al, 1996; Grandbastien et al, 1997), *Tos* em arroz (Hirochika et al, 1996), BARE-1 em cevada (Kalendar et al, 2000) e Retrolyc1 em tomateiro (Hashimoto-Miura, 2004).

1.5-Retrolyc 1

Retrolyc1 é um retrotransposon isolado de uma biblioteca genômica de *L.peruvianum* (*Solanaceae*). Este elemento possui ao longo de quase toda a sua seqüência alta porcentagem de identidade em nucleotídeos com o retrotransposon Tnt1, com exceção apenas da região U3 (Costa *et al.*, 1999) (Fig.5.).

A análise da região U3 de Retrolyc1 indicou que as seqüências deste elemento poderiam agrupá-lo em 2 subgrupos, Retrolyc1A e Retrolyc1B (Araújo *et al.*, 2001). O subgrupo A apresenta motivos repetidos de 57pb na região U3, sendo descrito regiões com dois, três e quatro Motivos Repetidos (MR), já Retrolyc1B não apresenta MR na região U3 (Fig.5). Estes elementos estão presentes em diferentes graus de abundância em diferentes genomas

de *Lycopersicon* (Fig.6.) o que sugere que ambos sejam ativos (Vernhettes S , 1998) .

Figura 6. Distribuição de Retrolyc1A e Retrolyc1B em genomas de *Lycopersicon*. **A** Hibridação de *Southern blot*. DNA de diferentes genomas de *Lycopersicon* (Lp- *Lycopersicon peruvianum*, Lh- *Lycopersicon hirsutum*, Lpp- *Lycopersicon pimpinellifolium*, Le – *Lycopersicon esculentum*) foram digeridos com a enzima EcoRI (6µg por coluna). **B** Diagrama das sondas utilizadas, as setas indicam os limites das sondas. Nt *Nicotiana tabacum*.

Em 2004, Hashimoto-Miura estudou a expressão de Retrolyc1A em *Lycopersicon esculentum* e em *Lycopersicon peruvianum*. Ela demonstrou que a atividade transcricional deste elemento é alterada após o tecido ser lesionado e após o tratamento com ácido salicílico. Além da ativação por estresse mencionado acima, Retrolyc1A também possui a sua atividade

modulada ao longo do desenvolvimento (Fig.7). Plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* apresentam atividade da região promotora U3 de Retrolyc1A (U3A) em diferentes tecidos em plântulas com 7, 9, 14, 18 e 37 dias; além de apresentarem atividade em tecidos reprodutivos de fumo (Fig.7).

Figura 7. Perfil de atividade da região promotora U3 de Retrolyc1A ao longo desenvolvimento de fumo. Plantas transgênicas de fumo contendo a região U3 de Retrolyc1A (U3A) fusionada ao gene repórter *gus* com 7, 9, 14, 18 e 37 dias após a germinação da semente. Detalhe para a presença de atividade de U3A também nos tecidos reprodutivos de fumo transgênico. À esquerda diagrama da construção analisada, caixa cinza corresponde à região U3A, caixa preta - motivos repetidos, caixa sem coloração – gene repórter *gus*, linha preta TATA – corresponde ao domínio TATA Box. Flor- aumento de 10X.

Contudo, os dados gerados até o momento foram referentes somente à Retrolyc1A. O presente trabalho analisou o perfil de expressão de Retrolyc1 subgrupo B comparando-o com o perfil de Retrolyc1A. O estudo foi feito tanto em suspensão celular de fumo transformada com a região promotora de Retrolyc1B fusionada aos genes repórteres *gus* e *gfp*, quanto em tomateiro não transformado.

II Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral demonstrar a atividade transcricional de Retrolyc1 A e B em tomateiro, mutantes hormonais em background Micro-Tom e em suspensão celular de fumo. Para efetuar esta análise efetuamos as seguintes etapas:

- 1- Clonagem da região promotora de Retrolyc1B no vetor binário PHGWFS7.
- 2- Obtenção de linhagens celulares modificadas.
- 3- Análise da expressão da região promotora de Retrolyc1 na suspensão celular de fumo.
- 4- Análise da expressão de Retrolyc1 em mutantes hormonais de tomateiro variedade Micro-Tom.

III Materiais e Métodos

III.1. Material Botânico

Células de fumo BY2 em suspensão cujas matrizes foram cedidas pelo prof^o Dr^o Vitor Vitorello, CENA-ESALQ/USP e plantas de *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme, *L.peruvianum* var. CNPH 942 (GaTE-Lab), *L.esculentum* var. Micro-Tom, *L.esculentum* var. Micro-Tom cedidos pelo prof^oLázaro Eustáquio Pereira Perez ESALQ/USP. Todo material vegetal utilizado foi mantido no laboratório a temperatura de aproximadamente 28°C e fotoperíodo de 12horas.

III 2. Plasmídeos

Figura 8. Mapa do plasmídeo pDONR™221. Plasmideo utilizado para o primeiro passo da clonagem utilizando o sistema Gateway-Invitrogen®.

Figura 9. Mapa do plasmídeo pHGWFS7. Plasmideo utilizado para o segundo passo da clonagem utilizando sistema Gateway-Invitrogen®.

Tabela I. Descrição dos vetores. Descrição de outros vetores utilizados neste trabalho.

Vetores	Marca de resistência em bactéria	Marca de resistência em plantas	Características	Fonte
pcU3A2MR	Clorofenicol	Higromicina	pCAMBIA 1291Z contendo a região U3A com 2MR	Cedido por Regina Y. Hashimoto-Miura
pcU3A3MR	Clorofenicol	Higromicina	pCAMBIA 1200 contendo a região U3A com 3MR	Cedido por Regina Y. Hashimoto-Miura
pCAMBIA 1291Z +35S	Clorofenicol	Higromicina	pCAMBIA 1291Z contendo o promotor 35S	Cedido por Regina Y. Hashimoto-Miura

III 3. Meios de Cultura

III3.1 Escherichia coli

As cepas DH5 α foram mantidas e repicadas em meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al* , 1989) ou SOC , e quando transfectadas com algum plasmídeo, em meio com antibiótico seletivo

LB:

Bactotripton	1% (wt/v)
Extrato de Levedura	0,5% (wt/v)
NaCl	0,5% (wt/v)

pH 7,5 (ajustado com NaOH 10N)

SOC:

Tripton	20g/L
Extrato de Levedura	5g/L
NaCl	0,5g/L
KCl 250mM	10ml
MgSO ₄ 2M	5 ml
Glicose 1M	20ml

Ajustar o pH 7,0 com NaOH .

O meio foi mantido a 120°C durante 15 minutos. Para culturas sólidas foram acrescentados 20g/L de ágar.

III 3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Utilizamos a cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Esta repicada em meio AT rico e em YEB.

<i>Meio AT rico:</i>	Manitol	0,2%
	Sulfato de amônia	0,2%
	Extrato de levedura	0,5%
	AT 2X	1X

As soluções de manitol e sulfato de amônia foram filtradas em filtro 0,45 µm, e o extrato de levedura e o AT 2X foram previamente mantido a 120°C durante 15 minutos.

<i>AT 2X:</i>	KH ₂ PO ₄	21,8g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,32g/L
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g/L
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,004g/L
	pH 7,5 (ajustado com KOH 6N)	

<i>Meio YEB:</i>	Extrato de Carne	5g/L
	Extrato de levedura	1g/L
	Peptona	5g/L
	Sacarose	5g/L
	MgSO ₄	240mg/L
	Ajustar o pH 6,8 com NaOH 0,1N	

Completar o volume para 1L com água deionizada. Para as culturas sólidas foram acrescentadas 15g/L de Agar.

III. 3.3 Plantas

Para a germinação de sementes de *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* utilizamos o meio MS descrito por Murashige e Skoog (1962) com a metade da concentração dos macronutrientes descrita e 20g/L de sacarose (MS ½ 20).

Meio ½ 20:

Macronutrientes MS (11154-028-Gibco BRL)	½ X
Micronutrientes MS (11155-025-Gibco BRL)	1 X
Vitaminas Nitsch	2 mL/L
Sacarose	20g/L

O pH foi ajustado com KOH 6N. Para as culturas sólidas foram acrescentados 6,5 g/L de fitoagar. O meio foi mantido a 120°C pressão 1 atm, durante 15 minutos.

Para cultura celular de BY2 utilizamos:

MS 30:

Sais do MS (M-5524 – Sigma)	4,3g/L
MES Monohidratado(USB 18886.100GM)	500mg/L
Sacarose	30g/L
B1-Inositol*	10 ml/L
Vitamina Millers*	3ml/L
2,4D 10mM (dissolvido em etanol absoluto)	100 ul

Ajustar o pH 5,7 com KOH 1N

Completar o volume para 1 L com água deionizada. Para meio sólido acrescentamos 6g/L de fitoagar.

* B1-Inositol: Tiamina (Synth V1012.02.AD) 0,1g/L, Mioinositol (Synth I1001.01.AE) 10g/L (solução estoque)

* Vitamina Millers: KH_2PO_4 6% (wt/v)

As células foram mantidas em meio sólido e em suspensão celular. A cultura sólida exigiu que uma parte das células fosse colocada em novo meio de cultura a cada 25 dias, aproximadamente, sendo mantida no escuro na temperatura da sala. Já manutenção da suspensão celular foi feita a cada 7 dias, sendo transferido cerca de 2ml da cultura saturada para 50ml de meio de cultura novo, em Erlemeyers de 250ml, sendo mantida também no escuro a 28°C e com agitação constante (130rpm).

III 4. Clonagem do promotor do retrotransposon Retrolyc1B

A construção do vetor de expressão contendo o promotor de Retrolyc1B foi clonado utilizando o sistema Gateway® Invitrogen. O processo de clonagem é dependente de recombinação homóloga e tem sido empregado com sucesso no processo de transformação de vegetais superiores (Curtis & Grossniklaus, 2003). O sistema utiliza dois vetores, o primeiro o vetor doador (pDNORtm221) e segundo chamado vetor de destino. Para a inserção do fragmento desejado no primeiro vetor há necessidade que a sequência seja flanqueada pelos sítios de recombinação, para isso utilizamos 2 conjuntos de iniciadores. O primeiro, U3BR-gate e U3BF-gate, (Tabela II) possuem uma parte da sequência específica para a região promotora U3 e outra parte que contém o começo da região de recombinação. Já o segundo par de iniciadores, AttB1.2 e AttB2.2, (Tabela II), ancora no início da sequência de recombinação e é usado para completar o sítio de recombinação. A enzima ClonaseBR® é a responsável por iniciar a reação que resulta na inserção do fragmento no vetor doador. Após este

passo uma segunda etapa enzima ClonaseLR® é utilizada para a inserção do fragmento no vetor de destino (pHGWS7).

Todos os passos foram feitos segundo as instruções do fabricante. O vetor de expressão escolhido pHGWS7, possui tanto o gene repórter *gus* quanto *gfp* (Fig7). A clonagem resultou na região promotora U3 de Retrolyc1B fusionado a jusante de ambos os genes repórteres.

III 4.1 Amplificação do fragmento por PCR

Tabela II. Seqüência de iniciadores utilizados neste trabalho.

	Nome dos iniciadores	Seqüência
Iniciadores utilizados durante a clonagem da região U3 de Retrolyc1B	U3BF-gate:	TACAAAAAAGCAGGCTTCACAAGATTGTGGAGTCCATAC
	U3BR-gate:	CAAGAAAGCTGGGTGGTGTATTTTGAATGAGCAAGAG
	AttB1.1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	AttB2.2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
Iniciadores para o gene construtivo RPL2 de tomate	RPL2 F:	CAGCGGATGTCGTGCTATGAT
	RPL2 R:	GGGATGCTCCACTGGATTCA
Iniciadores para o gene que codifica a ciclina D3.	NtCyc D3 F	CAGCAAATGAAATTGGCATC
	NtCyc D3 R	TGAGGACTACCAACAGCTTCC
Iniciadores para o gene que codifica a proteína β -glucuronidase.	GUS A	CCTTACGCTGAAGAGATGCT
	GUSB	GGCAATACTCCACATCACCA

Utilizamos o par de iniciadores U3BF-gate x U3BR-gate (Tabela II), cada iniciador foi desenhado para conter parte da seqüência de recombinação homologa e a região que associa à seqüência do promotor Retrolyc1B. Programa utilizando no termociclador: 94°C por 10min. Seguido por um ciclo de 40 vezes de 94°C (1min), 58°C(1min) e 72°C(30seg). Temperatura de extensão de 72°C (10min) e 04°C(∞).

Uma segunda reação de PCR foi feita para completar a seqüência de recombinação homologa utilizando os o par de iniciadores AttB1.2 x AttB2.2 (Tabela 2). Programa do termociclador: 94°C (10min). Seguido por 40 ciclos de 94°C(1min), 55°C(1min) e 72°C(30seg). Temperatura de extensão de 12°C (10min) e 04°C(∞)

Para purificar o produto amplificado por PCR acrescentamos 50 µl da reação a 50 µl da solução 20% PEG8000. A solução depois de homogeneizada foi deixada a 37°C por 15 minutos, seguida de centrifugação a 22000g de 20 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 50 µl de água destilada.

20%PEG8000:	PoliEtilenoGlicol 8000	0,2g/ml
	NaCl	0,143 g/ml

III 4.2. Transformação de bactéria

A transferência da região promotora do retrotransposon Retrolyc1B para o vetor doador –pDONR- foi feito conforme descreve o fabricante. Para a transformação da cepa DH5α de *Echerichia coli* foi utilizado bactérias choque térmico competente (Sambrook et al., 1988). Alíquotas de 50µl de bactérias competentes, estocadas no freezer à -70°C, foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Em cada alíquota foram adicionados 1 µl de ligação dos plasmídeos contendo o inserto. Após 30 minutos no gelo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico à 42°C por 2 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 3 minutos. Após a adição de 950 µl de meio SOC, as bactérias foram incubadas a 37°C por 40 minutos. Em seguida espalhadas em placas com meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção. As colônias que foram capazes de crescer após cerca de 16 horas a 37 °C foram submetidas a uma reação de PCR a partir de colônia, utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos U3BF-gate x U3BR-gate e o programa descrito anteriormente. Após a confirmação da amplificação do produto desejado as bactérias são colocadas para crescer em 3ml de meio LB em

agitação de 288 RPM por cerca de 16 horas, seguidas do isolamento dos plasmídeos.

III 4.3. Isolamento do plasmídeo em pequena escala.

Soluções :

P1:	Tris-HCl*	50mM pH 8,0
	EDTA*	10mM pH 8,0
	RNase*	100 µl/ml
P2:	NaOH	200mM
	SDS	1% (w/v)
P3:	KOAc	3M pH5,5 (pH ajustado com Ac. Acético Glacial)

Tris-HCl* - 50mM pH 8,0: Tris 65,5g/L (ajustar pH 8,0 com HCl concentrado)

EDTA* - 10mM pH 8,0: Na₂.EDTA.2H₂O 186,1g/L (ajustar pH 8,0 com NaOH)

RNase*: Ribonuclease A 10 mg/ml em solução Tris 10mM (pH 7,5) e NaCl 15 mM. Após dissolver a ribonuclease A solução foi mantida à 100°C durante 15 min. e resfriada lentamente à temperatura ambiente, alíquotas foram mantidas à -20°C

Uma colônia bacteriana contendo o plasmídeo foi inoculada em 3 ml de meio LB líquido com o antibiótico seletivo, as bactérias foram incubadas à 37°C com agitação de 288 RPM por 16 horas. A cultura celular foi transferida para tubos Eppendorfs de 1,5 ml e sedimentadas por centrifugação a 11200 g por 2 min. e o sobrenadante descartado. As bactérias foram ressuspensas em 150 µl de solução P1 com agitação vigorosa. A solução P2 foi acrescentada e misturada por inversão suave. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos, seguida pela adição da solução P3 e agitação suave. Os tubos foram centrifugados à 22000g durante 10 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi coletado com cuidado e transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado pela adição de cerca de 400 µl de isopropanol gelado, os tubos foram então novamente centrifugados a 22000g durante 10 minutos, porém à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1ml etanol 70%. DNA foi seco 15 minutos à 37°C ou sobre a bancada por 1 hora e, posteriormente, ressuspensos a 50 µl em água deionizada. O DNA extraído foi mantido em -20°C.

III 4.4. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Soluções:

Tampão HEPES	1M	pH 7,0 (ajustado com solução de KOH 1N)
	(ac. N-2hidroxiethylpirazine-N'-2-etanosulfônico)	

Glicerol	10%	filtrado
----------	-----	----------

Uma colônia inoculada em 3 ml de meio AT rico ou YEB contendo sacarose no lugar do manitol e antibióticos. Após a incubação a 28°C com agitação 180 RPM por 16 a 24 horas (DO 600 entre 0,5 e 1) a cultura foi transferida para dois tubos Eppendorfs de 1,5 ml, mantendo-se deste ponto em diante todo o material e soluções gelados. Os tubos foram centrifugados 16000g por 1 minuto. As células precipitadas foram ressuspensas em 500 µl de HEPES 1 mM e centrifugadas a 16000g por 1 minuto novamente. Este processo de ressuspender e centrifugar foram repetidos 2 vezes. Após a última centrifugação o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 500 µl de solução glicerol 10%. Após mais uma centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto, as bactérias foram ressuspensas em 20 µl de glicerol 10% e então, juntaram-se os conteúdos dos dois tubos.

Adicionou-se ao tubo das bactérias 1µg do DNA plasmideal de interesse (1 a 2 µl) e incubou-se no gelo por 2 minutos. A suspensão foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm gelada, a qual foi posicionada no eletroporador (BioRad Gene Pulser- BIORAD) e então aplicado o pulso (para a cubeta de 0,2 cm o modelo “Gene Pulser” foi ajustado para uma capacitância de 25 µF e 2,5 kV de carga , e o “Pulse controler” para uma resistência de 400Ω– transformações bem sucedidas o tempo relativo de duração do pulso é de aproximadamente 9 milissegundos). Imediatamente após o pulso foi adicionado 1 ml de meio SOC, e a suspensão foi transferida para tubo Eppendorf e incubada a 28°C por 4 horas. A suspensão foi colocada em placa (100 µl) em meio AT rico ou YEB contendo os antibióticos Vancomicina (100 µl/ml), Carbenicilina (100µl/ml) e Higromicina (50µg/ml).

III. 4.5. Análise da expressão transiente em plantas por bombardeamento.

A expressão transiente do gene repórter *gus* sob controle da região U3B foi verificada em epiderme de *Allium cepa*, bombardeadas por partículas contendo o vetor binário PHGWFS7+U3B ou pCAMBIA 1291Z+35S (controle positivo) ou PHGWFS7 (controle negativo).

Para este experimento, utilizou-se DNA plasmideal extraído em média escala através do kit MiQIAfilter™ Plasmid Midi Kit (QIAGEN – Nº Cat 12243).

Soluções:

Glicerol	50%
CaCl ₂	2,5m
Espermidina livre de base	0,1M
Etanol	70%

Partículas de tungstênio (48mg, 1,1 μm de diâmetro, M17, Bio-Rad) foram lavadas 2 vezes em 1 ml de etanol absoluto e resuspendidas em 500 μl de glicerol 50%. Para cada vetor a ser bombardeado preparou-se um tubo de Eppendorf de 1,5 ml onde foram adicionadas 22,5 μl de partículas em suspensão mantidas sob agitação constante em vortex (Daigger Vortex Gene 2). Foram acrescentados 22,5 μl de uma solução de DNA contendo 2 μg do vetor de interesse, com tubo ainda em agitação constante. Em seguida, adicionando-se 37,5 μl de CaCl_2 e 15 μl de espermidina (“free base” –sigma) e deixado sob agitação constante por 5 minutos. Decorrido este tempo, estes tubos foram centrifugados por 5 minutos à temperatura ambiente para sedimentação destas partículas. O sobrenadante foi retirado e as partículas foram lavadas com 200 μl de etanol 70 % e resuspendidas em 25 μl de etanol absoluto. Alíquotas de 6 μl da solução etanol + DNA foi depositada em discos carregadores (disco de KaptonTM de 24 mm de diâmetro e 50 μm de espessura – DuPont). Os catafilos de *A. cepa* foram bombardeados com essas partículas sob vácuo de 27 polegadas de Hg (1 polegada = 2,5cm) com 1100 Ψ i após passagem pelos discos de ruptura (disco de KaptonTM de 13,2 mm – DuPont), utilizando o acelerador de partículas produzido pelo CENARGEN (Drº Elíbio Rech). Cada amostra foi bombardeada em duplicata. O material vegetal foi deixado no escuro e em temperatura ambiente por cerca de 24 horas e, em seguida, colocado no ensaio histoquímico.

III 4.5 Ensaio Histoquímico

O ensaio histoquímico é um método qualitativo, baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucoronídeo (X-Gluc) pela β -glucoronidase, expressa pelo gene *gus* presente nas construções (III.4) (Jefferson et al., 1987). O produto dessa reação, na presença de oxigênio, forma dímeros resultando em um precipitado insolúvel de cor azul.

Soluções:

Tampão de reação:	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	100mM
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10mM
	K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	0,5Mm
	Triton	0,1%
	pH 7,0 (ajustar o pH com NaOH e armazenar -20°C)	

X-GLuc:	X-Gluc	50mg/ml
	(Dissolvido em DMSO- dimetil formamida)	

O material vegetal bombardeado foi incubado no tampão de reação acrescido de X-Gluc (0,5 mg/ml), em um volume suficiente para cobrir a amostra, durante 24 horas a 37°C no escuro. Em seguida retirou-se o tampão e adicionou-se etanol 70% para interromper a reação.

III.5 Transformação da cultura celular Bright Yellow 2

Para a transformação 4ml de células 3 e/ou 4 dias após serem repicadas são co-cultivadas durante 3 dias, em placa de *petri* de 9cm de diâmetro, com a 50-100 µl bactéria contendo o plasmídeo com a construção de interesse. Para certificar que estamos utilizando a concentração ideal de bactérias, repicamos duas colônias: uma colônia deixada em 5 ml de meio YEB ou AT rico em tubos *Falcon* de 50ml em rotação 180 RPM 28°C por 2 dias e outra por 1 dia sob as mesmas condições que a anterior. Após o período de 3 dias de co-cultivo as células são passadas para meio de cultura MS30 contendo os antibióticos: Carbenicilina, Vancomicina para eliminar agrobacterias restantes e Higromicina para selecionar as células transformantes. Os controles para o antibiótico e viabilidade celular também foram feitos em paralelo.

Após aproximadamente 40 dias as células transformantes se destacam do restante do macerado celular permitindo o isolamento destes e a sua transferência para meio de cultura novo contendo ainda os antibióticos de seleção. Esta etapa foi feita com auxílio de palitos de dente estéreis. Após 40 dias um conjunto de células isoladas cresce no meio com antibióticos indicando a provável efetivação do evento de transformação nessas células. A massa celular é então passada para meio de cultura líquido mantendo os antibióticos. Após 7 dias, aproximadamente 2ml de cultura saturada é transferida para meio novo, após 5 a 6 passagens mantendo o antibiótico Higromicina a cultura celular é considerada homogênea para o evento de transformação.

III 5.1. Extração do DNA Vegetal

Soluções:

Tampão EB:	Tris	100mM pH 8,0
	EDTA	50mM, pH 8,0
	NaCl	500mM
	β -Mercaptoetanol	10 mM
SDS		20% wt/ml
KOAc		3M

A extração do DNA genômico foi realizada segundo a metodologia descrita por Dellaporta (1988).

O material vegetal foi pesado e embrulhado em papel alumínio e submerso em nitrogênio líquido. No caso de folhas, as nervuras principais foram eliminadas. Já para suspensão celular, as células foram filtradas a vácuo

utilizando filtro de 7 μ m de diâmetro. O material vegetal congelado foi macerado em nitrogênio líquido até obter-se um pó fino. Este foi transferido para tubos plásticos de 30 ml, sendo adicionado 15ml de tampão EB para cada 3-6 gramas de material vegetal pesado e 5ml para cada 1-2 gramas, misturando-se vigorosamente até este voltar à temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se 1ml da solução SDS 20%. Após homogeneização delicada do material, este foi mantido em banho-maria à 65°C por um período de 30 min.

Ao final foram adicionados 5ml de KOAc 3M e mantido no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma centrifugação à 10000rpm em por 30 minutos, para a separação das fases. A fase aquosa foi filtrada em papel Miracloth (Calbiochem) e transferida para um novo tubo com 10 ml de isopropanol. Após ter sido homogeneizado, o DNA foi “pescado” com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada. O DNA foi ressuspenso em 250 μ l de água milliQ.

III 6. Análise da atividade da região promotora de Retrolyc1B.

Suspensão celular de fumo transgênica e a não transgênica foram submetidas a tratamento de estresse biótico e abiótico.

III 6.1. Tratamento Celulase

Para o tratamento com a celulase cerca de 10 ml de cultura celular saturada foi centrifugada a 4000g durante 5 minutos à temperatura ambiente (utilizando freio atenuado a fim de não perturbar o precipitado celular). As células foram então ressuspendidas em meio MS 30 acrescido de 0,5% wt/v (concentração final) de celulase RS ONOZUKA 16420 e mantidas sem agitação em 28°C. Foram retiradas alíquotas em tempos distintos entre 30 minutos-24horas. O controle foi feito utilizando suspensão celular sem celulase.

III 6.2. Tratamento com Salicilato de Sódio

O tratamento com o elicitor salicilato de sódio foi realizado adicionando-se 2mM (concentração final) do sal em 20ml de cultura celular saturada. A suspensão foi incubada sob agitação 100 RPM e 28°C e diferentes alíquotas foram retiradas entre 30 minutos a 24 horas de incubação. Para o controle as mesmas condições foram repetidas, mas adicionando-se água destilada no lugar da solução salina.

III 6.3. Tratamento com 2,4D

Para o tratamento com 2,4D foram colocados em alíquotas de 20 ml de cultura celular de 6-7 dias em erlenmeyers de 125 ml, acrescentamos 2,4 D a fim de que a concentração final seja de 500 μ M (concentração final). Para o controle foi acrescentado o mesmo volume de etanol (98%, Merck), solvente utilizado na solução estoque de 2,4D.

III. 6.4. Tratamento com AIA e AIB

Para o tratamento com AIA e AIB foi utilizado 10 ml de cultura celular de 6-7 dias em erlenmeyers de 125 ml, acrescentamos as auxinas a fim de que a concentração final seja de 10 μ M (concentração final). Para o controle foi acrescentado o mesmo volume de água destilada.

III.6.5. Ensaio Fluorimétrico

O ensaio fluorimétrico é um método utilizado para quantificar a atividade da β -glucuronidase. O ensaio é realizado em duplicata com no mínimo 2 clones de cada evento de transformação

Soluções:

Tampão de extração de proteína total

Sarcosil

0,1%

	Triton® X-10mm	0,1%
	b-Mercaptoetanol	10mM
Tampão de reação (MUG)	22mg de MUG dissolvido em tampão de extração	
Tampão de parada	Na ₂ CO ₃	0,2M
Solução padrão MU	MU	1mM dissolvido em água deionizada

Cerca de 100 mg de material vegetal foram macerados em tubo Eppendorf 1,5 ml contendo 500 µl de tampão de extração por cerca de 1 minuto. Em seguida, o material foi centrifugado a 11200 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e armazenado a -80°C ou utilizado imediatamente após a extração.

Adicionou-se 25 µl do extrato vegetal e 75 µl de tampão de reação (pré-aquecido à 37°C por 10 minutos) e incubou-se a 37°C durante 15/30/45 minutos no escuro. A cada tempo determinado 20 µl da reação foram retirados e adicionados a 1980 µl de tampão de parada para a leitura subsequente. A fluorescência foi então medida em fluorímetro (460/365 nm).

Para o cálculo da atividade específica de da proteína GUS é necessário determinar a quantidade de proteína total contida no extrato. Para isso, utilizou-se o método de Bradford (1976).

A atividade da enzima β-glucuronidase é estimada como sendo proporcional a nmolMU/µg proteína/minuto. A atividade da enzima nas amostras transformadas foi subtraída pelo valor da atividade da enzima encontrada na suspensão celular não transformada. Em seguida, com o objetivo de verificar o perfil de expressão de GUS nas diferentes subculturas ao longo do tempo, normalizamos os valores encontrados pelo maior valor apresentada para cada amostra. Para encontrar o fator de indução de atividade de GUS nas células tratadas, dividimos o valor da atividade da

enzima encontrada nas células transformadas pelo valor da atividade das células não tratadas. Dessa forma, somente os valores acima de 1 podem estar associados com o aumento da resposta da enzima a um determinado tratamento.

III 6.6. Análise em Microscopia

Lâminas preparadas com cerca de 50 µl de células tratadas e controle foram examinadas em microscópio de fluorescência Axiovert 200 (Laboratório de Reparo celular, Prof^oDr^o Carlos Frederico Menck ICB/USP) que porta filtro excitação BP475/40/ Beam splitter FT500/ Emissão BP 530/50 para análise de fluorescência de GFP. Para fotografar as células utilizamos a câmara acoplada ao microscópio AxioncamHRC (Zeiss) e o programa Axionvision (Zeiss).

III. 7. Análise da atividade promotora de Retrolyc1 ao longo do ciclo celular

III. 7.1 Sincronização da cultura celular com Afidicolina

Cerca de 20 a 15 ml de cultura celular saturada (7 dias de subcultura) foram tratadas com Afidicolina, bloqueador do ciclo celular (concentração final de 4µg/ml de meio de cultura) durante 24 horas, a 28°C e sob constante agitação 130rpm. Após este período a afidicolina foi retirada do meio de cultura, para tanto as células foram colocadas em papel de filtro 3MM estéril e filtradas após serem lavadas com cerca de 250ml de meio de cultura. Após a retirada do bloqueador as células filtradas foram colocadas em novo meio de cultura e em 3 em 3 horas uma amostra foi coletada e congelada em -70°C durante 24h.

III7.2. Quantificação mRNA dos Marcadores de ciclo celular por PCR em tempo real.

RNA extraído foi utilizado como molde para a síntese da primeria fita seguindo as especificações do fabricante (kit *First Strand* –Invitrogen®). Os

fragmentos foram amplificados na máquina Applied Biosystems 7300 PCR Real Time. O sistema que utilizado foi o SYBR Green®, um fluoróforo intercalante de DNA dupla fita que detecta em tempo real o produto amplificado por pares de iniciadores específicos (Tabela II).

Em cada reação temos num volume final de 25ul: 9uM de iniciadores, aproximadamente 10ng de cDNA primeira fita e Mix SyberGreen® 1x.

III.8. Análise da Expressão de Retrolyc1

III.8.1 Extração do RNA

Soluções:

Tampão de extração:

Tris-HCl	0,2M	pH 7,5
LiCl	0,1M	
EDTA	5mM	pH 8,0
SDS 10% (wt/v)	1/10 volume	
Água DEPC*		

Água DEPC*: à água deionizada foi adicionado DEPC, com diluição de 1000x, e deixada por cerca de 20 horas, em seguida a solução foi esterilizada por 30 minutos.

Cerca de 100 a 300 mg de folha vegetal foi pesado e congelado em nitrogênio líquido. O material foi macerado com auxílio de um cadinho e pistilo até a obtenção de um pó fino. Este foi transferido para tubos de 1,5 ml e adicionado o tampão de extração. Adicionamos 500 µl de tampão de extração. Caso o material fosse suspensão celular, maceramos diretamente em 500µl de tampão de extração no tubo de 1,5ml com pistilos próprios para este tubo. Para que a lise celular fosse o mais abrangente possível,

mergulhamos os tubos em nitrogênio líquido por 10-20 segundos e depois deixamos que o material descongele no gelo. O restante da extração segue conforme descrito abaixo.

Adicionamos em seguida 500 µl de fenol:clorofórmio (1:1), o material vigorosamente homogeneizado com ajuda do vortex e centrifugado a 22000 g por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 1 volume de LiCl 6M. A solução foi deixada a 4°C durante pelo menos 16 horas. Após este período centrifugamos os Eppendorfs a 22000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com LiCl 3M e o material foi novamente centrifugado. Ressuspendemos o precipitado com 250 µl de água DEPC. Adicionamos em seguida 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. O material foi incubado a -80°C por 15 minutos e, em seguida, centrifugado a 22000g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e incubado com 50 µl de água DEPC a 55°C por cerca de 15 minutos para que este seja ressuspensionado. O RNA foi mantido a -70°C.

III.8.2. Análise da expressão de *Retrolyc1A* em *Lycopersicon* por Northern Blot.

Preparação da Membrana

Plantas inteiras de tomate (Le, Lp, e Le variedade Micro-Tom) foram mantidas em casa de vegetação por cerca de 60 dias em meio de cultura MS30. O tecido da planta inteira foi então lesionado com a ajuda de um bisturi, como controle outro conjunto de material vegetal foi mantido intacto. As plantas com tecido lesionado e intacto foi mantido por 24h em folhas de papel de filtro úmida, com o intuito de evitar que o material seja ressecado.

O RNA foi então extraído conforme descreve o item acima. Alíquotas dos diferentes RNAs foram desnaturadas, por 15 min. a 65°C em solução contendo MOPS 1x, formaldeído 37% (0,82 µl/µl de amostra) e formamida

(2,28 µl de amostra). Após a adição do tampão de amostra (50% glicerol, 1mM EDTA, 0,125% azul de bromofenol, 0,125% xileno cianol) as amostras de RNA foram fracionadas por eletroforese em gel de agarose 2%, formaldeído 37% e tampão MOPS1x. Terminada a corrida, o gel foi lavado 2 a 3 vezes com água, 15 min. cada lavagem. A seguir, os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon Hybond N (Amersham-Pharmacia) em SSC 10x, por capilaridade. Após a transferência, a membrana foi seca por 2 h a 80°C, sendo os RNAs fixados à membrana sob UV a 1 min.

III.8.3. Análise da expressão de *Retrolyc1A* em *Lycopersicon* por Slot Blot.

Preparação das amostras

Cerca de 5-20 µg de RNA total foi em água DEPC estéril para um volume final de 50 µl. Realizamos diluições seriadas a fim de certificar que obteríamos o sinal desejado para cada experimento. A cada amostra acrescentamos 30 µl de SSC20X e 20µl de Formaldeído 37%. Incubamos por 60 °C por 30 minutos. Em seguida transferimos as amostras no gelo e assim deixamos até o momento de aplicar as amostras.

Preparação do aparato de microfiltração.

O aparato de Microfiltração Biosciences 48 slots foi deixado no detergente DTT (diluído 1:2 de água) por no mínimo 2 horas, sendo posteriormente lavado com água MilliQ autoclavada até sair todo o detergente..

Cortamos no tamanho 13 cm x 4 cm a membrana de Nylon Hybond N++ e 3 papel de filtro 3MM whatmann paper. A membrana foi ativada após a submersão em água filtrada estéril, seguido por submersão em SSC 10X.

O aparato montado seguiu a seguinte ordem: primeira placa de acrílico onde serão depositadas as amostras, membrana Hybond N++, 3 papel de filtro whatmann, segunda placa de acrílico e terceira placa de acrílico, onde a

mangueira da bomba de vácuo será conectada. O sanduíche montado foi firmemente preso com parafusos do aparato de microfiltração do Slot Blot.

Deposição das amostras no aparato de Slot Blot.

Sob o vácuo desligado colocamos 200 ul de SSC 10X em cada poço. O vácuo em seguida foi ligado, repetimos a operação mais uma vez.. Todas as amostras foram então aplicadas, sempre sob o vácuo desligado, após acionar a bomba de vácuo e as amostras terem sido filtradas, adicionamos mais 200 ul/poço de SSC 10X. A membrana foi então removida e o RNA ligado covalentemente à membrana após permanecer assando por 2 horas a 80°C.

III 8.4 Preparação da Sonda

O DNA foi desnaturado à 99°C durante 5 min. A sonda foi marcada pelo kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen-181870). Para marcação do fato a ser utilizado como sonda o DNA desnaturado é colocado na presença de oligo-desoxirribonucleotídeos com seqüências randômicas que servem como iniciadores para a enzima Klenow. O [α -³²P]dCTP é então incorporado durante a extensão do iniciador possibilitando a marcação da sonda. Para uma incorporação máxima do radioativo a reação foi deixada durante 3 horas à 37°C.

Retrolyc1A

Para a síntese da sonda utilizamos como molde a região U3 do retrotransposon Retrolyc1A contendo 2MRs, o fragmento estava contido no vetor pU3A2MR/GUS constituído durante a tese de doutorado de Hashimoto (2004). Assim a seqüência foi retirada do vetor utilizando as enzimas EcoRI (Fermentas) e Pst1 (Fermentas).

Retrolyc1B

Para a síntese da sonda utilizamos como molde a região U3 do retrotransposon Retrolyc1B, o fragmento estava contido no vetor pHGWFS7. Seguimos por uma reação de PCR com iniciadores específicos de U3B

(Tabela II), o programa e os detalhes dos iniciadores estão descritos no item III.4.

Gus

Para a síntese da sonda específica para o gene *gus* utilizamos como molde o vetor pCAMBIA1291Z, que contém o gene em questão. Seguimos por uma reação de PCR com iniciadores específicos para *gus*, GUSA e GUSB, (Tabela II). O programa de amplificação foi 94°C 10min, ciclo de 35 vezes de (94°C 1min, 50°C 30seg e 72°C 45 seg.), 72°C 10 min. e mantido a 4°C.

Controle interno tomateiro

Como controle endógeno foi utilizado o produto amplificado pelos iniciadores específicos (Tabela II) para o gene constitutivo RPL2, que codifica a proteína ribossomal L2 de tomateiro.

Controle interno fumo.

Como controle endógeno utilizamos o produto amplificado pelos iniciadores Nt actinR e Ntactin F (Tabela II) que são específicos para o gene que codifica a proteína actina de *Nicotiana tabacum*.

Tanto o produto da digestão quanto o da amplificação foi fracionado em gel de agarose 0,7% a 1,5%, sendo a região U3 isolada do gel. A purificação do DNA do gel foi feita com o QIAquick®Gel Extraction Kit 250 (Quiagen 28706).

III 8.5 Hibridação, lavagem e exposição da Membrana

A membrana foi incubada 2h à 65°C em solução de pré-hibridação (SDS 7%, EDTA 1mM pH 8,0 e Tampão fosfato 0,5M pH7,4) e, a seguir, a sonda radioativa desnaturada com 1/3 do volume de NaOH 1N por 5min e neutralizada com 1 volume de tris 1M(pH8,0) foi adicionada à solução

permanecendo por 12-36h à 65°C. Após a hibridação, a membrana foi lavada 2 a 3 vezes em solução SSC 10x (NaCl 1,5M e Citrato de Sódio 0,15M), com 15 min. cada lavagem, sendo a primeira lavagem feita à temperatura ambiente e as demais à 65°C. A membrana foi exposta ao filme (Kodak) por 15 a 19 dias com intensificador à -80°C e depois o filme foi revelado utilizando-se revelador e fixador Kodak.

IV. Resultados

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o perfil de expressão de Retrolyc1B e Retrolyc1A. Para tanto a região U3 de Retrolyc1B foi inserida no vetor binário contendo os genes repórteres *gus* e *gfp* utilizando o sistema Gateway® Invitrogen. A região U3 de Retrolyc1A tanto com 2MR quanto de 3MR já estavam devidamente clonadas no vetor binário pCAMBIA (Hashimoto-Miura, 2004). As análises da atividade de U3 foram feitas em suspensão celular de fumo geneticamente modificada pela introdução das construções acima. Além disso, com o intuito de verificar se a expressão de Retrolyc1 seria modulada por hormônios vegetais, foram utilizadas linhagens de tomateiro mutantes Micro-Tom.

IV.1. Construção da região promotora de Retrolyc1B para estudo de expressão em suspensão celular de fumo.

Durante o doutorado de Hashimoto-Miura (2004) foram amplificados e seqüenciados 140 fragmentos de DNA referentes à região U3 de Retrolyc1B a partir do genoma de *Lycopersicon peruvianum* e *Lycopersicon esculentum*. A escolha de qual entre estes fragmentos de U3B que seria clonado foi cuidadosa, já que os retroelementos possuem um mecanismo de transposição replicativo. Portanto, há possibilidade das cópias presentes no genoma tenham acumulado mutações ao longo do tempo e não serem mais ativas transcricionalmente.

A figura 10 apresenta o filograma obtido a partir do alinhamento das 140 regiões U3B amplificadas sendo possível observar a formação de 5 agrupamentos distintos. Apenas uma seqüência representativa de cada grupo foi utilizada para a clonagem do presente trabalho. Para tanto foi utilizado o sistema Gateway® da Invitrogen (Item Materiais e Métodos III.4.1) devido a

sua maior rapidez e praticidade em relação ao sistema tradicional, que utiliza enzimas de restrição.

Figura 10. Filograma do alinhamento das seqüências U3B genômicas de *Lycopersicon esculentum* (Le) e *Lycopersicon peruvianum* (Lp). O filograma mostra que as seqüências genômicas formam cinco agrupamentos distintos. As seqüências correspondentes a U3B de Lp estão agrupadas na caixa verde e com a escrita em azul. Já as U3B de Le estão em escrita vermelha e agrupadas em caixas amarela, azul, roxa e mostarda indicando a diversidade das seqüências de U3B de Le. Ao lado de cada caixa há o nome da seqüência de U3B escolhida como representante de cada grupo e que foram utilizadas para a clonagem.

As seqüências de U3B foram amplificadas e posteriormente inseridas, por recombinação homóloga, no vetor binário pHGWS7 (Fig.9), que apresenta a jusante da região inserida os genes repórteres *gus* e *gfp*. A figura 11 mostra um diagrama dos passos efetuados para a obtenção do fragmento clonado.

Figura 11. Diagrama do processo de sistema Gateway® Invitrogen da clonagem da região U3 de Retrolyc1B. O sistema gateway® utiliza recombinação homóloga para inserir o fragmento no vetor desejado. No topo da figura à esquerda o fragmento U3B (azul claro) presente no vetor pGEM easy (círculo rosa) foi amplificado com os iniciadores U3BgateF e U3BgateR (verde e vermelho), a cor verde representa a sequência do iniciador homóloga a sequência de U3B, já a cor vermelha representa parte da sequência de recombinação homóloga. Somente na segunda reação de amplificação a sequência de recombinação é completada (AttB1 e AttB2). O fragmento U3B contendo a região U3B é inserida no vetor pDNOR (círculo azul escuro) pela ação da Clonase BP®, gerando o vetor de entrada. Já o fragmento U3B (azul claro) é inserido no vetor pHGWFS7 (círculo amarelo) através da recombinação homóloga catalisada pela enzima Clonase LR®. No alto à direita o gel de agarose gel 1% contendo o fragmento do tamanho esperado de U3B amplificado na primeira e na segunda reação de PCR.

Entre as seqüências clonadas a U3B de *Lycopersicon peruvianum*, cuja seqüência representante é denominada Lp30 no esquema da figura 10, está presente em cerca de 20% do total das seqüências analisadas por Hashimoto-Miura (2004), sendo o candidato para prosseguir com análise da região promotora. Com o objetivo de verificar se a região U3B escolhida é capaz de promover a transcrição do gene repórter *gus* o vetor binário pHGWFS7 contendo U3B foi inserido na epiderme de *Allium cepa* através do método de biobalística (Fig. 12).

A figura 12 confirma que o promotor possui a capacidade de ativar a transcrição do gene repórter no tecido de *A. cepa*, indicando que o promotor U3B escolhido é funcional e que a construção efetuada está correta.

Figura 12. Análise da expressão transiente da construção contendo a região promotora U3B de *L.peruvianum* inserida no vetor pHGWFS7. Cerca de 2µg do vetor pHGWFS7 contendo a região U3B foi inserido na epiderme de catafilos de *Allium cepa* através da técnica de biolalística, foi utilizando partículas de Tungstênio (24 mg/ml de glicerol 50%, 1,1 µm de diâmetro, M-17 Bio-Rad). Cerca de 24h após o bombardeamento a atividade da enzima β-glucuronidase foi analisada por Ensaio histoquímico. Como controle foi usado o vetor vazio, que não contém o promotor.

IV.2. Transformação permanente da linhagem celular Bright Yellow 2.

Após a confirmação da clonagem da região promotora U3B, o vetor binário foi então transferido para *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por eletroporação para em seguida transformar a suspensão celular de fumo BY-2. Além da construção do vetor pHGWFS7 contendo a região U3 de Retrolyc1B (U3B), o material vegetal foi também transformado com a região

U3 de Retrolyc1A (U3A). Os vetores utilizados foram: pCAMBIA1200 contendo a regiões U3A de 2MR e o vetor pCAMBIA1291Z contendo a região U3A de 3MR (tabela I). Para o controle nos experimentos de análise da região promotora a suspensão celular BY2 foi também transformada como vetor pCAMBIA 1291Z contendo o promotor constitutivo 35S a montante do gene *gus*.

Para a obtenção das células geneticamente modificadas realizou-se um co-cultivo das células com bactérias contendo o plasmídeo de interesse. A massa celular foi transferida para meio de cultivo seletivo. Os calos que cresceram neste meio seletivo com antibióticos foram repicados aproximadamente 4 vezes ao longo de 4-5 meses. Após este período os calos que permaneceram resistentes ao antibiótico foram transferidos para cultura líquida, sendo mantido para cada clone uma placa em cultura semi-sólida.

A partir de aproximadamente 60 clones iniciais obtivemos, após todo o processo de seleção, 4 clones contendo a região U3A de 2MR, 6 clones contendo U3A de 3MR, 4 clones celulares contendo U3B e 4 clones contendo a construção 35S::*gus* (tabela III). A fim de confirmar o evento de transformação extraímos o DNA genômico desses clones utilizando o protocolo descrito por Dellaporta 1988 e realizamos uma reação de amplificação como iniciadores seqüências específicos para o gene repórter *gus* contido na construção inicial (tabela II). Além disso os clones foram também sujeitos a análise da atividade da proteína codificada por *gus* através da análise histoquímica. (Tabela III)

Tabela III: Clones de suspensão celular de fumo (BY2).

	Clones	Ensaio Histoquímico	Confirmação por PCR
2MR ::gus	2MR1.1	Positivo	Positivo
	2MR1.2	Positivo	Positivo
	2MR2.2	Negativo	Positivo
	2MR5.1	Positivo	Positivo
3MR::gus	3MR1.2	Positivo	Positivo
	3MR2.2	Positivo	Positivo
	3MR2.3	Positivo	Positivo
	3MR4.8	Positivo	Positivo
	3MR 5.14	Positivo	Positivo
U3B::gus	U3B5	Positivo	Positivo
	U3B6	Positivo	Positivo
	U3B8	Positivo	Negativo
	U3B10	Positivo	Positivo
	U3B11	Positivo	Positivo
35S::gus	35SGUS 1.12	Positivo	Positivo
	35SGUS 1.15	Positivo	Positivo
	35SGUS 2.5	Positivo	Positivo
	35SGUS 4.4	Positivo	Positivo

A confirmação do evento de transformação foi realizada através do ensaio histoquímico e por PCR, onde foram utilizados iniciadores específicos para o gene *gus* (tabela II) .

IV.3. Análise da expressão da região promotora de Retrolyc1.

Após a obtenção das culturas celulares transgênicas contendo a região promotora de Retrolyc1A e B avaliamos o perfil de expressão deste elemento em diferentes situações. Utilizamos como controle interno a cultura celular não transformada, como controle positivo a cultura celular contendo a região promotora 35S fusionada ao gene *gus* e como controle das diversas situações analisadas a cultura transformada não-tratada.

IV3.1 Auxinas.

Para avaliar o papel do hormônio auxina na modulação da atividade transcricional de *Retrolyc1* expomos diferentes clones de culturas celulares geneticamente modificadas à auxina natural ácido indol acético (AIA) e as auxinas sintéticas: ácido indol butírico (AIB) e 2,4 ácido acético diclorofenoxil (2,4D).

Figura 13. Análise da atividade da região promotora de *Retrolyc1* após o tratamento com as auxinas 2,4D. Suspensão celular com 6 a 7 dias de sub-cultura foi tratada com 2,4D (concentração final de 500 μ M), foram analisadas amostras de células 2,5h, entre 5-6h, entre 10 -18,5h e 24h após adição de 2,4D. Para o controle as células transformadas foram mantidas em contato com o etanol 98%, solvente utilizado para solubilizar o 2,4D. Tanto a cultura controle quanto a tratada foi mantida no escuro, 28°C e sob agitação constante de 130RPM. As barras correspondem à atividade média de pelo menos dois ensaios independentes. Linhagens analisadas U3B5, U3B6, U3B10, U3A3MR2.1, U3A3MR4.8 e U3A3MR5.14

As regiões promotoras de *Retrolyc1A* e *Retrolyc1B* apresentam respostas distintas ao tratamento com 2,4D. *Retrolyc1B* possui um fator de atividade de GUS de cerca de 2 vezes maior em relação à atividade da situação controle. Já *Retrolyc1A*, representado pela região U3A de 3 Motivos repetidos (U3A3MR), aparentemente não é induzida por este hormônio pois apresentou fator de indução próximo de 1.

A resposta de *Retrolyc1* ao tratamento com 2,4D instigou a verificar se a mesma modulação da expressão de *Retrolyc1* é também encontrada na auxina natural AIA e em outras auxinas sintéticas, como AIB.

Figura 14. Análise da atividade da região promotora de *Retrolyc1* após o tratamento com a auxina AIA. Suspensão celular com 6 a 7 dias de sub-cultura foi tratada com AIA (concentração final de 10 μ M), foram analisadas amostras de células 2,5h, 18h e 24h após adição da auxina. Para o controle as células transformadas foram mantidas em contato com água destilada. Tanto a cultura controle quanto a tratada foi mantida no escuro, 28°C e sob agitação constante de 130RPM. As barras correspondem à atividade média de pelo menos dois clones provindos de eventos de transformação distintos, a saber U3A2MR2.1, U3A2MR5.1, U3A3MR1.2, U3A3MR 5.12, U3B5, U3B6 e 35SGUS1.12.

Figura 15. Análise da atividade da região promotora de *Retrolyc1* após o tratamento com as auxinas AIB. Suspensão celular com 6 a 7 dias de sub-cultura foi tratada com AIB (concentração final de 10 μ M), foram analisadas amostras de células 2,5h, 18h e 24h após adição da auxina. Para o controle as células transformadas foram mantidas em contato com água destilada. Tanto a cultura controle quanto a tratada foi mantida no escuro, 28°C e sob agitação constante de 130RPM. Em ambos os gráficos as barras correspondem à atividade média de pelo menos dois clones provindos de eventos de transformação distintos. **A.** U3A2MR2.1, U3A2MR5.1, U3A3MR1.2, U3A3MR 5.12, U3B5, U3B6 e 35SGUS1.12. **B.** Apenas atividade de U3A2MR2.1, U3A2MR5.1, U3A3MR1.2, U3A3MR 5.12 e 35SGUS1.12.

Tanto o tratamento com AIA quanto com AIB apresentou perfis de expressão de Retrolyc1A e Retrolyc1B distintos. A região promotora de Retrolyc1A é induzida ao tratamento com AIA, sendo que U3A2MR apresenta rápida variação após 2.5h em contato com a auxina, sendo apresentado um fator de indução de cerca de 2 vezes superior ao controle.

Já Retrolyc1B foi fortemente induzido quando as células foram expostas ao tratamento com AIB, o fator de indução de atividade da enzima β -glucuronidase foi cerca de 80 vezes superior ao controle. No entanto, esta indução, diferentemente da observada para U3A em resposta à AIA, apresenta forte indução após 24 h de exposição ao AIB. De modo semelhante observa-se a indução do promotor U3B após 10-18 h de exposição ao 2,4D (Fig 13). O perfil de expressão de Retrolyc1 em resposta ao tratamento as auxinas apresenta dois padrões em função da região promotora U3 contida em sua LTR. O promotor U3A apresenta uma resposta rápida à auxina natural (AIA) enquanto a U3B apresenta uma indução tardia unicamente para as auxinas sintéticas o que caracterizaria uma resposta secundária e não primária a esta classe hormonal.

IV3.3. Estresse biótico e abiótico.

Retroelementos em plantas do grupo *Copia* possuem sua atividade transcricional freqüentemente associada a algum tipo de estresse, como o caso de diferentes subfamílias de *Tnt1* e *Tto1* em tabaco (Pouteau et al, 1991, 1994; Hiroshika, 1993; Moreau-Mhiri et al, 1996; Grandbastien et al, 1997), *Tos* em arroz (Hirochika et al, 1996), BARE-1 em cevada (Kalendar et al, 2000).

Retrolyc1 presente no genoma de tomateiro também pertence a este grupo de retroelementos. Retrolyc1A apresentou resposta ao tratamento com salicilato de sódio durante o desenvolvimento e após o tecido vegetal ter sido lesionado (Hashimoto-Miura, 2004).

Portanto, tivemos como objetivo verificar se Retrolyc1B é também responsivo ao tratamento com salicilato de sódio e se outros elicitores são capazes de induzir a atividade das regiões promotoras tanto de Retrolyc1A e Retrolyc1B.

Tratamento com Salicilato de Sódio.

Figura 16. Análise da atividade da região promotora de Retrolyc1 após o tratamento com salicilato de sódio. Suspensão celular com 6 a 7 dias de sub-cultura foi tratada com Salicilato de sódio (concentração final de 1mM), foram analisadas amostras de células 2,5h, 11h e 24h após adição do sal. Para o controle as células transformadas foram mantidas em contato com água destilada. Tanto a cultura controle, quanto à tratada foram mantidas no escuro, 28°C e sob agitação constante de 130RPM. As barras correspondem à atividade média de pelo menos dois experimentos independentes. Linhagens analisadas: U3B5, U3B6, U3B10, 35SGUS 1.12, U3A2MR1.2, U3A3MR2.1 e U3A3MR5.14.

A figura 16 indica que somente a região promotora de Retrolyc1A é induzida pelo tratamento com salicilato de sódio (1mM). Dentro do período analisado há uma forte variação da atividade da β -glucuronidase após 24h de tratamento. A atividade da enzima β -glucuronidase ocorre tanto na região promotora U3A com 2MR quanto a com 3MR. Este dado corrobora com os dados anteriores gerados durante o doutorado de Hashimoto-Miura (2004), onde folhas de *Lycopersicon esculentum* infiltradas com ácido salicílico apresentam transcritos apenas de U3A.

Lesão mecânica.

Já a figura 17 mostra um aumento do nível transcricional de Retrolyc1A após o tecido de tomateiro ter sido lesionado. Neste experimento de *Northern Blot* RNA de *Lycopersicon peruvianum* e duas variedade de *Lycopersicon esculentum* foi extraído após as plantas terem sido lesionadas com lâmina de bisturi, como controle foi analisado o RNA do tecido intacto.

Figura 17. Aumento do nível transcricional de Retrolyc1A em tomateiros lesionados. *Northern Blot* – Tomateiros *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon esculentum* variedade *Micro-Msk* foram mantidos em condições *in vitro* até atingirem aproximadamente 60 dias. (L) RNA extraído de planta inteira 24h após ter sido lesionada com auxílio de um bisturi. (NL) RNA extraído de planta inteira cujo tecido permaneceu intacto. Fracionamento em gel de agarose-formaldeído 2% contendo 40 µg de RNA total de cada amostra Filme exposto durante 14 dias -80°C.

Tratamento com celulase

Em 1991 Grandbastien e colaboradores mostraram que o recém descoberto retroelemento Tnt1 possui a atividade transcricional ativada no processo de obtenção de protoplastos. Neste processo ocorre o tratamento com enzimas derivadas de extrato de fungo capaz de degradar a parede celular, sendo o tratamento com estes elicitores o responsável pela ativação do retroelemento. Devido ao fato de Retrolyc1 pertencer ao mesmo grupo de TE que Tnt1 e possuir semelhanças na sua seqüência (Costa *et al*, 1999), optamos em analisar se há resposta deste elemento ao tratamento com a celulase RS ONOZUKA (0,5%w/v).

A figura 18 mostra que Retrolyc1A e Retrolyc1B respondem diferentemente ao mesmo tratamento. Somente a região promotora de Retrolyc1B possui atividade perante o tratamento com celulase, sendo o pico entre 4 a 5 horas após a adição do elicitor.

Figura 18. Análise da atividade da região promotora de Retrolyc1 após o tratamento com celulase RS ONOZUKA. Suspensão celular com 6 a 7 dias de subcultura foi tratada com celulase ONOZUKA (concentração final de 0,5%w/v), foram analisadas amostras de células entre 0,5-2,5h, entre 4-5h e 24h após adição da celulase. Para o controle as células transformadas foram mantidas em contato com água destilada. Tanto a cultura controle, quanto a tratada foram mantidas no escuro, 28°C. As células não foram mantidas sob agitação a fim de não comprometer a integridade celular. M. As barras correspondem à atividade média de pelo menos dois experimentos independentes. Linhagens analisadas: U3B5, U3B6, U3B10, 35SGUS 1.12, U3A2MR1.2, U3A3MR2.1 e U3A3MR5.14.

IV3.4. Modulação ao longo do ciclo celular.

O processo de divisão celular é finamente controlado através de diferentes genes que são ativados e/ou inibidos durante as fases do ciclo. Entre eles há casos como retrotransposon L1 que possui a sua atividade fortemente inibida em células HeLa que não estejam se dividindo (Shi X , 2007) , este fato sugere que retroelementos possam ter algum tipo de modulação durante o ciclo celular.

Esta relação nos instigou a verificar se o retrotransposon Retrolyc1 possui também a sua expressão alterada durante o ciclo das células BY2 transformadas. Assim, células de fumo geneticamente modificadas foram sincronizadas através do tratamento com o inibidor da DNA polimerase (Afidicolina), que resulta no acúmulo de células na transição G1/S. Após 24h, o inibidor foi retirado e as células foram colocadas em novo meio cultura, amostras celulares foram retiradas de 3 em 3 horas durante 24h.

O RNA dessas amostras foi extraído e, após quantificação e comprovação da sua integridade em gel de agarose 2%, foi submetido à síntese de cDNA. Analisamos o nível de transcritos da Ciclina D3 através da técnica de PCR em tempo real, usando iniciadores específicos (Tabela II).

A característica básica do controle ciclo celular conservada em todos os eucariotos é o controle da passagem das fases G1/S e para G2/M (Pines, 1995). A presença de transcritos que codificam proteínas como as Ciclinas e as Quinases Dependentes de Ciclinas (CDK) garantem a eficácia do processo. Neste contexto a Ciclina D3 possui um importante papel durante a passagem de G1 para S, devido o nível de seus transcritos serem acumulados durante esta etapa a ciclina D3 representa um importante marcador do ciclo celular (Pines, 1995).

Figura 19. Nível de transcritos da Ciclina D3 após a retirada da Afidicolina que bloqueia o ciclo na transição G1/S. Suspensão celular com 7 dias de sub-cultura foi tratada com Afidicolina (concentração final de 4µg/ml de meio de cultura). As células foram mantidas no escuro, 28°C sob agitação constante de 130RPM. Após 24h de tratamento, as células foram filtradas a fim de que o bloqueador do ciclo fosse retirado. Amostras de células foram coletadas em 3h em 3h durante 24 horas. Posteriormente o RNA dessas células foi extraído para a síntese de cDNA. Os transcritos da ciclina D3 foram quantificados usando a técnica PCR em tempo usando o fluorófilo SyBR® Green e iniciadores específicos para Ciclina D3. As barras correspondem à atividade média de pelo menos dois experimentos independentes.

Conforme o esperado, próximo do que seria a fase S há um pico da presença dos transcritos de Ciclina D3, o que não é observado nas demais fases do ciclo celular. No entanto, após o término do primeiro ciclo, que ocorre por volta de 12h~15h após a retirada do bloqueador, observamos que as células se encontram menos sincronizadas do que no início.

Com o objetivo de fornecer informações sobre a regulação de Retrolyc1 ao longo do ciclo realizamos o experimento de *Slot blot*, onde as amostras de RNA dos clones das células transformadas foram depositadas sobre uma membrana de *Nylon* e posteriormente hibridadas com sonda específica para o transcrito do gene *gus*.

Figura 20. Nível de transcritos do gene repórter *gus* ao longo do ciclo celular.

Suspensão celular com 7 dias de subcultura foi tratada com Afidicolina (concentração final de 4µg/ml de meio de cultura). As células foram mantidas no escuro, 28°C sob agitação constante de 130RPM. Após 24h de tratamento, as células foram filtradas a fim de que o bloqueador do ciclo fosse retirado. Amostras de células foram coletadas em 3h em 3h durante 24 horas. O RNA de células transformadas submetidas à análise do ciclo celular foi extraído, e hibridado com sonda específica para o gene *gus*. **A** RNA corresponde ao clone U3A2MR 5.1. **B** RNA corresponde ao clone U3B10.

Aparentemente há uma maior concentração do nível de transcritos do gene repórter *gus* após 3h da retirada do bloqueador o que corresponderia à fase S/G1 do ciclo celular. Observamos outro aumento transcricional entre 12h e 15h o que seria a entrada novamente na fase S/G1 do próximo ciclo. Este dado sugere que a expressão de Retrolyc1 seja modulada, sendo o pico de expressão na fase S/G1. Já o momento do ciclo celular em que há baixa indução de Retrolyc1A seria próximo da fase M, enquanto que para Retrolyc1B ocorre próximo da fase G2.

No entanto, é importante salientar que conforme indicado na figura 19 cerca de 12h/15h após a retirada do bloqueador do ciclo celular as células não se encontram mais sincronizadas como no início. Portanto, analisaremos o resultado apenas nas primeiras 12h horas do experimento. Como Retrolyc1B foi clonado no vetor contendo tanto o gene *gus* quanto *gfp* foi possível fazer análise da atividade da região promotora também em microscopia de fluorescência. A figura 21 mostra que a fluorescência da proteína GFP é baixa após 6h da retirada do bloqueador do ciclo celular, próximo da fase G2, condizente com a baixa expressão do mRNA para Retrolyc1B (Fig. 20)

Figura 21. Análise em microscopia da presença da proteína GFP em células transformadas com o vetor pHGWS7 contendo a região U3B ao longo do ciclo celular. Suspensão celular com 7 dias de subcultura foi tratada com Afidicolina (concentração final de 4µg/ml de meio de cultura). As células foram mantidas no escuro, 28°C sob agitação constante de 130RPM. Após 24h de tratamento, as células foram filtradas a fim de que o bloqueador do ciclo fosse retirado. Amostras de células foram coletadas em 3h, 6h e 9h após a retirada do bloqueador. Como o vetor pHGWS7 possui os genes repórteres *gus* e *gfp* fusionados, foi possível analisar a presença de GFP no citoplasma celular através do filtro de fluorescência adequado (filtro excitação BP475/40/ Beam splitter FT500/ Emissão BP 530/50). Analisamos também a localização nuclear através de DAPI que cora preferencialmente cromatina. Linhagens analisadas: U3B5 e U3B10.

Dado que Retrolyc1 apresenta uma provável regulação durante o ciclo celular e que este possui relação com o elemento Tnt1, parece natural nos perguntarmos se o próprio Tnt1 possui alguma modulação ao longo do ciclo. Como a suspensão celular usada nos experimentos provém do meristema radicular de *Nicotiana tabacum*, e portanto possui no seu genoma elementos Tnt1, optamos por aproveitar o RNA das células sincronizadas para também analisar a expressão deste elemento, usando desta vez uma sonda corresponde à região final da transcriptase reversa e início da LTR de Tnt1.

A figura 22 mostra para Tnt1 apresenta baixa expressão durante a fase G2 do ciclo, semelhante ao que ocorre com Retrolyc1B.

Figura 22. Nível de transcritos do elemento Tnt1 ao longo do ciclo celular. Suspensão celular com 7 dias de subcultura foi tratada com Afidicolina (concentração final de 4µg/ml de meio de cultura). As células foram mantidas no escuro, 28°C sob agitação constante de 130RPM. Após 24h de tratamento, as células foram filtradas a fim de que o bloqueador do ciclo fosse retirado. Amostras de células foram coletadas em 3h em 3h durante 24 horas. O RNA de células transformadas submetidas à análise do ciclo celular foi extraído, e hibridado com sonda a específica para o elemento Tnt1.

IV 4. Análise da expressão de Retrolyc1 em mutantes hormonais de tomateiro variedade Micro-Tom.

A região promotora de Retrolyc1A analisada em plantas de fumo (Fig. 7) sugere que o elemento possua uma atividade transcricional modulada ao longo do desenvolvimento. Do mesmo modo, verificou-se que culturas celulares de fumo contendo a região promotora U3A expostas à AIA induzem

rapidamente a expressão de *gus* e após 24 h esta é inibida. Estudos de expressão destas linhagens celulares sincronizadas por afidicolina caracterizam a existência de um padrão modular de expressão ao longo do ciclo celular. Os resultados sugerem que os elementos das famílias Retrolyc1 contendo a U3A ou a U3B se expressem preferencialmente em células que se encontrem em fase G1/S. Dado a importância do balanço auxina/citocinina para o desenvolvimento vegetal e controle do ciclo celular em plantas foram selecionadas duas linhagens de mutantes de tomateiro insensível aos hormônios auxina (*dgt*) e citocinina (*brt*) para avaliar se as vias de transdução de sinal afetadas nestes mutantes de algum modo afetariam o padrão normal de expressão de Retrolyc1.

Os ensaios de expressão das linhagens mutantes foram realizados através de hibridação molecular sobre 5µg de RNA total extraído de diferentes tecidos conforme discriminado a seguir: raízes e parte aérea de plantas com 40 dias, flores, fruto verde e fruto maduro. As amostras de RNA foram depositadas diretamente em membrana de *Nylon* usando aparelho de *Dot blotter*. A membrana foi então hibridada com a sonda específica para Retrolyc1A e Retrolyc1B (resultados não mostrados). A figura 23 apresenta o padrão de hibridação obtido e permite visualizar que Retrolyc1A apresenta perfis de expressão alterados nas mutantes *dgt* e *brt* quando comparados com tomateiro Micro-Tom (Tom) e *L. peruvianum* (Lp).

Primeiramente, há presença de transcritos de Retrolyc1A em frutos verdes e maduros de TOM, de *dgt* e em *brt*; muito embora seja possível observar claras diferenças de intensidade. Já nas estruturas florais há forte expressão de Retrolyc1A em plantas de *L. peruvianum*, assim como em plantas de 40 dias de idade que ainda se encontram em estágio vegetativo.

Considerando-se a organização dos tecidos em parte aérea e parte radicular verifica-se que a expressão do elemento nas raízes de plantas com 40 dias é bastante intensa em tomateiro Micro-Tom e na mutante *brt*.

Diferente do que observado com a mutante *dgt*, onde não foi detectada a expressão do elemento pelo método utilizado. Contrariamente é possível encontrar expressão de *Retrolyc1A* na parte aérea de TOM, Lp e *dgt*, mas não em *brt*. Estes resultados sugerem fortemente que há modulação da expressão de *Retrolyc1A* pelo balanço hormonal auxina/citocinina. No entanto, estes resultados devem ser quantificados e normalizados para que se tenha mais claro o nível de indução ou repressão imposta ao elemento. Quando hibridações foram realizadas nas mesmas membranas com a sonda para visualização de *Retrolyc1B*, verifica-se que não há variação no perfil de expressão nos tecidos estudados (resultados não mostrados) do mesmo modo como observado para o gene *rpl2* utilizado como controle endógeno experimental.

Figura 23. Análise do perfil de expressão de *Retrolyc1A* em mutantes hormonais de tomateiro. .Dot Blot – Tomateiros *Lycopersicon peruvianum* (Lp), *Lycopersicon esculentum* variedade Micro-Tom (Tom), *Lycopersicon esculentum* variedade Micro-Tom mutante para o gene *dgt* (DGT), *Lycopersicon esculentum* variedade Micro-Tom mutante para o gene *brt* (BRT). As plantas foram mantidas em condições *in vitro* até atingirem aproximadamente 40 dias, após este período RNA das raízes e da parte aérea foi extraído. Já a análises dos frutos e flor foram feitas em plantas mantidas em condições *ex vitro*. Cerca de 5 µg de RNA de cada amostra foi depositada na membrana de Nylon, a sonda utilizada corresponde à região U3A2MR. Como controle foi utilizado sonda específica para RPL2. **P.a.** parte aérea. **R.** raiz. 40 dias após o surgimento da radícula. **Flor** junção de flores em diferentes estágios de desenvolvimento.

V. Discussão

Os retrotransposon formam o maior componente dos genomas eucariotos, podendo representar mais de 60% do conteúdo genômico nuclear (Bennetzen JL. , 2002). Em plantas há relação destes elementos de transposição com a estrutura do genoma, gerando alterações cromossômicas assim como aumento e diminuição no tamanho do genoma hospedeiro (Devos KM , 2002). Além disso, devido a sua capacidade de mobilização para diferentes locais do genoma, os TEs podem também atuar alterando o perfil de expressão gênica (Feschotte C , 2007). Esta característica exige um controle fino da atividade de transposição, já que alta taxa de mobilização pode tornar o hospedeiro não mais viável. Por outro lado, a ausência de atividade poderia privar o hospedeiro de eventual função essencial destes elementos. Portanto, a idéia que se tem hoje é que exista um balanço entre a ativação e a inibição da atividade dos elementos de transposição (Volff JN , 2006) .

Em função da abundância e diversidade de TEs encontrados em praticamente todos os genomas seqüenciados, questiona-se envolvimento potencial e importância destes elementos no funcionamento das células/organismos. Retoma-se portanto a hipótese de Barbara McClintock que propôs estes elementos como “elementos controladores de genes” (McClintock, 1984) em contraponto com a hipótese de gene egoísta ou mesmo DNA lixo que perdurou na década de 80 e 90 como consequência dos trabalhos de Doolittle & Sapienza (1980) e Orgel & Crick (1980). Neste contexto insere-se o presente trabalho que avalia o perfil de expressão de dois subgrupos (U3A e U3B) de Retrolyc1.

As regiões U3A e U3B de Retrolyc1 são promotores ativos.

Estudos com o retrotransposon Tnt1, membro da família à qual pertence Retrolyc1, levaram à primeira evidência em plantas do aumento do nível transcricional de retroelementos induzido por estresse biótico (Grandbastien *et al*, 1991). Atualmente há outros retroelementos em plantas que apresentam alteração no padrão de expressão, como as diferentes subfamílias de *Tnt1* e *Tto1* em tabaco (Pouteau *et al*, 1991, 1994; Hiroshika, 1993; Moreau-Mhiri *et al*, 1996; Grandbastien *et al*, 1997), *Tos* em arroz (Hirochika *et al*, 1996), BARE-1 em cevada (Kalendar *et al*, 2000).

Neste trabalho demonstramos que Retrolyc1 também é ativado por estresse e, no caso, o modelo utilizado para alcançar este objetivo foi a suspensão celular de fumo *Bright Yellow 2* (BY2). Este modelo, ainda que seja um sistema heterólogo de expressão, foi escolhido por permitir uma avaliação da expressão ao longo do ciclo celular assim como desmembrar as respostas de indução e repressão em nível celular de modo a gerar um modelo para comparar com o sistema vegetal por inteiro.

Durante o desenvolvimento deste projeto as células BY2 mostraram ser um sistema de fácil manutenção e transformação permanente gerando linhagens celulares estáveis. No entanto, a seleção dos clones que efetivamente apresentaram a construção desejada foi lenta e laboriosa. Inicialmente partimos de aproximadamente 60-80 clones por cada evento de transformação e após 5-6 meses de seleção cerca de aproximadamente 10 clones demonstraram possuir a construção desejada.

Apenas Retrolyc1B é ativado na presença da celulase ONOZUKA RS, sendo o pico de ativação entre 4h e 5h após a adição da enzima. O aumento transcricional ativado pela presença da celulase já é bem descrita para o retroelemento Tnt1 de fumo. Este possui alta similaridade em seqüência com

Retrolyc1, sendo possível que ambos tenham uma origem a partir de um retrotransposon ancestral comum antes da divergência das espécies de fumo e de tomateiro. Tnt1 possui o pico de expressão ativado por celulase por volta de 6h (Grandbastien MA, 2005), o que corresponderia aproximadamente o mesmo período da ativação de Retrolyc1B. Estes resultados sugerem que ambos possam compartilhar da mesma rota de ativação nos dois sistemas vegetais. Outro retrotransposon, similar ao Tnt1 e a Retrolyc1, é TLC1 isolado de *Lycopersicon chilense*. Este também apresentou atividade após o tratamento com celulase (Tapia *et al.*, 2005).

Já no caso do tratamento com salicilato de sódio temos o pico da ativação da região promotora apenas para Retrolyc1A. Este subgrupo apresenta em sua região promotora motivos repetidos (MR) de 57pb, descritos anteriormente para as seqüências de Retrolyc1A com 2 , 3 e 4 MR (Hashimoto-Miura, 2004). No entanto, entre mais de 120 seqüências transcritas de Retrolyc1A, analisadas por Hashimoto-Miura, apenas uma apresentou a região promotora com 4MR, sendo portanto pouco representativa. Neste trabalho analisamos apenas a região promotora de representantes de Retrolyc1A com 2MR e com 3MR.

O fato de apenas Retrolyc1A ser ativado pela presença de salicilato de sódio, precursor do ácido salicílico, corrobora resultados anteriormente descritos (Hashimoto-Miura, 2004). Naquele trabalho foi demonstrado que fragmentos detectados por RT-PCR de *Lycopersicon esculentum* infiltrados com ácido salicílico pertenciam exclusivamente a Retrolyc1A. Sendo encontrados transcritos com a região U3 de 2MR e com 3MR.

O ácido salicílico é um importante mediador da sinalização celular de resposta a defesa vegetal ao ataque de patógenos (Halim VA, 2006). Já a celulase é uma enzima que degrada parede celular, sendo originada de

extrato de fungo patogênico. Dessa forma é possível associar a indução de Retrolyc1 por mecanismos de defesa vegetal, no entanto, as diferentes versões do promotor encontradas em tomate (U3A e U3B) sugerem que rotas distintas de transdução de sinal sejam utilizadas para a ativação do elemento. Esta hipótese é sustentada por resultados prévios obtidos para os elementos Tnt1, Tto1, Tos1 e OARE1 (Pouteau *et al*, 1994), (Grandbastien *et al*, 1994), (Grandbastien *et al*, 1997), (Grandbastien, 1998), (Mhiri *et al*, 1997), (Mhiri *et al*, 1999), (Moreau-Mhiri *et al*, 1996), (Takeda *et al*, 1999), (Kimura *et al*, 2001).

Somado a estes resultados, tem-se o resultado descrito anteriormente em que associa a ativação de Retrolyc1A à lesão do tecido vegetal (Hashimoto-Miura, 2004 e Fig17). Fato que reforça a sugestão descrita cima que associa a expressão de Retrolyc1 às primeiras etapas da via de sinalização de defesa vegetal, em particular Retrolyc1A pois a região promotora é ativada rapidamente após a lesão enquanto que a versão U3B é induzida tardiamente possivelmente sugerindo um evento secundário de resposta.

Retrolyc1 e Tnt1 são modulados ao longo do ciclo celular.

Hashimoto-Miura (2004) demonstrou que Retrolyc1 é expresso nos tecidos de tomate, no entanto, não foi possível naquele momento caracterizar os determinantes de indução pelas limitações do sistema utilizado, no caso estudos *in planta*. Ainda naquele trabalho verificou-se que construções gênicas contendo o promotor U3A fusionado ao gene *gus* eram induzidas rapidamente (tempo menor que 30 minutos) por lesão. Resultados não publicados de Hashimoto-Miura (2004) e Ishida (2006) caracterizam que a expressão de Retrolyc1A é modulada ao longo do desenvolvimento de plantas tanto em *Lycopersicon* (Lp e Le) quanto em plantas transgênicas de fumo.

Os resultados obtidos pelo desenvolvimento do presente trabalho corroboram os dados prévios de que Retrolyc1A é modulado ao longo do desenvolvimento vegetal conforme resultados apresentados a partir de RNA dot blot e caracteriza sua modulação ao longo do ciclo celular. Do mesmo modo, Retrolyc1B e Tnt1 apresentam variação no perfil de expressão ao longo do ciclo celular havendo consenso na redução da expressão em fase G2 e aumento de expressão durante as fases G1 e S para os três elementos analisados. É importante notar que os experimentos realizados com Tnt1 não permitem a distinção entre as subfamílias previamente descritas (Fig.24).

Hormônios vegetais (Citocinina/Auxina) modulam a atividade de Retrolyc1A.

Os resultados apresentados apontam que auxina possa ter um papel relevante na ativação transcricional de Retrolyc1, sendo que os diferentes subgrupos (U3A e U3B) apresentam respostas distintas para os tratamentos com auxina natural e sintética. O promotor U3A apresenta uma resposta rápida à auxina natural (AIA) enquanto a U3B apresenta uma indução tardia unicamente para as auxinas sintéticas o que caracterizaria para este último uma resposta secundária e não primária a esta classe hormonal.

Diferenças de respostas também estão presentes para os diferentes subgrupos de Tnt1. Tnt1C é induzido por 2,4D e ao tratamento com ácido salicílico, já Tnt1A responde ao eliciador criptogeína e metil jasmonato. Enquanto que Tnt1B é expresso em cultura celular (Beguiristain *et al.*, 2001).

A diferença observada entre o perfil de expressão da U3A e U3B em resposta às diferentes auxinas utilizadas sugere que a rota de indução de expressão seja distinta. Este fato indica que as auxinas sintéticas ainda que induzindo respostas do tipo “auxina” nas plantas se utiliza de vias de

transdução de sinais diferentes permitindo a modulação diferencial observada entre as regiões U3. Seria interessante estabelecer um painel claro das condições de indução e repressão para ambos os subgrupos de modo a permitir a elaboração de um modelo para eventual identificação dos fatores protéicos responsáveis pela modulação da expressão deste grupo de retrotransposons.

A modulação da expressão de Retrolyc1A também é verificada em tomateiros mutantes pouco sensíveis a auxina (dgt) e a citocinina (brt), ambos introgridos para o background genético de *Lycopersicon esculentum* var Micro-Tom (Pino-Nunes, 2005) (Fig. 24). O mutante diageotrópico (dgt) apresenta mutação no único gene *dgt* que confere à planta um fenótipo de pouca sensibilidade à auxina. A mutação acarreta falta de raízes laterais, redução da dominância apical, alteração no desenvolvimento vascular e redução no crescimento de frutos (Balbi V., 2003). No entanto, algumas características permanecem inalteradas em relação ao selvagem, como a concentração de auxina no meristema apical (Fujino *et al.*, 1988), e a taxa de transporte polar no hipocótilo (Nebenführ *et al.*, 2000), o que garante a viabilidade deste mutante.

Já a mutante brt é caracterizada por apresentar raízes mais curtas e com grande número de ramificações laterais (Zobel, 1991). Este fenótipo é muito semelhante com aquele apresentado pelas plantas transgênicas de outras espécies com baixos níveis de citocinina endógenas devido à superexpressão do gene para citocinina oxidase (Werner *et al.* 2001). Uma vantagem deste modelo de tomateiro é o fato de apresentar tamanho reduzido (8cm) e rápido desenvolvimento. Para atribuir valores consistentes às análises de expressão realizadas, a coleta de resultados foi realizada juntamente com plantas de Lp e Tom que não apresentam alterações nas

respostas a auxinas e citocininas e portanto consideradas como controle experimental (Meissner *et al*, 1997).

Pino-Nunes, 2005

Figura 24. Fenótipos das mutantes dgt e brt. Ambas as mutantes possuem o background genético de *Lycopersicon esculentum* variedade Micro-Tom. **A** à direita: mutante dgt, que possui baixa sensibilidade à auxina; à esquerda: Le variedade Micro-Tom. **B** à direita: mutante brt, que possui baixa sensibilidade à citocinina; à esquerda: Le variedade Micro-Tom.

Nossos resultados apontam que em plantas dgt não há expressão de Retrolyc1A nas raízes de plantas de 40 dias, no entanto, observa-se atividade transcricional deste elemento na mutante brt e em plantas Tom e Lp. Este resultado sugere que o balanço citocinina/auxina seja relevante na modulação da expressão de Retrolyc1A. Dessa forma a baixa produção de citocinina na mutante brt favoreceria um aumento da concentração relativa de auxina nas raízes o que induziria a atividade de Retrolyc1A. Ou ainda que um sensor comum do balanço citocinina/auxina seria o responsável pela indução de Retrolyc1A uma vez que as resposta são estritamente

complementares quando se compara a expressão de *Retrolyc1A* em ambos os mutantes.

Esta hipótese é consistente com os demais resultados apresentados neste trabalho nos quais se verifica que AIA é capaz de induzir a atividade do promotor de *Retrolyc1A*. Além disso, resultados anteriores mostram que em raízes laterais emergentes de fumo transgênico há aumento da atividade do promotor de *Retrolyc1A* (dados não mostrados), fato que relaciona diretamente a ativação do elemento por AIA e sugere sua eventual associação com este hormônio durante a diferenciação de raízes laterais (Taiz & Zeiger, 1991). Dessa forma, segundo o modelo proposto, a mutante *dgt* por apresentar pouca sensibilidade à auxina não promoveria a indução de *Retrolyc1A* nas raízes laterais, e de fato o fenótipo desta mutante apresenta essencialmente a raiz principal e poucas adventícias (Fig.24). Fenótipo inverso é observado em *brt*, assim nesta mutante o balanço auxina/citocinina favorece a concentração de auxina que promove o aumento das raízes laterais (Fig.24) e, conseqüentemente o aumento dos transcritos de *Retrolyc1A* observados.

Fora o envolvimento das auxinas no desenvolvimento de raízes, essas apresentam também um papel relevante no ciclo celular, sendo considerado um indutor de efeito primário. Auxina é capaz de promover a entrada no ciclo em G1 (Buchanan, 2000). Fato que corrobora com os nossos resultados em que demonstramos o efeito da auxina na indução de *Retrolyc1A* e o aumento da atividade da região promotora deste mesmo elemento nas fases G1 e S de células sincronizadas (Fig. 25).

Figura 25. Modelo de expressão de Retrolyc1 e Tnt1 ao longo do ciclo celular. O Diagrama do ciclo celular, em vermelho a fase S, azul a fase G2, laranja a fase M e em verde a fase G1. A atividade dos elementos Retrolyc1 e Tnt1 é menor durante das fases G2/M, enquanto que há aumento na expressão na fase G1/S.

Já a análise da parte aérea mostra que a expressão de Retrolyc1A em dgt é semelhante àquela encontrada em Tom e em Lp, mas não é observada atividade em brt. Este fato corrobora com a hipótese inicial de que o balanço Auxina/Citocinina atue na modulação de Retrolyc1A.

A mutante dgt apresenta alterações no nível de expressão de alguns membros da família gênica Aux/AIA (Nebenführ et al. 2000; Balbi & Lomax 2003). Em tomate, Wang e colaboradores (2005) caracterizam alguns membros da família multigênica Aux/IAA como fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento de fruto e morfologia foliar. Seriam membros dessa família de fatores de transcrição os responsáveis pelo reconhecimento e indução da região promotora U3A de Retrolyc1?

Nota-se também nessa mutante uma alteração nos transcritos dos genes que codificam para a enzima ACS (1aminociclopropano1-ácido

carboxílico sintase). Esta enzima catalisa o primeiro passo sujeito à forte regulação da biossíntese de Etileno. O estudo da região promotora utilizando programas disponíveis na rede (www.plantcare.org) encontrou seqüência que são reconhecidas por fatores de transcrição ativados por Etileno (dados não mostrados). Além disso o elemento TLC1, semelhante a Retrolyc1A, é fortemente induzido por etileno . Dessa forma a alteração do nível de expressão encontrada na figura 23 pode ser tanto devido a baixos níveis de transcritos dos genes induzidos por auxina, como também pela baixa concentração de Etileno.

Já o tecido reprodutivo mostrou que há transcritos de Retrolyc1A em flores tanto em Micro-Tom quanto em Lp. Este resultado está de acordo com análise da região promotora de Retrolyc1A em plantas de fumo transgênicas (Fig.7), em que houve a ativação da região U3A nas estruturas reprodutivas de fumo incluindo pétalas, estigma e anteras. Além disso, Costa e colaboradores (manuscrito em preparação) estudaram o padrão de inserção de Retrolyc1A em diferentes backgrounds genéticos de tomate. Fragmentos identificados como polimórficos entre as linhagens estudadas que resultam de padrão de inserção distintos contém genes relacionados com o processo de floração próximos de inserções ou interrompidos por Retrolyc1A o que aproxima a expressão do elemento aos genes de floração.

A relação entre auxina/citocinina e o desenvolvimento de frutos é bem conhecida desde o início do século passado (Gustafson, 1937). No entanto, os detalhes moleculares e bioquímicos ainda permanecem pouco conhecidos. Balbi V. e colaboradores (2003) buscaram esclarecer esta relação estudando a regulação no início do desenvolvimento do fruto de tomate em plantas mutantes para o gene *dgt* em background genético de *Lycopersicon esculentum* var Mill. Neste trabalho eles mostraram que dos 8 membros da família gênica ACS somente o membro ACS7 não foi detectado em frutos

imaturos de dgt. Já os transcritos de ACS1B, 3 e 5 estão presentes em baixa concentração.

Além disso, foi analisada a influência da família gênica Aux/AIA durante o desenvolvimento dos frutos de tomate dgt. Os membros Aux/AIA2,10 e 11 são detectados tanto em fruto de tomate selvagem quanto mutante nos estágio de fruto imaturo, enquanto Aux/AIA8 é constitutivamente expresso em ambos os frutos durante todo o desenvolvimento. A diferenciação do nível de transcrição de genes associados à rota de sinalização mediada por AIA entre distintos estágios de fruto de tomate dgt e a influência deste hormônio na ativação de Retrolyc1A (Fig14) sugere que este retrotransposon possa estar associado também à formação dos frutos de tomate induzidos por AIA.

De modo geral, os resultados aqui apresentados permitem formular um modelo genético-fisiológico da ativação de Retrolyc1A que difere de Retrolyc1B. Neste modelo Retrolyc1A acompanha o desenvolvimento vegetal, em particular nas células que estão em fase de divisão celular ativa assim como nos tecidos onde a auxina endógena é fundamental para a organogênese correta (raízes e frutos).

Considerando-se os aspectos evolutivos, seria interessante identificar qual o processo evolutivo que permite a variação e seleção das regiões U3 nesta família de retrotransposons. A análise genética iniciada pelo presente trabalho aborda questões fundamentais do controle da atividade de elementos de transposição ainda não elucidados. Os resultados obtidos permitem sugerir duas rotas distintas de sinalização para a indução de Retrolyc1A e Retrolyc1B.

Tabela IV. Quadro resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

Retrolyc1 A	Retrolyc1 B
<i>Atividade da região promotora é induzida por salicilato de sódio</i>	<i>Atividade da região promotora é induzida por celulase.</i>
<i>Atividade da região promotora é induzida por AIA</i>	<i>Atividade da região promotora é induzida por 2,4D e por AIB.</i>
<i>Resultado de expressão com a mutante dgt confirma os resultados obtidos com AIA</i>	<i>O padrão de expressão em dgt não é alterado</i>
<i>Resultado de expressão com brt sugerem que o balanço citocinina/auxina esteja modulando Retrolyc1A</i>	<i>O padrão de expressão em brt não é alterado.</i>

VI. Conclusão

1. Região promotora de Retrolyc1B é um promotor funcional.
2. Retrolyc1A e Retrolyc1B apresentam perfis de expressão distintos quando as células são expostas a moléculas mediadoras de resposta a defesa vegetal.
3. Auxinas naturais e sintéticas modulam diferentemente a atividade de expressão Retrolyc1A e Retrolyc1B.
4. Retrolyc1B é induzido pelo tratamento com celulase e Retrolyc1A é induzido por salicilato de sódio.
5. A expressão de Retrolyc1 e Tnt1 é modulada ao longo do ciclo celular, sendo a expressão aumentada nas fases G1 e S e reprimida em fase G2.
6. A expressão de Retrolyc1A em mutantes hormonais nas vias de auxina e citocinina sugerem a modulação positiva por auxina e sugerem uma modulação negativa por citocinina.

VII. Resumo

Retrolyc1 é um retrotransposon isolado de uma biblioteca genômica de *L.peruvianum* (*Solanaceae*). Análise da região promotora U3 deste elemento indicou a presença de duas subfamílias Retrolyc1A e Retrolyc1B que diferem entre si principalmente pela presença ou ausência de motivos repetidos (Araujo et al., 2001). Este trabalho teve como objetivo geral demonstrar a atividade transcricional de Retrolyc1 A e Retrolyc1B.

Os resultados obtidos demonstram que região promotora de Retrolyc1B é um promotor funcional. Sendo que os perfis de expressão de Retrolyc1A e Retrolyc1B são distintos quando induzidos por moléculas mediadoras de resposta a defesa vegetal. Diferenças no perfil de expressão de Retrolyc1A e Retrolyc1B também são encontradas durante o tratamento auxinas naturais e sintéticas.

A expressão de Retrolyc1 e do retrotransposon similar à Retrolyc1, Tnt1, é modulada ao longo do ciclo celular. Análises apontam aumento da expressão destes elementos nas fases G1/S. Já o estudo da expressão de Retrolyc1A em mutantes hormonais nas vias de auxina e citocinina reforçam a modulação positiva por auxina e sugerem uma modulação negativa por citocinina.

Os resultados descritos sugerem a via de ativação de Retrolyc1A difere de Retrolyc1B. Sendo que Retrolyc1A possui sua expressão modulada durante o desenvolvimento vegetal, em particular nas células que estão em fase de divisão celular ativa assim como nos tecidos onde a auxina endógena é fundamental para a organogênese correta (raízes e frutos).

VIII. Abstract

Retrolyc1 is a retroelemento originally isolated from genomic library of *L. peruvianum* (*Solanaceae*). Analysis based on promoter region of this element indicated that Retrolyc1 are composed of two subfamilies Retrolyc1A and Retrolyc1B (Araujo et al., 2001). This study aimed to demonstrate the transcriptional activity of Retrolyc1 A and Retrolyc1B.

The results showed the promoter region of Retrolyc1B is functional. In addition, the expression pattern of Retrolyc1A and Retrolyc1B are different when they were induced by signaling molecules of plant defense response. The activity of promoter region of these elements is also activated during the treatment with natural and synthetic auxin. The expression analysis of Retrolyc1 and Tnt1 showed modulation along the cell cycle. Both elements have transcription level increased in phases G1 / S.

In order to analyze the modulation of Retrolyc1A by hormone, its transcription level was analyzed in tomato mutants. The lower expression of Retrolyc1A in roots of mutants with defective perception in auxin pathway (dgt) and higher in defective cytokinin pathway (brt), reinforce the positive modulation by auxin and suggest a negative modulation by cytokinin.

Our results suggest the route of activation of Retrolyc1A differs from Retrolyc1B. The expression of Retrolyc1A has been modulated during plant development, especially in cells in the process of cell division and active in the tissues where the endogenous auxin is essential for the correct organogenesis (roots and fruits).

IX. Referências Bibliográficas.

Araújo PG, Casacuberta JM, Costa APP, Hashimoto RY, Grandbastien MA & Van Sluys, MA Retrolyc1 subfamilies defines by different U3 LTR regulatory region in the *Lycopersicon* genus. *Mol. Genet Genomics* . 2001 , Vol. 266 , pp.35-41 .

Balbi V. & Momax TL. Regulation of Early Tomato Fruit Development by *goageotropica* gene *Plant Physiology* . 2003 , Vol. 131 , pp.186-197 .

Beguiristain T, Grandbastien MA., Puigdom'enech, Casacuberta J. Three Tnt1 subfamilies show different Stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants . *Plant Physiology* . 2001 , Vol. 127 , pp.212-221 .

Bennetzen JL. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants . *Genetica* . 2002 , Vol. 115 , pp.29-36 .

Budiman MA, Mao L, Wood TC, Wing RAA deep-coverage tomato BAC library and prospects towards development of an STC framework for genome sequencing . *Genome Res* . Vol. 10 , pp.129-136 .

Bundock P, Hooykaas P An Arabidopsis hAT-like transposase is essential for plant development . *Nature* . 2005 , Vol. 436 , pp.282-284 .

Casacuberta J.M. e Santiago N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene*. 2003, Vol. 311, pp. 1-11.

Costa APP, Scortecchi KC, Hashimoto RY, Araújo PG, Grandbastien MA, Van Sluys MA Retrolyc1-1, a member of the Tnt1 retrotransposon super-family in the *Lycopersicon peruvianum* genome . *Genetica* . 1999 , Vol. 107 , pp.65-72 .

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. 2007; 315:207–12

Cordaux R., Swalpa Udit, Mark A. Batzer, and Cédric Feschotte. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element *Proc Natl Acad Sci USA* May 3, 2006 (1-6);

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A Plant DNA mini preparation cersion II. *Plant Mol Biol*. 1983. Col.1. pp 19-23.

Devos KMBrownJKM, Bennetzen JL. Genome Size Reduction through illegitimate recombination Counteracts Genome Expansion in Arabidopsis . *Genome Res.* 2002 , Vol. 12 , pp.1075-1079 .

Doolittle, W. F. and Sapienza, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601–3. 1980.

Eickbush TH Telomerase and retrotransposon: which came first? *Science* . 1997 , Vol. 277 , pp.911-912 .

Feschotte C JiangN, Wessler R, Plants transposable elements: where genetics meets genomics . *Nature Reviews* . 2002 , Vol. 3 , pp.329-341 .

Feschotte C PrithanEJ. DNA transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes . *Annu Rev. Genet* . 2007 , Vol. 41 , pp.331-68 .

Fujino DW, Nissen SJ, Jones AD, Burher DW & Bradford. Quantification of índole-3-acetic acid in dark-frown seedling of the diageotropica and episnastic mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Physiol.* 1988, pp780-784.

Grandbastien M.A, Spielmann A. & Caboche M. (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tabacco isolated by plant cell genetics. **Nature** 337: 376-80.

Grandbastien M.A. (1998). Activation of plant retrotransposon under stress conditions. *Trends Plant Sci.* 3: 181-187.

Grandbastien M.A., Audeon C., Casabuberta J., Grappin P., Lucas H., Moreau C. & Pouteau S. (1994). Functional analysis of the tobacco Tnt1 retrotransposon. *Genetica* 93: 181-189

Grandbastien M.A., Lucas H., Morel J.B., Mhiri C. Vernhettes S. & Casacuberta J. (1997) The espression of tabaco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense response. *Genetica* 100: 241-252.

Grandbastien MA, Audeon C, Bonnivard E., Casacuberta JM, Chalhoud B., Costa APP, Le QH, Melayah D., Petit M., Poncet C., Tam SM, Van Sluys MA e Mhiri C. (2005). Stress activation and Genomic impact of Tnt1 retrotransposon in Solanaceae. *Cytogenet Genome Res* 110:229-241.

Goodwin T ButlerMI, Poulter RT, Cryptons: a group of tyrosine-recombinase encoding DNA transposon from pathogenic fungi. *Microbiology* . 2003 , Vol. 149 , pp.3099-3109 .

Gustafson FG . Parthenocarpy induced by pollen ewtracts. Am J Bot.1937. Vol. 37, pp.102-107.

Halin VC, Vess A, Scheel D & Rosahl S. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. Plant Biol. 2006. Vol8 (3), pp 307-13

Hashimoto-Miura RY. 2004. Analise do perfil de expressão de Retrolyc1A em *Lycopersicon esculentum* e em *Lycopersicon peruvianum*. Universidade de São Paulo, tese de doutorado.

Hirochika HOkamotoH, Kakutani TSilencing os retrotransposon in Arabdopsis and reactivation by the ddm1 mutations . *Plant Cell* . 2000 , Vol. 12 , pp.357-368 .

Hirochika H., Otsuki H., Yoshikawa M., Otsuki Y. Sugimoto K. & Takeda S. (1996). Autonomous Transposition of the Tobacco Retrotransposon Tto1 in Rice. *The Plant Cell*. 8:725-734.

Hirochika H (1993) activation of tobacco retrotransposons during tissue culture.EMBO J 12:2521-2528

Jefferson RA (1987).Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fursion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, V.5 p 387-405.

Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E & Schuman Ah (2000) Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dymanics in reponse to sharp microclimic divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6603-6607

Kimura Y, Tosa Y., Shimada S. Sogo R. et al. *OARE-1*, a *Ty1-copia* Retrotransposon in Oat Activated by Abiotic and Biotic Stresses. *Plant Cel Physiology*. 2001. Vol. 42, pp. 1345-1354

Kidwell MGLischDR,Transposable elements and host genome evolution . *Trends Ecol. Evol.*2000 , Vol. 15 , pp.95-99 .

Kumar ABennetzenJL,Plant Retrotransposon . *Annu Rev Genet* . 1999 , Vol. 33 , pp.479-532 .

Manetti ME. 2007. Caracterização de retrotransposons similares a Tnt1 em espécies silvestres e cultivadas do gênero *Solanum* Universidade de São Paulo, tese de doutorado.

McClintock B Controlling elements and the gene . *Cold Spring Harbor Symp. Quant Bio.* 1956.Vol. 21 , pp.197-216 .

McClintock B The significances of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984. Vol 226, pp. 792–801.

Meissner R., Jacobson Y., Melamed S., Levyatuv S., Shalev G., Elkind Y., e Levy A. A new model system for tomato genetics. *Plant J.* 1997.Vol 12, pp1465-1472.

Mhiri C., Morel J.B., Vernhettes S., Casacuberta J. M., Lucas H. & Grandbastien M.A. The promoter of tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol Biol.* 1997. Vol. 33: 257-66.

Mhiri C, De Wit PJGM, Grandbastien M-A. Expression of the Tnt1 retrotransposon in tomato . *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. Vol. 96, pp 7409-7414.

Moreau-Mhiri C, Morel J, Audeon C, Ferault M, Grandbastien MA & Lucas H (1996). Regulation of expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in heterologous species following pathogen-related stresses. **Plant J** 9:409-419

Nebenführ A, White TJ & Lomax TL. The diageotropica mutation alters auxin induction of subset of the Aux/IAA gene family in tomato. *Plant Mol Biol.* 1998. Vol. (16), pp 323-339.

Norma K., Ohtsubo E. & Ohtsubo H. (1999). Non-LTR retrotransposon LINEs are ubiquitous components of plant genomes.*Mol Gen. Genet.* 261: 71-79.

OrgelWF& Crick, FH.Selfish DNA: the ultimate parasite . *Nature* . 1980 , Vol. 284 , pp.604-607 .

Piegu BGuyotR, Picault N, Roulin A, Saniyal HK, Collura K, Brar D, Jackson S, Wing RA & Panaud O.Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposon-driven genomic expansions in *Oriza australiensis*, a wild relative of rice.*Genome Research* . 2006 , Vol. 16 , pp.1262-1269 .

Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J.* 1995. Vol 308, pp697–711.

Pino-Nunes, LE. 2005. Obtenção e uso de mutantes com alterações no balance Auxina/Citocinina no estudo da competência organogênica em Micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom). Universidade de São Paulo, dissertação de mestrado.

Pouteau S, Grandbastien MA, Boccara M (1994) Microbial elicitors of plant defense responses activate transcription of a retrotransposon. **Plant J** 5:535-542

Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA & Caboche M (1991). Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplast .*EMBO J* 10:1911-1918

Rogers SAPaulsKPTy1-copia-like retrotransposons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill).*Genome* . 2000 , Vol. 43 , pp.887-894 .

San Miguel PBennetzenJL, Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons . *Annals of Botany* . 1998 , Vol. 82 , pp.37-44 .

Shi XSeluanovA, **Gorbunova V**Cell Divisions are required for L1 retrotransposição . *Mol. Cell. Biol* . 2007 , Vol. 27 , 4 , pp.1264-1270 .

Smit AF Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes . *Curr. Opin. Genet. Dev.*1999 , Vol. 9 , pp.657-663 .

Sugimoto K, Takeda S. & Hirochika H (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes.*Plant Cell* 12:2511-2528

Suoniemi A., Tanskanen J. & Schulman A.H. (1998). Gypse-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. *Plant J.* 13:699-705

Taiz L. & Zeiger, E. **Plant Pshysiology**. 1 ed. Suderlands: Sinauer, 1991.

Tapia G, Verdugo I, Yanez M, Ahumada I, Theoduloz C, Cordero C, Poblete F, Gonzalez E, Ruiz-Lara S. 2005. Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC1.1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun.*Plant Physiol.* 2005 Aug;138(4):2075-86.

Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H. & Hirochika H. (1998). Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon Tto1 by wounding and methyl jasmonate. **Plant Mol. Biol.** 36:365-376.

Toth MGrimsbyJ, **Vuzsaki G, Donovan G**Epilptic seizures caused by inactivation of a novel gene, jerky, related to centromere binding protein-B in transgenic mice . *Nat Genet* . 1995 , Vol. 11 , pp.71-75 .

Van Sluys M.A. (2002) **Elementos Transponíveis e seu impacto no genoma das plantas**. Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Livre Docência

Van Sluys M.A., Scortecci K.C., Costa A.P.P. (2001) O Genoma instavel, sequencias gnéticas móveis. In Mاتيoli S.R. (ed) **Biologia Molecular e Evolução**. Capitulo 7, Holos Editora, p70-81.

Vernhettes S, Grandbastien MA, Casacuberta JM The evolutionary analysis of the Tnt1 retrotransposon in *Nicotiana* species reveals the high variability of its regulation sequences . *Mol Biol Evol* . 1998 , Vol. 15 , pp.827-836 .

Vicient et al Retrotransposon BARE-1 and its role in genome expansion in the genus *Hordeum* . *Plant Cell* . 1999 , Vol. 11 , pp.1769-1784

Vitte C, Bennetzen JL Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 21;103(47)

Volff JN Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes . *BioEssays* . 2006 , Vol. 28 , pp.913-922 .

Voytas D.F., Cummings M.P. Konieczny A., Ausubel F.M & Rodermeel S.R. Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89, pp7124-28.

Wang H, Jones B, Li Z, et al. The Tomato *Aux/IAA* Transcription Factor *IAA9* Is Involved in Fruit Development and Leaf Morphogenesis *Plant Cel*. 2005. Vol. 17. Pp. 2676-2692.

Werner, T., Motyka, V., Strnard M, Schmülling T. Regulations of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, pp10487-10492.

Wicker et al A unified classification system for eukaryotic transposable elements . *Nature Reviews* . 2007 , Vol. 8 , pp.973-982 .

Yañez M, Verdugo I, Rodriguez M, Prats S, Ruiz-Lara S Highly heterogenous families of Ty1/copia retrotransposon in the *Lycopersicon chilense* genome . *Gene* . 1998 , Vol. 222 , pp.223-228 .

Zhou L, Mitra R, Atkinson PW, Hickman AB, Dyda F Transposition of hAT elements links transposable elements and V(D)J recombination. *Nature* . 2004 , Vol. 432 , pp.995-1001 .

Zobel, R.W. Genetic control of root systems. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A. (Eds). **Plant roots: the hidden half**. New York: Basel; Hong Kong: Marcel Dekker, 1991, pp27-38.