

Daniela Kajihara

**Caracterização dos genes *mustang* em gramíneas com ênfase no estudo funcional em cana-de-açúcar**

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

Orientadora: Maria Magdalena Rossi

São Paulo

2010

## RESUMO

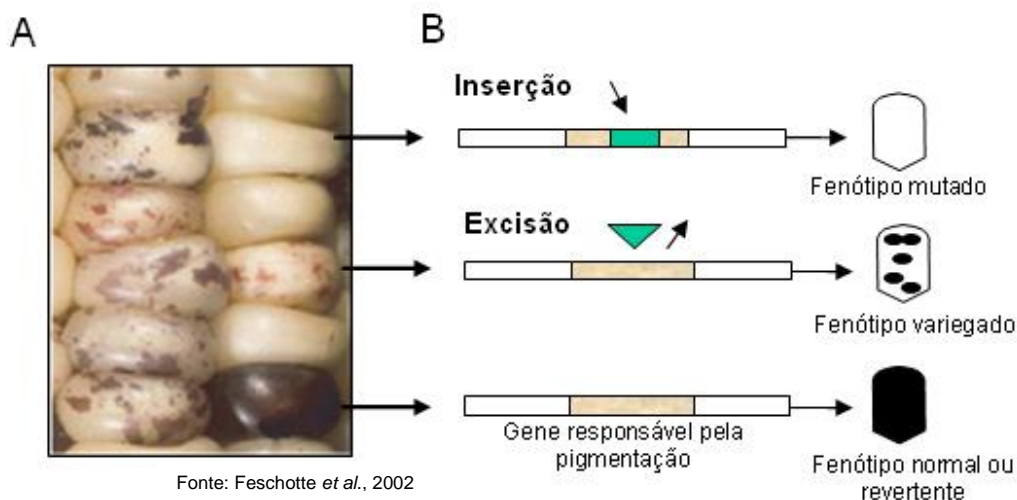
Os elementos transponíveis constituem grande parte do genoma das plantas, particularmente em gramíneas, constituem entre 50 a 80% do conteúdo genômico. Recentemente, foi demonstrado que estes elementos servem como fonte de material genético para a formação de novos genes e novas redes regulatórias. O SUCEST, projeto de seqüenciamento de ESTs de cana-de-açúcar da FAPESP, gerou a seqüência parcial de 237.954 mRNA de diversos tecidos e condições fisiológicas, fornecendo valiosa informação sobre o transcriptoma deste cultivo. Um levantamento dos elementos transponíveis nesse genoma mostrou que o transposon *Mutator* é o mais expresso. A superfamília *Mutator* foi amplamente estudada em cana-de-açúcar, arroz e *Arabidopsis thaliana* e se constatou que o sistema está composto por dois clados de transposons “verdadeiros” (Classe I e Classe II) e dois clados de transposases domesticadas (Classe III e Classe IV), chamadas *mustang*. As transposases domesticadas são seqüências derivadas de transposons, que perderam a capacidade de se mobilizar, e adquiriram função celular. Recentemente, foram clonadas e seqüenciadas, pelo nosso grupo, duas cópias genômicas da Classe III e uma da Classe IV. Para somar evidências que permitam desvendar a função das proteínas MUSTANG, este trabalho realizou uma análise comparativa destes genes em gramíneas assim como o estudo da atividade transcricional em cana-de-açúcar. Desta forma, foram identificados os *loci* ortólogos no genoma de sorgo e milho, e foi possível verificar que os genes *mustang* são altamente conservados. As putativas regiões regulatórias dos genes de cana-de-açúcar apresentaram diversos motivos de união a fatores de transcrição envolvidos na resposta a luz, hormônios e estresse. Fusões com genes repórteres permitiram demonstrar que as regiões estudadas são promotores transcricionais ativos. Adicionalmente, a obtenção de linhagens de células de fumo transgênicas viabilizou experimentos que permitiram revelar que os promotores dos

genes *mustang* são modulados por fitohormônios. O perfil transcricional para ambas as classes revelou que estes genes são expressos de forma ubíqua, sendo o meristema o tecido que apresenta maiores níveis relativos de mRNA. A análise integrada dos resultados obtidos sugere o possível envolvimento das proteínas MUSTANG na manutenção da homeostase da resposta hormonal.

## I. Introdução.

### 1. Elementos de transposição (TEs).

Os elementos transponíveis (TEs) são segmentos de DNA (500bp-10.000pb) capazes de mudar de posição e/ou propagar-se no genoma (Okamoto e Hirochika 2001). Os TEs foram primeiramente descritos em milho, pela citogeneticista Barbara McClintock na década de 40, devido ao seu envolvimento na origem de mutações instáveis. Ela os denominou de “elementos controladores do gene” pelo fato de modularem a expressão dos genes aos quais estavam associados, observando a influência dos transposons no fenótipo variegado de grãos de milho (Figura1). Este fenótipo variegado é visível devido à inserção e posterior excisão de um transposon em um gene responsável pela pigmentação dos grãos de milho, causando a interrupção do seu produto gênico e posterior restabelecimento da pigmentação. Desde os primeiros ensaios McClintock já observava a alternância de fases de quiescência e reativação de transposons em milho (McClintock 1956).



**Figura 1.** (A) Grãos de milho apresentando fenótipo variegado devido à atividade de um elemento de transposição. (B) Representação esquemática da inserção de um elemento de transposição (verde) em um gene responsável pela pigmentação. A inserção do TE promove a inativação do gene, produzindo um fenótipo mutado. Dependendo do estágio de desenvolvimento do grão no momento da excisão, o restabelecimento da expressão gênica normal leva à reversão total ou a um fenótipo variegado.

Centenas de genomas eucariotos têm sido seqüenciados, analisando esses dados do ponto de vista filogenético os TEs se mostraram ubíquos, e enquanto o número de genes apresenta pouca diferença, a quantidade e diversidade dos elementos é altamente variável (Pritham 2009). Os TEs constituem a maior parte do DNA repetitivo presente no genoma de plantas e animais, constituindo cerca de 45 % do genoma humano e 50 a 80% em genomas vegetais (Feschotte *et al.* 2002).

Dependendo do intermediário utilizado para sua transposição, os TEs são divididos em duas classes. A Classe I, ou retrotransposons, são elementos que se mobilizam através de um intermediário de RNA que é reverso transcrito em uma cópia de DNA que posteriormente é inserida no genoma. Este mecanismo é chamado de “copia e cola”. Os elementos de Classe II, ou transposons, se mobilizam através de um intermediário de DNA, na sua maioria, utilizam um mecanismo do tipo “corta e cola” pelo qual o fragmento de dupla fita de DNA se excisa do genoma e se reinsere em uma nova posição do genoma (Pritham 2009). Em ambas as classes existem elementos não-autônomos e autônomos. Os elementos autônomos codificam todas as enzimas necessárias para a sua mobilização, enquanto que os elementos não-autônomos são mutantes, dependendo inteiramente da maquinaria enzimática dos elementos autônomos para se transpor (Feschotte *et al.* 2002).

Para facilitar a anotação da crescente quantidade de dados que está sendo gerada sobre TEs, os elementos da Classe II ou transposons, em organismos eucarióticos são divididos em duas subclasses. A Subclasse I compreende aqueles transposons clássicos que se mobilizam pelo mecanismo de “corta e cola” gerando quebras na dupla fita de DNA durante o processo de transposição. Os elementos de tipo *Helitrons* e *Mavericks* pertencem à Subclasse II. Enquanto que os *Helitrons* possuem um mecanismo de replicação do tipo círculo rolante, os *Mavericks* utilizam uma DNA polimerase própria (Sinzelle *et al.* 2009, Pritham 2009). Os elementos

autônomos da Subclasse I são caracterizados por codificar uma transposase e pela presença das inversões terminais repetidas flanqueando o elemento (TIRs). Durante o ciclo de transposição, um domínio de união ao DNA (DBD) no extremo N-terminal da transposase reconhece as TIRs, e o sítio catalítico no extremo C-terminal quebra e mobiliza o elemento. O sítio catalítico está determinado pelo domínio constituído pelos aminoácidos DDE (Haren *et al.* 1999). Dependendo da seqüência das TIRs, dos motivos protéicos entre elas, e do comprimento das duplicações do sítio de inserção (TSDs) geradas após a transposição, esta subclasse apresenta nove superfamílias descritas (Tabela 1) (Sinzelle *et al.* 2009). Um estudo recente demonstrou que os genes que codificam transposases são os mais abundantes da natureza (Aziz *et al.* 2010).

Diversas evidências indicam que o tamanho do genoma está diretamente correlacionado com a presença de retrotransposons, pois de acordo ao seu mecanismo de transposição, após cada ciclo, eles aumentam o número de cópias. No entanto, essa premissa não se aplica para os transposons que se mobilizam, majoritariamente através de mecanismos conservativos (Feschotte e Pritham 2007, Devos 2010).

**Tabela 1. Propriedades estruturais e moleculares das nove superfamílias de DNA transposons pertencentes à subclasse I.**

| Superfamília         | Ocorrência                    | Tamanho (kb) | TIRs (bp)     | TSDs (bp)      | Proteínas codificadas   | DBD           | Núcleo catalítico |
|----------------------|-------------------------------|--------------|---------------|----------------|-------------------------|---------------|-------------------|
| <i>Tc1/mariner</i>   | Eucariotos                    | 1,2 - 5,0    | 17-1100       | 2 (TA)         | Tnp                     | HTH           | (DDE) Tnp         |
| <i>hAT</i>           | Eucariotos                    | 2,5 - 5,0    | 5-27          | 8              | Tnp                     | BED ZnF       | (DDE) Tnp         |
| <i>Mutator</i>       | Eucariotos                    | 1,3 - 7,4    | 0 - vários kb | 9-11           | Tnp                     | WRKY/GCM1 ZnF | (DDE) Tnp         |
| <i>Merlin</i>        | Animais e eubacteria          | 1,4 - 3,5    | 21-462        | 8-9            | Tnp                     | nd            | (DDE) Tnp         |
| <i>Transib</i>       | Metazoários e fungos          | 3 - 4        | 9-60          | 5              | Tnp                     | nd            | (DDE) Tnp         |
| <i>P</i>             | Plantas e metazoários         | 3 - 11       | 13-150        | 8              | Tnp                     | THAP ZnF      | nd                |
| <i>piggyBac</i>      | Eucariotos                    | 2,3 - 6,3    | 12-19         | 4 (TTAA)       | Tnp                     | nd            | nd                |
| <i>PIF/Harbinger</i> | Eucariotos                    | 2,3 - 5,5    | 15-270        | 3 (CWG ou TWA) | Tnp + proteína Myb-like | MyB/SANT      | (DDE) Tnp         |
| <i>CACTA</i>         | Plantas, metazoários e fungos | 4,5 - 15     | 10-54         | 2-3            | TnpA + TnpD             | nd            | nd                |

DBD: Domínio de ligação ao DNA, TSD: sítio alvo duplicado, Tnp: transposase e nd: não determinado. Adaptado de Sinzelle *et al.* 2009.

A sua natureza mutagênica, aliada a sua abundância, levanta o questionamento de como o hospedeiro mantém a sua viabilidade. Na verdade, a maioria dos TEs se encontra em estado quiescente, sendo ativados em condições fisiológicas específicas como estresses bióticos ou abióticos. Complexos mecanismos regulatórios estabelecem um equilíbrio que garantem a perpetuidade desses elementos no genoma hospedeiro (Lisch 2009). A transcrição é o primeiro ponto de controle da atividade dos TEs (Grandbastien *et al.* 2005). Por outro lado, a transcrição de um TE não se correlaciona necessariamente com a presença de novas inserções já que, para completar o ciclo de transposição, além da transcrição é necessário que ocorra a tradução do mensageiro, transcrição reversa no caso dos retrotransposons, e a integração em um novo local. A regulação em qualquer destes níveis limita a transposição (Slotkin e Martienssen 2007). Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação dos TEs envolvem interferência de RNA (RNAi) e alterações epigenéticas como a modificação pós-traducional de histonas levando à remodelação da cromatina (Sinzelle *et al.* 2009).

## **2. Impacto e domesticação dos TEs.**

Os TEs são comumente considerados “parasitas genômicos” e foram historicamente chamados de “DNA egoísta”. O seu ciclo de vida compreende a dispersão em diversas espécies, aumento do número de cópias, e se perpetuar no genoma hospedeiro até, finalmente, virarem fósseis perdendo a sua capacidade de replicação e mobilização. Durante a sua existência como elementos ativos, ao se transpor, os TEs geram mutações por inserção causando inativação gênica ou mudanças no padrão de expressão. Neste sentido, diversos trabalhos tem descrito exemplos nos quais TEs aportaram seqüências promotoras ou *enhancers* transcripcionais, sítios de *splicing* alternativo ou de poliadenilação, e motivos regulatórios

em *cis* (Bowen e Jordan 2002, Marino-Ramírez *et al.* 2005). Por outro lado, a presença de seqüências repetidas ao longo do genoma provê sítios de recombinação ilegítima gerando translocações, inversões e deleções. Um fenômeno interessante e amplamente descrito é a captura de fragmentos duplicados do genoma hospedeiro pelo TE dando origem a quimeras (Saccaro-Jr *et al.* 2007). Devido ao seu mecanismo de transposição replicativa, a atividade dos retrotransposons é um dos maiores fatores de variação no tamanho do genoma em plantas (Devos 2010).

As evidências expostas demonstram claramente o papel crucial que as seqüências móveis possuem na evolução dos genomas eucariotos. O mais drástico exemplo deste impacto é o processo descrito como “domesticação molecular” no qual seqüências derivadas de TEs dão origem a genes funcionais do hospedeiro (Benjak 2008). Alguns destes genes surgiram da fusão de um domínio funcional com uma transposase ou, nos casos mais extremos, da domesticação de uma transposase inteira. Neste último caso, o elemento perde as suas TIRs, perdendo assim a capacidade de se transpor, e adquire uma função celular. Estes genes são chamados de “transposases domesticadas”.

Como mencionado anteriormente, as transposases possuem dois domínios funcionais: o DBD e o catalítico. Embora muitas proteínas domesticadas provêm de uma transposase inteira e conseqüentemente mantém ambos os domínios, o DBD é o preferencialmente incorporado pelo hospedeiro e conseqüentemente a maioria das transposases domesticadas desempenham função de reguladores transcricionais (Feschotte 2008). Neste contexto, têm sido caracterizadas proteínas que atuam como fatores de transcrição (Yamashita *et al.* 2007, Butter *et al.* 2010), remodeladores da cromatina (Macfarlan *et al.* 2005), e até reguladores da tradução (Liu *et al.* 2003). Regularmente, o processo evolutivo de domesticação vem acompanhado da modificação do domínio catalítico DDE e as proteínas derivadas de transposons têm



demonstrado ser defectivas para complementar em *trans* a transposição de elementos não-autônomos. A única exceção até o momento descrita é o caso da proteína RAG1 envolvida na recombinação somática responsável pela diversidade de imunoglobulinas das células T em humanos e outros vertebrados (Agrawal *et al.* 1998, Kapitonov e Jurka 2005). Levando em consideração os potenciais efeitos deletérios da atividade transposicional, tem sido proposto que as transposases domesticadas possam participar da regulação dos TEs correlatos, seja desencadeando o mecanismo de RNAi ou como antagonistas da atividade das transposases selvagens através da heterodimerização e conseqüente complementação negativa dominante (Rossi *et al.* 2004, Sinzelle *et al.* 2009).

Quando se discute sobre a origem de genes do hospedeiro derivados de elementos móveis é importante mencionar que a evolução frequentemente atua de maneira convergente e, conseqüentemente, é teoricamente possível que as transposases tenham surgido a partir de genes do hospedeiro. O argumento mais contundente para estabelecer esta relação evolutiva provê da árvore filogenética. Por exemplo, enquanto que as transposases domesticadas apresentam origem relativamente recente, os elementos relacionados possuem uma distribuição filogenética muito mais ampla podendo assim se inferir que os genes do hospedeiro surgiram a partir de uma transposase e não *vice versa* (Sinzelle *et al.* 2009).

Embora a maioria das transposases domesticadas não tenha sido completamente caracterizada ainda, em particular nas plantas alguns exemplos interessantes foram reportados. Como o gene *Daysleeper* descrito em *A. thaliana*, derivado do transposon *Activator* da superfamília *hAT*. Esta transposase domesticada reconhece o motivo Kubox1 presente em vários promotores vegetais, incluindo o gene da maquinaria de reparo de DNA *Ku70*. Plantas silenciadas ou que super expressam *Daysleeper* apresentam um padrão de desenvolvimento anormal e o perfil de

expressão gênica completamente alterado. Assim, foi demonstrado que este gene é um fator de transcrição mestre do qual depende o padrão morfogênético normal da planta (Bundock e Hooykaas 2005). O fitocromo A (phyA) media diversas respostas das plantas a estímulos luminosos. Em *A. thaliana* foram caracterizados os genes *fhy3* e *far1* que codificam proteínas relacionadas à transposase da superfamília *Mutator*. Estes dois genes atuam conjuntamente modulando a transdução de sinal do phyA ativando a transcrição dos genes *fhy1* e *fhl*, os quais são necessários para a acumulação do phyA ativado no núcleo da célula vegetal. Por sua vez, phyA regula negativamente a expressão de *fhy3* e *far1*. Este sistema apresenta um exemplo no qual uma proteína com atividade de união a DNA, altamente eficiente foi capturada pelo genoma vegetal para manter a homeostase da resposta à luz mediada pelo phyA (Lin *et al.* 2007). Finalmente, o produto do gene *rosina (rs)* de *Antirrhinum majus* foi identificado como uma proteína de união a DNA, que regula genes cujos promotores possuem o motivo CArG-box, como é o caso do gene *deficiens* que controla o desenvolvimento floral nessa espécie. RSI é uma proteína do transposon *Tam* pertencente à superfamília CACTA (Roccaro *et al.* 2007). Plantas transgênicas silenciadas para *rsi* apresentaram alterações morfológicas nas sementes, relacionando mais uma vez o desenvolvimento vegetal aos elementos genéticos móveis.

### **3. Superfamília *Mutator*.**

A superfamília *Mutator (Mu)* foi primeiramente relatada por Robertson (1978) em milho, e tem sido descrito como o mais ativo e mutagênico transposon em plantas descoberto até o momento. Devido a esta característica, *Mu* tem sido usado como uma ferramenta para a clonagem de genes por “transposon tagging” (Walbot 2000). Nos últimos dez anos, o sistema *Mutator* tem sido caracterizado em diversas espécies

vegetais como *Arabidopsis thaliana*, arroz e cana-de-açúcar (Yu *et al.* 2000, Saccaro-Jr *et al.* 2007).

O elemento autônomo da superfamília *Mutator*, *MuDR*, responsável pela mobilização do sistema, possui dois genes que são transcritos em sentido inverso: *mudrA* e *mudrB* (Figura 2). A região codificante está flanqueada por TIRs de 220 pb onde se localizam os promotores. O gene *mudrA* codifica para a transposase MURA, enzima responsável pela transposição, enquanto o produto de *mudrB* é requerido para a integração. No entanto, a presença de *mudrB* não é uma característica geral dentro da superfamília *Mutator* e foi encontrado somente nos elementos do gênero *Zea*.

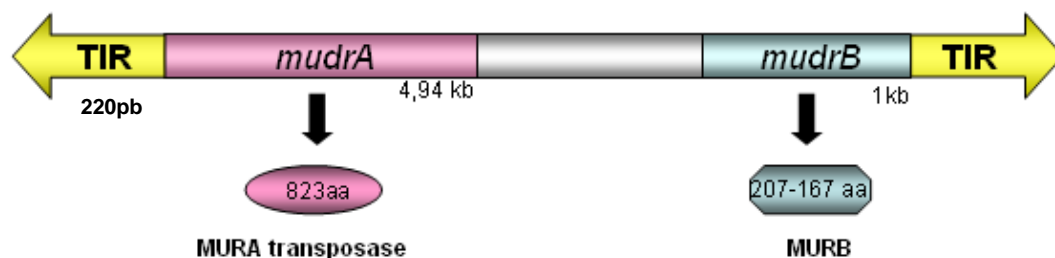


Figura 2. Estrutura do elemento autônomo *MuDR* de milho

Além do elemento autônomo, o sistema *Mutator* compreende um conjunto de elementos não autônomos altamente variáveis em seqüência e estrutura denominados *MuLEs* (*Mutator-like elements*). Estes representam à maioria dos elementos do sistema e dependem do autônomo para a sua transposição (Lisch 2002) (Figura 3). Enquanto que poucas linhagens de milho possuem elementos ativos, todos os genótipos portam elementos homólogos a *MuDR*, chamados de *hMuDRs* cujas regiões codificantes são entre 80 e 90 % idênticas ao elemento autônomo. Estes elementos são expressos e participam da regulação negativa do sistema através de mecanismos de silenciamento gênico transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS) (Rudenko & Walbot 2001, Slotkin *et al.* 2003). Quando além de *mudrA*, os elementos possuem um fragmento de DNA hospedeiro são chamados de *Transduplicated MuLEs* (Juretic *et al.* 2005). Em

alguns casos, os elementos apresentam, apenas DNA do hospedeiro entre TIRs, neste caso, são definidos como *Pack-MuLEs* (Jiang *et al.* 2004). Finalmente, os genes *mustang*, transposases domesticadas da superfamília *Mutator*, completam a diversidade do sistema. Estes genes, ao contrário de *far1* e *fhy3*, foram descritos tanto em espécies de mono quanto eudicotiledôneas (Cowan *et al.* 2005, Saccaro-Jr *et al.* 2007).

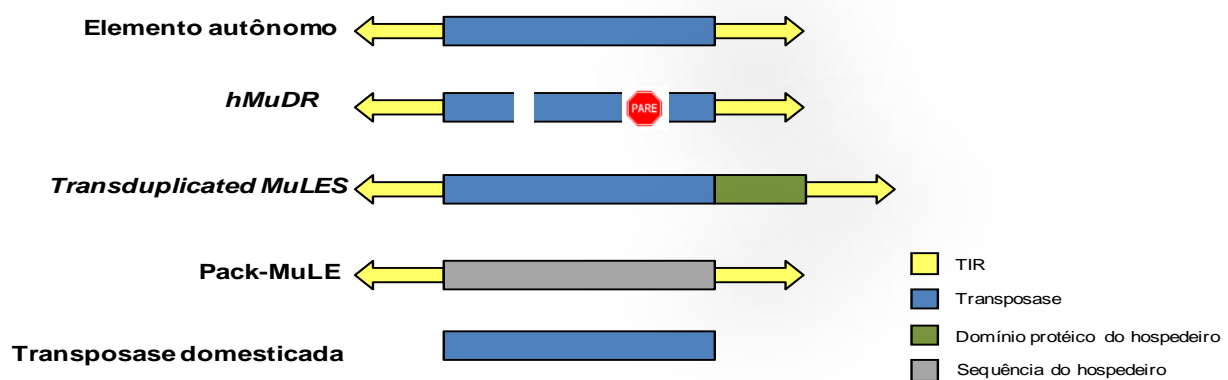


Figura 3. Os diferentes tipos de elementos que compõem o sistema *Mutator*

#### 4. A cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea cultivada em regiões tropicais e subtropicais destinadas principalmente a produção de açúcar e biocombustíveis, principalmente bioetanol. É uma das culturas mais importantes economicamente, e está juntamente com o milho, arroz e trigo, no topo mundial das *commodities* agrícolas com respeito a produtividade (Devos 2010).

Assim como o sorgo (*Sorghum bicolor*) e o milho (*Zea mays*), a cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae. Já outras gramíneas de importância agrônômica como o arroz (*Oryza sativa*) e o trigo (*Triticum aestivum*) pertencem às subfamílias Ehrhartoideae e Pooideae, respectivamente. Seis espécies de *Saccharum* (*S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S.*

*sinense* e *S. edule*) juntamente com espécies de gêneros próximos, formam o “complexo *Saccharum*”, a partir do qual surgiu a cana de açúcar cultivada (Mukerjee 1957, Daniels *et al.* 1975). De um ponto de vista prático, os recursos genéticos da cana-de-açúcar podem ser divididos em três grupos: (1) cultivares tradicionais, (2) espécies selvagens aparentadas, e (3) cultivares modernos (Grivet *et al.* 2004).

(1) Os cultivares tradicionais, descendentes dos primeiros domesticados, já não são cultivados para produção, mas utilizados como genitores dos cultivares modernos e constituem importantes fontes de germoplasma para a introdução de caracteres de interesse agrônômico. Estes incluem:

- O cultivar nobre *S. officinarum* ( $2n=80$ ), rico em açúcar e ainda utilizado na agricultura tradicional especialmente na Melanésia.

- As espécies *S. barberi* e *S. sinense* que eram comumente encontradas na Índia e China, respectivamente, onde provavelmente tenha-se originado a indústria açucareira. Estas possuem mais de 80 cromossomos e menores conteúdos de açúcar que *S. officinarum*.

- *S. edule* utilizado para consumo humano na Melanésia.

(2) As espécies selvagens aparentadas, genitores dos cultivares tradicionais incluem:

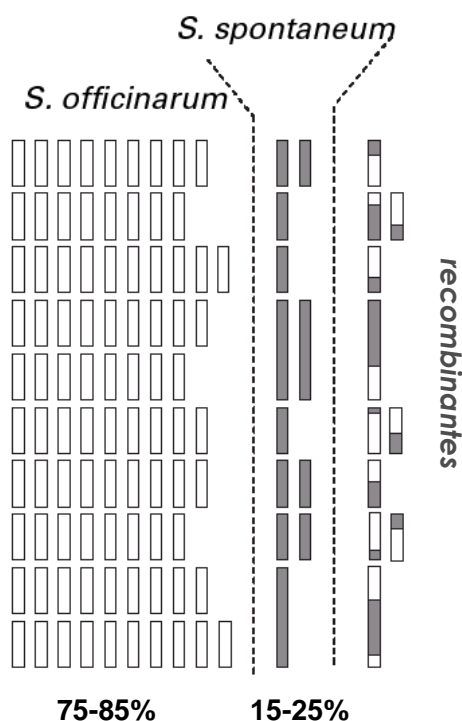
- *S. spontaneum* ( $2n=40-128$ ) possui baixo teor de açúcar e ampla distribuição geográfica, desde algumas ilhas do Pacífico, Melanésia e Ásia Tropical, passando pelo Médio Oriente até a África.

- *S. robustum* ( $2n=60$  ou  $2n=80$ ) praticamente não acumula açúcar e é encontrada na Melanésia.

- Espécies dos gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga*. Estes gêneros possuem ampla distribuição desde o Himalaia até a Melanésia. Uma particular concentração de espécies destes gêneros é encontrada no nordeste da Índia.

(3) Os cultivares modernos, que substituíram os tradicionais ao longo do século 20, foram produzidos através de cruzamentos artificiais entre *S. officinarum*, com alto teor de açúcar, e *S. spontaneum*, selvagem e vigorosa, seguidos de várias gerações de seleção clonal. Assim, foi possível aliar características como resistência a doenças e alta produção de açúcar. Desta maneira, os cultivares modernos possuem genomas complexos com entre 100 a 130 cromossomos, dos quais 15-25% provém de *S. spontaneum* e o restante de *S. officinarum*, são altamente poliplóides e apresentam aneuploidias (Figura 4) (D'Hont 2005).

A poliploidia tem sido o maior fator na evolução das linhagens de gramíneas devido ao aumento do número de genes, ativação de elementos transponíveis, alteração do panorama epigenético acarretando novos padrões de expressão gênica e potencial criação ou perda gênica (Kashkush *et al.* 2005). Apesar do alto nível de ploidia, o tamanho dos genomas monoplóides de *S. officinarum* e *S. spontaneum* está em torno de 930 e 750 Mpb, respectivamente; enquanto que o dos cultivares híbridos é de 1000 Mpb (D'Hont e Glaszmann 2001). Assim, para cada *locus* de cana-de-açúcar há em torno de 12 cópias ou haplótipos, a maioria proveniente do genitor *S. officinarum*, alguns de *S. spontaneum* e outros recombinantes.



**Figura 4. Representação esquemática do genoma dos cultivares modernos de cana-de-açúcar.** Barras brancas e cinzas correspondem aos cromossomos provenientes de *S. officinarum* e *S. Spontaneum*, respectivamente (Adaptado de D'Hont, 2005).

Em 1999, uma iniciativa da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) deu o primeiro grande passo para o conhecimento do genoma da cana-de-açúcar abrindo um amplo panorama para o desenvolvimento científico e tecnológico em torno desse cultivo de imensa importância econômica mundial. O Projeto SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tags) foi o responsável pelo seqüenciamento do transcriptoma da cana-de-açúcar. Foram parcialmente seqüenciados mais de 260.000 clones de cDNA, provenientes de 26 bibliotecas de cDNA, geradas a partir de RNA extraído de diferentes tecidos e condições fisiológicas. Com isso foram produzidas 237.954 ESTs (Expressed Sequence Tags) de alta qualidade. Estas ESTs foram montadas (sobrepostas) resultando em 43.141 transcritos consenso. A anotação dessas seqüências associou quase 50% destes transcritos com metabolismo protéico, comunicação celular e transdução de sinal, bioenergética e resposta a estresse. Os elementos de transposição representaram 2,3% das seqüências anotadas, enquanto que 16,8% das seqüências não apresentaram homologia com nenhuma seqüência de DNA previamente caracterizada. Uma análise comparativa entre os 43.141 transcritos revelou uma redundância de 22%, indicando que foram identificados 33.620 genes em cana de açúcar. Uma vez que em arroz ou tomate existem aproximadamente 35.000 genes, número também estimado para cana, o número obtido equivale a mais de 90% dos genes da planta (Vettore *et al.* 2003).

## **5. Cana-de-açúcar e TEs.**

A partir dos dados produzidos no projeto SUCEST, foi realizado um levantamento a procura de elementos transponíveis revelando uma grande quantidade

e diversidade de TEs no transcriptoma de cana-de-açúcar (Rossi *et al.* 2001). Através de uma busca adstringente foram identificados 276 cDNAs representando 21 elementos diferentes. 54% das seqüências resultaram ser transcritos de transposons enquanto que 46% de retrotransposons. As superfamílias mais representadas em cana-de-açúcar foram *Mutator* e *Hopscotch* para transposons e retrotransposons, respectivamente. Em 2005, Araújo e Rossi *et al.* realizaram um estudo transcricional com 68 clones de cDNA de cana-de-açúcar, previamente descritos por Rossi *et al.* (2001) demonstrando que diversas superfamílias de TEs são expressos em calos, meristema apical, folhas e flores em desenvolvimento. Dentre essas superfamílias, *Mutator* representou 38% dos TEs expressos, seguido por 13% do retrotransposon *Hopscotch*. Analisando a distribuição da expressão nos diferentes tecidos testados, foi possível demonstrar que a cultura de tecidos induz drasticamente a transcrição tanto de transposons quanto de retrotransposons. Experimentos de transformação transitória e estável demonstraram, para três dos elementos *Hopscotch* caracterizados, que os promotores são transcricionalmente ativos, confirmando o padrão de expressão observado através de macroarranjos.

Análises genômicas revelaram que durante sua história evolutiva, 70% das angiospermas sofreram poliploidização. As espécies com origem poliplóide geralmente provêm de genitores diplóides, assim apresentam níveis mais altos de diversidade genética e genômica que seus ancestrais. Após a hibridação, o genoma percorre um processo de reorganização que inclui deleções, translocações, inversões e duplicações que resulta em um novo padrão de expressão gênica e até no surgimento de novas funções (Soltis e Soltis 2000, He *et al.* 2003). Também foi demonstrado que a hibridação interespecífica ativa a retrotransposição e conseqüentemente os rearranjos cromossômicos vinculando assim a atividade dos TEs com a reestruturação do genoma após o processo de aloploidização (Kashkush *et al.* 2003, Bennetzen 2007). Por



exemplo, os trigos poliplóides possuem mais cópias de TEs que a soma dos seus genitores. No entanto, quando são analisados híbridos sintéticos recentes não são detectadas diferenças significativas (Li *et al.* 2004). Da mesma maneira, não foram reportadas evidências de transposição em alopoliplóides sintéticos resultantes do cruzamento de *Arabidopsis thaliana* e *Arabidopsis lyrata* até a terceira geração (Beaulieu *et al.* 2009). Enquanto que não foi demonstrado um aumento da transposição em curto prazo após a aloploidização, as mudanças epigenéticas drásticas, como a alteração no padrão de metilação, levam a uma conseqüente ativação da transcrição dos TEs (Parisod *et al.* 2010). Neste sentido, a cana-de-açúcar é um perfeito exemplo do “estresse genômico” produzido pela hibridação recente reforçado pela sua propagação vegetativa. Os altos níveis de TEs presentes no transcriptoma descritos reforçam a hipótese de que o progressivo aumento da expressão após a aloploidização poderia resultar num aumento da transposição e conseqüente aumento no número de cópias no genoma. Apesar disso, a “explosão” no número de cópias não parece ser uma regra e pode estar restrita exclusivamente a algumas famílias de elementos (Parisod *et al.* 2010).

## **6. Superfamília *Mutator* em cana-açúcar.**

Nos genomas de arroz, cana, milho e sorgo a superfamília de transposons *Mutator* é uma das mais representadas (Rossi *et al.* 2001; Paterson *et al.* 2009). Em 2004, Rossi *et al.* realizaram um estudo aprofundado sobre a diversidade das seqüências de cana-de-açúcar homólogas ao gene que codifica para a transposase do elemento autônomo do sistema *Mutator*, *mudrA*. A análise filogenética comparativa com *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* mostrou a existência de quatro clados que foram denominados Classe I, Classe II, Classe III e Classe IV. A identificação de seqüências ortólogas de *Arabidopsis* e cana-de-açúcar em cada um dos ramos permitiu

concluir que a diversificação do sistema *Mutator* ocorreu precocemente nas Angiospermas previamente a divergência de mono e eudicotíledoneas. Tanto o domínio de união a DNA quanto o sítio catalítico da transposase MURA foi identificado nas seqüências pertencentes às quatro classes (Rossi *et al.* 2004).

Com o intuito de conhecer o número de cópias e a estrutura dos elementos de cada classe no genoma de arroz e cana-de-açúcar, Saccaro-Jr *et al.* (2007) adotou três estratégias: i) a triagem de uma biblioteca genômica de cana-de-açúcar utilizando sondas específicas para cada classe, ii) o mapeamento *in silico* de todas as seqüências homólogas à transposase *mudrA* no genoma de arroz e, iii) a caracterização da estrutura de cada elemento de arroz identificado. Os resultados revelaram dados interessantes sobre a história evolutiva do sistema *Mutator* em gramíneas. Ponderando os genomas monoploides, e levando em consideração que a hibridação molecular é mais adstringente que o mapeamento *in silico*, número de cópias semelhantes foram observadas para cada classe em ambas as espécies (Tabela 2). No entanto, entre as classes foram observadas diferenças de uma ordem de magnitude, onde Classe II é a mais abundante seguida de Classe I revelando que a amplificação diferencial das classes foi anterior à divergência entre as espécies. As análises estruturais permitiram revelar que enquanto as Classes I e II possuem TIRs e constituem elementos de transposição verdadeiros, os elementos de Classe III e IV são transposases domesticadas do tipo *mustang* (Cowan *et al.* 2005) não apresentando mais estrutura de transposon. A análise filogenética dos genes *mustang* descritos em arroz, arabidopsis, e cana-de-açúcar revelou um único evento de domesticação seguido de uma duplicação que deu origem às classes III e IV (Figura 5). Os genes de Classe III apresentam dois cladogramas enquanto que os de Classe IV estão divididos em três ramos (Tabela 2). A topologia da árvore está perfeitamente de acordo com o número de cópias de cada classe indicadas na Tabela 2. A presença de mais de uma seqüência

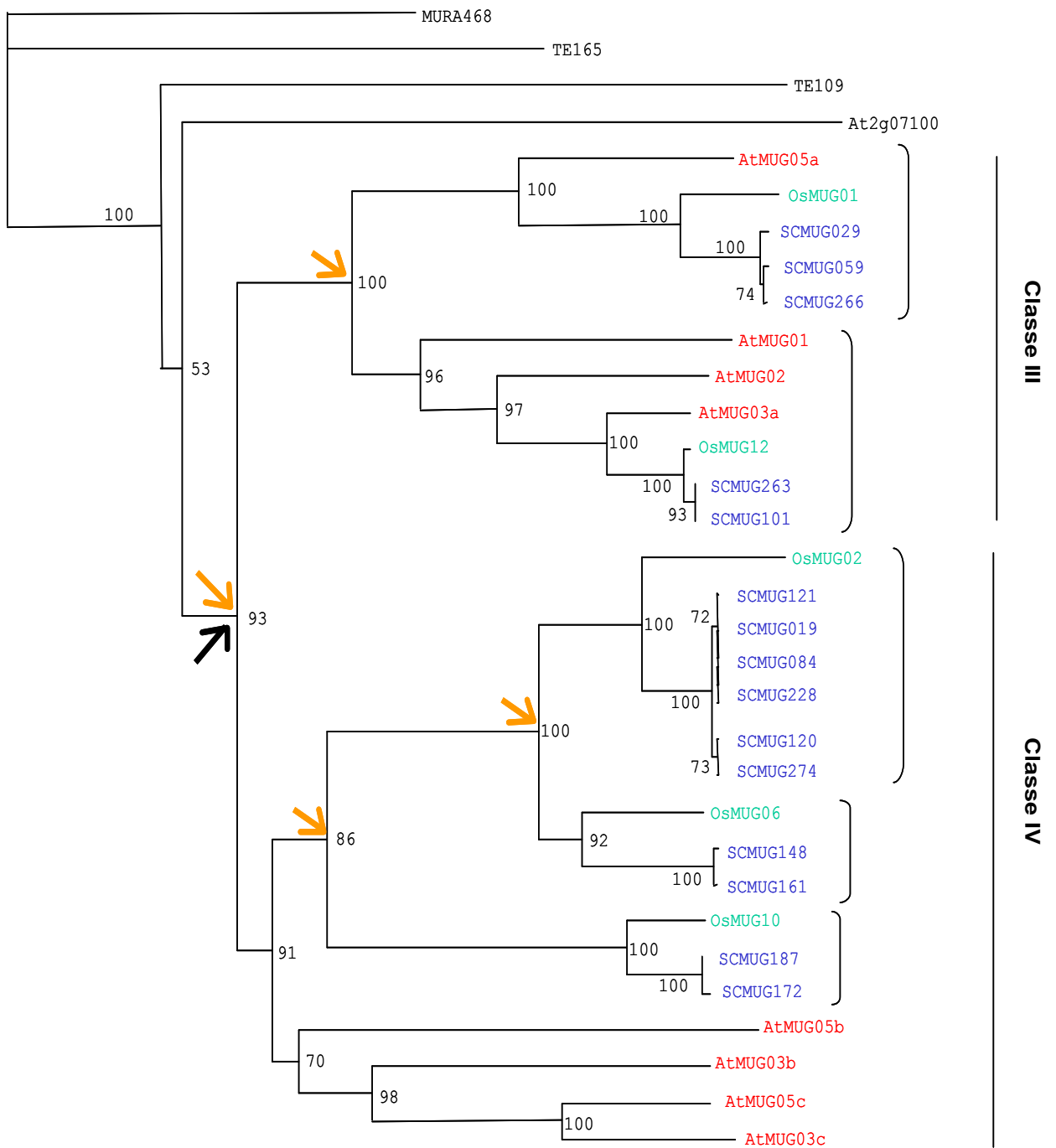
de cana dentro de cada clado é devida à poliploidia, lembrando que o genoma de cana-de-açúcar apresenta aproximadamente 12 haplotipos para cada *loci*.

**Tabela 2. Número de cópias das sequências semelhantes a *MudrA* em cana-de-açúcar e arroz.**

|            | Número de cópias no genoma monoplóide (1000 Mb) de cana-de-açúcar | Número de cópias no genoma monoplóide (430 Mb) de arroz |
|------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Classe I   | 28                                                                | 50                                                      |
| Classe II  | 172                                                               | 386                                                     |
| Classe III | ~1                                                                | 2                                                       |
| Classe IV  | 3                                                                 | 3                                                       |

Finalmente, Saccaro-Jr (2007) sequenciou duas cópias genômicas dos genes *mustang* de cana-de-açúcar de Classe III provindas de cada um dos genitores: *S. officinarum* e *S. spontaneum*. As análises comparativas com arroz demonstraram uma perfeita colinearidade entre as regiões genômicas que contém estes genes. Desta maneira, as relações filogenéticas e de sintenia suportam sua ortologia e descartam a possibilidade de que a ampla distribuição destes genes seja devida à transferência horizontal. A ampla diversidade e distribuição dos genes *mustang* gera perguntas sobre a possível função desta família multigênica. Há especificidade funcional entre as classes? Existe especialização funcional entre os diferentes clados de cada classe? Há mais de uma cópia ativa dentro de cada classe ou clado?

Com o intuito de acrescentar informações sobre a funcionalidade das transposases domesticadas MUSTANG em cana-de-açúcar este trabalho propôs ampliar a análise comparativa para outras espécies de gramíneas cujos genomas foram recentemente seqüenciados e, estudar a atividade transcricional destes genes.



**Figura 5.** Árvore filogenética dos genes *MUSTANG* em gramíneas. Árvore publicada por Saccaro-Jr *et al.* (2007). Setas pretas e laranjas indicam eventos de domesticação e duplicação, respectivamente.

## VI. Conclusões

- Foram identificados os genes *mustang* de Classe III e IV de milho e sorgo.
- A análise filogenética das seqüências codificantes completas dos genes *mustang* em gramíneas confirmaram a presença de dois clados de Classe III e três clados de Classe IV.
- A identificação de motivos de união a fatores de transcrição revelou a presença de sítios exclusivos de Classe III responsivos a auxina, citocinina, desidratação, frio e luz; e diferenciais entre ambas as cópias responsivos a ácido giberélico, ciclo celular, frio e elementos tecido-específico.
- As três seqüências clonadas demonstraram ser promotores transcricionais.
- A presença da construção de fusão entre os promotores e os genes repórteres correlacionou com a atividade de ambas as proteínas codificadas em linhagens de células de fumo transgênicas.
- Os promotores dos genes SCMUG266 BAC148 e SCMUG148 BAC249, de Classe III e IV respectivamente, mostraram ser modulados negativamente pela auxina; enquanto que o promotor do gene SCMUG266 BAC095 mostrou uma discreta modulação frente ao tratamento com citocinina e ácido abscísico.
- Os genes *mustang* de Classe III e Classe IV apresentaram perfis de expressão tecidual semelhantes, sendo o meristema o tecido com maior expressão.
- Os genes de Classe III apresentaram um pico de expressão em plantas de 30 dias, enquanto que os genes de Classe IV apresentaram uma queda nos níveis de expressão ao longo do desenvolvimento.
- Os experimentos de expressão transitória, assim como estável em células BY-2 mostraram que o promotor de Classe IV estudado possui maior atividade transcricional. De acordo com os dados de expressão endógena, em plantas de 15 dias os genes da

Classe IV apresentaram o dobro de expressão relativa comparada com os genes da Classe III.

## VII. Referências bibliográficas

- Adams KL, Wendel JF. (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends Genet.* 21:539–43.
- Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG. (1998) Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394:744-751.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403–410.
- An G. (1985) High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology* 79:568-570
- Araujo PG, Rossi M, de Jesus EM, Saccaro-Jr NL, Kajihara D, Massa R, de Felix JM, Drummond RD, Falco MC, Chabregas SM, Ulian, EC, Menossi, M, Van Sluys, M.A (2005) Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. *Plant Journal.* 44:707-717.
- Aziz RK, Breitbart M, Edwards RA. (2010) Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Research* 38:4207-4217.
- Beaulieu J, Jean M, Belzile F. (2009) The allotetraploid *Arabidopsisthaliana-Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Mol. Genet. Genomics* 281: 421–435.
- Bennetzen J. (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol.*42:251-269.
- Benjak A, Forneck A, Casacuberta JM. (2008) Genome-wide analysis of the “cut and paste” transposons of grapevine. *PLoS ONE.* 3:3107.
- Bernard V, Brunaud V, Lecharny A. (2010) TC-motifs at the TATA-box expected position in plant genes: a novel class of motifs involved in the transcription regulation. *BMC Genomics.* 11:166.
- Bernatzky R, Tanksley SD (1986) Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theoretical Applied Genetics* 72:314–315.
- Bowen J & Jordan K. (2002) Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. *Curr Issued Mol. Biol.* 4: 65-76.
- Boxem M, van den Heuvel S. (2002) *C. elegans* class B synthetic multivulva genes act in G(1) regulation. *Curr Biol.* 12:906–911.

- Brasileiro ACM, Carneiro VTC. (1998) Manual de transformação de genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa. 99-107.
- Bundock P, Hooykaas P. (2005) An arabidopsis hAT-like transposase is essential for plant development. *Nature*. 436: 282-284.
- Butter F, Kappei D, Buchhloz F, Vermeulen M, Mann M. (2010) A domesticated transposon mediates the effects of a single-nucleotide polymorphism responsible for enhanced muscle growth. *EMBO Rep* 11: 305–311.
- Clouaire T, Roussigne M, Ecochard V, Mathe C, Amalric F, Girard JP. (2005) The THAP domain of THAP1 is a large C2CH module with zinc-dependent sequence specific DNA-binding activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6907–12
- Cowan RK, Hoen DR, Schoen DJ, Bureau TE. (2005) MUSTANG is a novel family of domesticated transposase genes found in diverse Angiosperms. *Molecular Biol Evol* 22:2084-2089.
- Daniels J, Smith P, Paton N, Williams CA. (1975) The origin of the genus *Saccharum*. *Sugarcane Breeding. Newsletter* 36:24-39.
- Davies P. (2010) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. *Plant hormone Biosynthesis, Signal transduction and action*. 3<sup>o</sup> Ed. 1-15.
- del Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C. (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol Plant*. 123, 173–183.
- Devos K. (2010) Grass genome organization and evolution. *Curr Opin Plant Biol*. 13:139-145.
- D'Hont A, Glaszmann JC. (2001) Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *Proc. Int. Soc. Sugarcane. Technol*. 24: 556-559.
- D'Hont A. (2005) Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenet Genome Res*. 109: 27-33.
- Diener A, Hirschi KI. (2000) Heterologous expression for dominant-like gene activity. *Trends Plant Sci*. 5:11, 10-11.
- Feschotte C, Pritham EJ. (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*. 41: 331–368.



- Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. (2002) Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Genet.* 3:329-341.
- Feschotte C. (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Rev Genet* 9:397-405
- Fusada N, Masuda T, Kuroda H, Shimada H, Ohta H, Takamiya K. (2005) Identification of a novel cis-element exhibiting cytokinin-dependent protein binding in vitro in the 5'-region of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber. *Plant molecular biology.* 59(4):631-45.
- Gaut BS, Le Thierry d'Ennequin M, Peek AS, Sawkins MC. (2000) Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97:7008–7015.
- Grandbastien MA, Audeon C, Bonnivard E, Casacuberta JM, Chalhou B, Costa APP, Le QH, Melayah D, Petit M, Poncet C, Tam SM, Van Sluys MA, Mhiri C. (2005) Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. *Cytogenet Genome Res.* 110:229–41.
- Grivet L, Daniels C, Glaszmann JC, D'Hont A. (2004) A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. *Ethnobot Res Appl.* 2:9-17.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of E.coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 156:557-580.
- Hagen G, Guilfoyle T. (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49: 373–85.
- Hartig K, Beck E. (2004) Endogenous cytokinin oscillations control cell progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biol.* 7: 33-40
- Haren L, Ton-Hoang B, Chandler M. (1999) Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Annu Rev Microbiol.* 53:245-281.
- He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou J-M. (2003) Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol.* 52:401-414
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M e Korenaga T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* 27: 297-300.
- Hsieh HL., Okamoto H, Wang M, Ang LH, Matsui M, Goodman H e Deng XW. (2000) FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev.* 14:1958–1970.
- Hudson ME, Lisch DR, Quail PH. (2003) The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant Journal* 34:453–471.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907.
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR. (2004) Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* 43:569-573.
- Juretic N, Hoen DR, Huynh ML, Harrison PM, Bureau TE. (2005) The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host gene fragments in rice. *Genome Res.* 15:1292-1297.
- Kapitonov VV, Jurka J. (2005) RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol.* 3:998-1011.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. (2002) Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics.* 160:1651-1659.
- Karimi M, Inze D, Depicker A. (2002) Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7:193-195.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Li WL, Zhang P, Fellers JP, B Friebe, Gill BS. (2004) Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *Plant Journal* 40:500–511.
- Li H, Cheng Y, Murphy A, Hagen G, Guilfoyle TJ. (2009) Constitutive repression and activation of auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 149:1277-88.

- Liscum, E e Reed, JW. (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49:387–400.
- Lin R, Ding L, Casola C, Ripoll DR, Feschotte C, Wang H. (2007) Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 318:1302-1305.
- Lisch D. (2002) Mutator transposons. *Trends Plant Sci.*7:498-504.
- Lisch D. (2009) Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 60:43-66.
- Liscum E, Reed JW. (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol.* 49:387-400.
- Liu W, Seto J, Sibille E, Toth M. (2003) The RNA binding domain of Jerky consists of tandemly arranged helix-turn-helix/homeodomain-like motifs and binds specific sets of mRNAs. *Mol Cell Biol.* 23:4083-4093.
- Macfarlan T, Kutney S, Altman B, Montross R, Yu J, Chakravarti D. (2005) Human THAP7 is a chromatin-associated, histone tail-binding protein that repress transcription via recruitment of HDAC3 and nuclear hormone receptor corepressor. *J Biol Chem.* 280:7346-7358.
- Marino-Ramirez L, Lewis KC, Landsman D, Jordan IK. (2005) Transposable elements donates lineage specific regulatory sequences to host genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 110:333-341.
- McCabe DE, Swan WF, Matineli BJ. (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. *BioTechnology* 6:923–926.
- McClintock B. (1956) Controlling Elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 21:197-216.
- Motyka V, Vankova R, Capkova V, Petrasek J, Kaminek M, Schmulling T. (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Phys Plantarum* 117:11-21
- Mukherjee, S.K. (1957) Origin and distribution of *Saccharum*. *Botanical Gazette* 19:55- 61.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys Plantarum.* 15:473-497.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cells in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132:1–30.

- Okamoto H, Hirochika H. (2001) Silencing of transposable elements in plants. *Trends Plant Sci.* 6:527-534.
- Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Mhiri C, Ainouche M, Chalhou B, Grandbastien MA. (2010) Impact of transposable elements in organization and functioning of allopolyploid genomes. *New Phytologist* 186:37-45.
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer, G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Otiillar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboobur R, Ware D, Westhoff P, Mayer KF, Messing J, Rokhsar DS. (2009) The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457:551-556.
- Pennesi E. (2007) Jump genes hop into the evolutionary limelight. *Science* 317:894-895.
- Pritham EJ. (2009) Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. *J. Hered.*100:648-55.
- Robertson DS. (1978) Characterization of a Mutator system in maize. *Mutat. Res.* 51:21-28.
- Roccaro M, Li Y, Sommer H, Saedler H. (2007) ROSINA (RSI) is part of a CACTA transposable element, *TamRSI*, and links flower development to transposon activity. *Mol Genet Genomics* 278:243-254.
- Ross EJ, Stone JM, Rockel CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G. (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *J. Exp. Bot.* 55:1721-1731.
- Rossi M, Carrari F, Ponce JLC, Rovere CV, Estrella LH, Gudesblat G, Iusem N. (1998) Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the Asr gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Mol Gen. Genetics* 258:1-8.

- Rossi M, Araújo PG, Van Sluys MA. (2001) Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). *Genet. Mol. Biol.* 24:147-154.
- Rossi M, Araújo PG, Jesus EM, Varani AM, Van Sluys MA. (2004) Comparative analysis of sugarcane Mutator-like transposases. *Mol. Genet. Genomics* 272:194-203.
- Roulin A, Piegu B, Fortune PM, Sabot F, D'Hont A, Manicacci D, Panaud O. (2009) Whole genome surveys of rice, maize and sorghum reveal multiple horizontal transfers of the LTR-retrotransposon Route66 in Poaceae. *BMC Evol. Biol.* 9:58.
- Rudenko GN, Walbot V. (2001) Expression and post-transcriptional regulation of maize transposable element *MuDR* and its derivatives. *Plant Cell* 13:553-570.
- Saccaro-Jr NL, Van Sluys MA, Varani AM, Rossi M. (2007) MudrA-like sequences from rice and sugarcane cluster as two bona fide transposon clades and two domesticated transposases. *Gene* 392:117-125.
- Saccaro-Jr NL. (2007) O sistema Mutator em cana-de-açúcar: uma análise comparativa com arroz. Tese de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 121p.
- Saitou N Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2<sup>o</sup>Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sinzelle L, Izsvak Z, Ivics Z. (2009) Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol. Life Sci.* 66:1073-1093.
- Schmid M *et al.* (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genet.* 37:501–506.
- Slotkin RK, Freeling M, Lisch D. (2003) Mu killer causes the heritable inactivation of the Mutator family of transposable elements in *Zea mays*. *Genetics* 165:781–797.
- Slotkin RK, Martienssen R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 8:272–285.

- Soltis PS e Soltis DE. (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of poliploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7051-7057.
- Sorek R. (2007) The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *RNA*.10:1603-1608.
- Stam M, Belele C, Dorweiler JE, Chandler VL. (2002) Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize *b1* locus is associated with paramutation. *Genes Dev.* 16:1906-18.
- Swiatek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inzé D, Van Onckelen H. (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Phys.* 128:201–211.
- Terol J, Domingo C, Talón M. (2006) The GH3 family in plants: genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis. *Gene* 371:279–290.
- Vandepoele K, Casneuf T, Van de Peer Y. (2006) Identification of novel regulatory modules in dicotyledonous plants using expression data and comparative genomics. *Genome Biol.* 7:R103.
- Vettore AL *et al.* (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res.* 13:2725-2735.
- Volff JN. (2010) Tame affairs: domesticated transposase and domestic pigs. *EMBO Rep.* 11:241-242.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. *Trends Plant Sci.*10:88-94.
- Yamashita D, Sano Y, Adachi Y, Okamoto Y, Osada H, Takahashi T, Yamaguchi T, Osumi T, Hirose F. (2007) hDREF regulates cell proliferation and expression of ribosomal protein genes. *Mol. Cell Biol.* 27:2003-2013.
- Yesilirmak F, Sayers Z. (2009) Heterologous expression of plant genes. *International Journal of Plant Genomics* 2009:1-16.
- Yu Z, Wright SI, Bureau TE. (2000) *Mutator*-like elements in *Arabidopsis thaliana*: structure, diversity and evolution. *Genetics* 156:2019-2031.

- Xiao YL, Redman JC, Monaghan EL, Zhuang J, Underwood BA., Moskal WA, Wang W, Wu HC, Town CD. (2010) High throughput generation of promoter reporter (GFP) transgenic lines of low expressing genes in Arabidopsis and analysis of their expression patterns. *Plant Methods* 6:1-13.
- Zhang J, Madden TL. (1997) PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* 7:649-656.
- Walbot V. (2000) Saturation mutagenesis using maize transposons. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:103-107.
- Wolters H, Jurgens G. (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* 10:305-317.