
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Departamento de Genética
Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Beatriz Fonseca de Oliveira Dias

**A família gênica MADS-box no desenvolvimento de plantas:
Análise filogenética comparativa desta família em
eucaliptos &
Caracterização funcional de possíveis genes alvos no
desenvolvimento floral de *Arabidopsis thaliana***

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

-2004-

BEATRIZ FONSECA DE OLIVEIRA DIAS

A família gênica MADS-box no desenvolvimento de plantas:
Análise filogenética comparativa desta família em eucaliptos &
Caracterização funcional de possíveis genes alvos no
desenvolvimento floral de *Arabidopsis thaliana*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Genética)

Orientador: Marcio Alves Ferreira

Rio de Janeiro (Rio de Janeiro)

2004

Dias, Beatriz Fonseca de Oliveira

A família gênica MADS-box no desenvolvimento de plantas:
Análise filogenética comparativa desta família em eucaliptos &
Caracterização funcional de possíveis genes alvos no desenvolvimento floral
de *Arabidopsis thaliana*

Dissertação de Mestrado: Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia, Departamento de Genética, 2004.

1 - MADS-box

3 - *Arabidopsis thaliana*

2 - Eucalyptus

4 - Desenvolvimento da antera

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

A minha avó Maria (*In memoriam*)

Agradecimentos

Ao Dr. Marcio Aves Ferreira, pela orientação, sábios conselhos e grande apoio sem os quais este trabalho não existiria.

Aos professores Rogério Margis e Cláudia Russo pela colaboração na realização do “*northern blot* eletrônico” e das árvores filogenéticas que foram de fundamental importância nas análises dos resultados.

Aos professores do laboratório de Genética Molecular Vegetal pelo esclarecimento de dúvidas ao longo deste período.

À amiga Graça, pelos conselhos, críticas, sugestões, apoio e ensinamentos transmitidos durante todo o período deste trabalho.

Ao Pablo, pela amizade e ajuda nas mais diversas situações do dia-a-dia.

Ao Régis, Felipe e Anna Cristina pelos conselhos e dicas com relação ao “mundo dos RNAs”, que por muitas vezes me estressaram profundamente.

Aos amigos o Laboratório de Genética Molecular Vegetal: Aline, Durvalina, Elisson, Fabiano, Fátima, Fernanda, Itamar, Luís, Maria Isabel, Mariana, Rodrigo, Sílvia, Tatiana, Vanessa e Vinícius pela agradável convivência.

Ao Eduardo, pelo apoio, compreensão, paciência, amizade, amor e pela gentileza de ter cedido seu computador em um dos momentos mais críticos da realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos que sempre estiveram do meu lado, com destaque especial para minha mãe que me deu total apoio e estabilidade para que pudesse continuar seguindo em frente.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram e colaboraram para a realização deste trabalho sou bastante grata.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Márcio Alves Ferreira, com recursos do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Resumo

Os genes pertencentes à família gênica MADS-box codificam para fatores transcricionais que estão envolvidos nos mais variados processos do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. A busca por genes ortólogos aos genes MADS-box em diversas espécies de plantas contribui para a compreensão da evolução dos mecanismos moleculares nos processos de diversificação da planta.

Através das ESTs disponíveis no banco de dados do projeto genoma de eucaliptos (FORESTs) foi possível a identificação e avaliação do padrão de expressão preliminar de 25 genes MADS-box de eucaliptos *in silico*. As prováveis funções das proteínas MADS-box de eucaliptos foram inferidas com alusões ao padrão de expressão e análises filogenéticas de outras espécies já caracterizadas. Dentre os genes identificados em eucaliptos 12 foram representativos dos tecidos reprodutivos e 12 referentes aos tecidos reprodutivos.

Apesar do amplo conhecimento sobre as funções desempenhadas pelos genes MADS-box, ainda não está claro de que maneira, por exemplo, estes fatores transcricionais participam na regulação da expressão de outros genes envolvidos nos processos de formação dos tecidos florais. Para identificar os possíveis genes regulados pelos fatores transcricionais MADS-box, algumas técnicas, como o microarranjo, permitem a comparação entre os genes presentes nas plantas do tipo selvagem e do tipo mutante. Apesar de ser uma evidência circunstancial, podem ser identificados possíveis genes alvos dos fatores transcricionais MADS-box.

Três possíveis genes alvos do gene *AP3* foram estudados neste trabalho: *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940*. Para a avaliação da função destes genes foi levada em consideração a característica fenotípicas, molecular e anatômica das plantas transformadas com construções para a indução do silenciamento gênico e de super-expressão.

O silenciamento do gene *At1g27710* resultou em plantas macho estéreis parciais. A redução na expressão deste gene poderia levar a inviabilidade dos grãos de pólen e/ou alterações no desenvolvimento do tapete da antera afetando o suprimento de nutrientes para a correta formação dos grãos de pólen.

A super-expressão do gene *At1g12080* não resultou em plantas com alterações morfológicas. O silenciamento do gene foi correlacionado com a redução do porte da planta, talvez devido à deficiência do alongamento celular ou deficiência na divisão celular das células do eixo de inflorescência.

A super-expressão do gene *At2g42940* resultou em uma maior quantidade de flores abertas e botões florais na inflorescência. A super-expressão, neste caso, poderia modular a expressão de genes envolvidos na proliferação celular e/ou transdução de sinais para a especificação de uma maior quantidade de primórdios florais. O silenciamento do gene por sua vez, resultou em plantas macho estéreis parciais. A redução na expressão do gene *At2g42940* possivelmente levaria ao descontrole na expressão de genes necessários para a correta formação do tapete, comprometendo o desenvolvimento dos grãos de pólen.

Lista de abreviaturas

µg - micrograma

µl - microlitro

µF - micro Faraday

aa - aminoácidos

A. thaliana - *Arabidopsis thaliana*

AG - AGAMOUS

agESTs - agrupamento de ESTs

AGL - AGAMOUS like

AP1 - APETALA 1

AP2 - APETALA 2

AP3 - APETALA 3

BSA - Albumina de soro bovino

CAL - CAULIFLOWER

CaMV - vírus do mosaico de couve-flor

cDNA - cadeia de DNA complementar a seqüência do mRNA

cm - centímetros

ccdB - gene que codifica uma proteína que interfere com a DNA girase da *E. coli*

CmR - Chloramphenicol

C-terminal - porção carboxi-terminal de proteína

DEF - DEFICIENS

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfato

D.O. - Densidade ótica

dsRNA - RNA fita dupla

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EST - do inglês “*expressed sequence tag*”

f.a. - flores abertas

FORESTs - Projeto de seqüenciamento dos ESTs de eucalipto

FUL - FRUITFULL

g - grama

GLO - GLOBOSA

h - hora

HCl - ácido clorídrico
HMG - do inglês "*high mobility group*"
IhpRNA - do inglês "*intron hairpin RNA*"
ISPCs - *inner secondary parietal cells* - células parietais secundárias internas
LB - meio nutritivo para cultura de bactérias Lurian Bertami
LiCl - Cloreto de lítio
KV - quilovolt
M - molar
MEF-2 - MYOCYTE ENHANCER FACTOR2
min - minuto
mg - miligrama
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
ml - mililitro
mM - milimolar
mm - milímetros
MOPS - ácido 3-(N-morfolino) propanosulfúrico
mRNA - RNA mensageiro
MS - meio nutritivo básico de Murashige & Skoog
n - número de cromossomo
ng - nanograma
N-terminal - porção amino-terminal de proteína
NaCl - cloreto de sódio
NaOH - hidróxido de sódio
nm - nanometro
°C - graus Celcius
OSPcs - *outer secondary parietal cells* - células parietais secundárias externas
PCR - reação da polimerase em cadeia
Pb - pares de base
pH - potencial hidrogenionte
PI - PISTILLATA
PMCs - *pollen mother cells* - células mãe do micrósporos
PPCs - *primary parietal cells* - células parietais primárias
PSCs - *primary sporogeneous cells* - células esporogênicas primárias
PTGS - silenciamento gênico pós transcricional

RNA - ácido ribonucleico
RNAi - interferência de RNA
RPM - rotação por minuto
rRNA – RNA ribossomal
RT-PCR -reação da polimerase em cadeia mediada pela transcriptase reversa
SDS - dodecil sulfato de sódio
SEP 1/2/3 - SEPALLATA 1/2/3
SPL/NZZ - SPOROCYTELLES/ NOZZLE
SQUA - SQUAMOSA
SRF - SERUM RESPONSIVE FACTOR
SSC - tampão salino-citrato
TAE - tampão tris acetato EDTA pH 8.0
T-DNA - do inglês "*transfer DNA*"
TFL 1- TERMINAL FLOWER 1
Tris - tri-hidroximetil aminometano
VI - volume
V - volts
U - unidade
UV - ultravioleta
X - vezes
 Ω - ohm

Lista de ilustrações

Figura 1	5
Figura 2	10
Figura 3	11
Figura 4	12
Figura 5	28
Figura 6	29
Figura 7	30/31
Figura 8	32
Figura 9	33/34/35
Figura 10	43
Figura 11	44
Figura 12	66/67
Figura 13	68
Figura 14	69
Figura 15	70
Figura 16	71
Figura 17	104
Figura 18	105
Figura 19	106
Figura 20	112
Figura 21	113
Figura 22	114
Figura 23	115
Figura 24	116
Figura 25	120/121
Figura 26	122/123
Figura 27	124
Figura 28	125
Figura 29	140

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1	51
Tabela 2	59
Gráfico 1	104
Gráfico 2	105
Gráfico 3	107
Gráfico 4	112
Gráfico 5	113
Gráfico 6	114
Gráfico 7	115

Sumário

Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Lista de abreviaturas	ix
Lista de ilustrações	xii
Lista de tabelas e gráficos	xiii
<u>INTRODUÇÃO</u>	1
1. Desenvolvimento Vegetal	2
1.1. Formação da Flor	3
1.1.1. Formação do estame	6
2. Genética do desenvolvimento vegetal	13
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudo	14
2.2. Instrumentos para o estudo da genética desenvolvimento vegetal	15
2.2.1. Genética do desenvolvimento do estame	17
2.3. Estudo da expressão gênica	19
2.3.1. Produção do <i>chip</i> de cDNA específico de flor	22
2.3.1.2. Identificação de genes expressos na antera	24
2.4. Famílias gênicas envolvidas com o desenvolvimento vegetal	36
2.4.1. Genes MADS-box	36
2.4.2. Controle genético do desenvolvimento reprodutivo	39
2.4.3. Família MADS-box e o desenvolvimento floral	40
3. Conservação dos mecanismos do desenvolvimento floral	45
3.1. A família MADS-box e a sua importância no estudo do desenvolvimento floral durante a evolução	46
3.2. Eucalipto	48
<u>OBJETIVOS</u>	52
<u>CAPÍTULO 1</u>	53
Materiais e métodos	54
Resultados	60
Família gênica MADS-box tipo I em eucaliptos	61

Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente na biblioteca FB1	61
Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente nos tecidos vegetativos	63
Discussão	72
Família gênica MADS-box tipo I em eucaliptos	72
Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente na biblioteca FB1	73
Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente nos tecidos vegetativos	76
<u>CAPÍTULO 2</u>	82
Materiais e métodos	83
1. Material vegetal	83
2. Fixação do material para microscopia	84
3. Coleta do material para <i>northern blot</i>	85
4. Extração de RNA	85
5. Análise por <i>northern blot</i>	86
5.a. Pré-hibridização dos filtros de náilon	87
5.b. Preparação das sondas radioativas	88
5.c. Análise dos resultados de <i>northern blot</i>	89
6. Transformação de <i>Escherichia coli</i> através de eletroporação	89
7. Extração do RNA plasmidial	90
8. Manipulação do DNA com enzima de restrição	91
9. Purificação de DNA a partir de gel de agarose	92
10. Soluções	93
Resultados	96
Análise de segregação	97
Caracterização fenotípica	99
<i>Northern blot</i>	108
Caracterização anatômica das linhagens	117
Discussão	126
Referências Bibliográficas	147

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento vegetal possui características próprias que os distinguem dos animais, como: (1) inexistência de migração celular, provocada pela presença de uma parede celular rígida, (2) determinação tardia na especificação da linhagem germinativa, originada a partir do meristema vegetativo, e (3) totipotência.

A totipotência é a capacidade que quase todas as células vegetais possuem de desdiferenciação. Esta característica permite a obtenção de uma planta madura e fértil a partir de qualquer parte da planta em condições adequadas de cultivo. A identidade das novas células é, geralmente, determinada tardiamente como resultado das informações posicionais (Poething, 1989; Dawe and Freeling, 1992; Huala and Sussex, 1993). A identidade, uma vez estabelecida, é mantida ativamente o que evita o retorno ao estado indiferenciado dos meristemas (Taylor, 1997).

As plantas desenvolveram mecanismos que permitem determinar quando as condições ambientais são favoráveis à produção de estruturas reprodutivas. Estes mecanismos maximizam suas chances de propagação já que possuem o hábito séssil e são autotróficas. O ciclo de vida nas angiospermas é caracterizado pela alternância de gerações, sendo uma fase esporofítica (diplóide) e uma fase gametofítica (haplóide) (Goldberg *et al.*, 1993). Nas angiospermas, a transição das fases esporofíticas e gametofíticas ocorre nos órgãos reprodutivos masculinos e femininos.

1. Desenvolvimento vegetal

O desenvolvimento pós-embriônico nas plantas começa com a germinação das sementes. A princípio, observa-se o crescimento da radícula que rompe o tegumento e penetra no solo, em seguida ocorre o alongamento do hipocótilo. Posteriormente, os cotilédones se desenvolvem, e há o crescimento do epicótilo. O meristema radicular dá origem à raiz, enquanto o meristema apical caulinar dá origem às folhas da roseta, à inflorescência e às flores.

Após a germinação, a planta encontra-se na fase vegetativa, compreendendo do estado juvenil até a fase adulta antes da floração. Durante este período ela é incapaz de responder aos fatores que induzem a floração. Após um determinado tempo, extremamente variável de espécie para espécie, a planta torna-se capaz de responder aos fatores indutórios à floração, esta fase é chamada de fase reprodutiva. *Arabidopsis thaliana* é a planta mais estudada quanto aos aspectos relacionados a indução e formação de flores.

Diversos fatores ambientais e endógenos controlam o período de floração em *A. thaliana*. A interação desses fatores permite que haja a troca da fase vegetativa para a fase reprodutiva no período apropriado. Na fase reprodutiva é observada a indução da floração, e posteriormente, a formação do meristema floral e dos órgãos que compõem as flores.

O desenvolvimento da parte aérea de *A. thaliana* possui etapas distintas durante seu ciclo de vida. Nas fases iniciais do crescimento, os órgãos laterais desenvolvem-se a partir dos primórdios formados nos flancos do meristema vegetativo apical. Desta forma, os primórdios foliares produzem folhas vegetativas formando a estrutura de roseta, originada por um alongamento quase nula dos

entrenós. Após a indução da floração, observa-se o alongamento dos entrenós, dando origem à haste da inflorescência (Figura 1A). Subseqüentemente, o meristema de inflorescência produz os primórdios de inflorescências secundárias. Posteriormente, é determinado o meristema floral que se forma a partir dos primórdios originados nos flancos do meristema de inflorescência. Conseqüentemente, o meristema floral, será responsável pela formação dos primórdios florais.

1.1. Formação da flor

A flor da *A. thaliana* possui a estrutura típica das flores de Brassicaceae, contendo quatro verticilos florais. A flor é constituída por um conjunto de peças estéreis formando o perianto, sendo quatro sépalas esverdeadas e quatro pétalas brancas. As posições das sépalas e pétalas são alternadas entre si. As estruturas reprodutivas, androceu e gineceu, se desenvolvem no interior do perianto (Figura 1B). O androceu é formado pelos estames, cada qual constituído por um filete, que sustenta a antera, e no interior da antera ocorre a formação dos grãos de pólen (Figura 1C). *A. thaliana* possui seis estames tetradínamos, ou seja, dois laterais (curtos) e quatros médios (longos). O gineceu é formado por dois carpelos fusionados que se divide basicamente em três regiões: (1) estigma, região terminal responsável pela recepção do grão de pólen, (2) estilete, haste que parte do ovário e suporta o estigma, e (3) ovário, no interior do qual os óvulos se desenvolvem (Figura 1C).

O processo do desenvolvimento floral em *A. thaliana*, compreendido do início do surgimento do primórdio floral até a abertura do botão floral (antese), pode ser

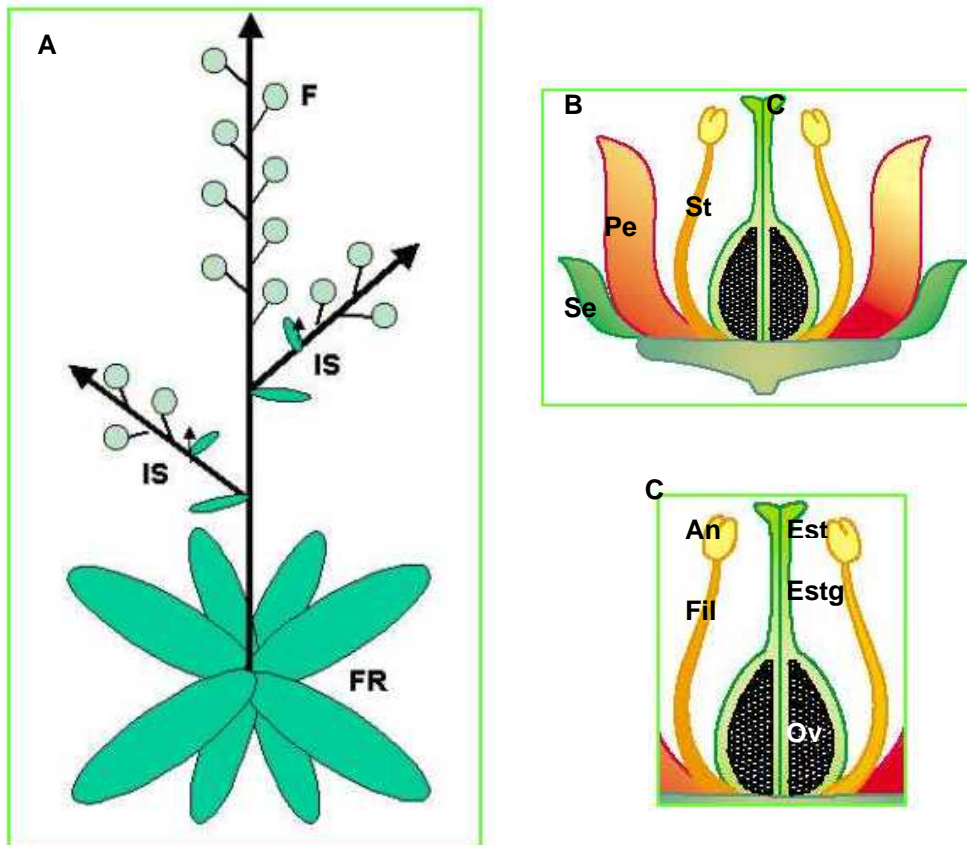
dividido em 12 estágios. Os primeiros dois estágios são caracterizados pelo surgimento do primórdio floral a partir do meristema de inflorescência. O estágio três é marcado pelo aparecimento dos primórdios das sépalas, que continua se desenvolvendo no estágio quatro. A característica marcante no estágio cinco é o surgimento dos quatro primórdios das pétalas e dos primórdios dos quatro estames médios. O surgimento dos primórdios dos dois estames laterais ocorre logo após o estágio cinco (Smyth *et al.*, 1990).

Durante o estágio seis, os primórdios dos quatro estames médios tornam-se distintos, e os dois primórdios dos estames laterais se desenvolvem lentamente. Na região central do primórdio floral, começa a ser produzido um canal tubular oval, que originará o gineceu. No estágio sete, os primórdios dos estames médios começam a ser projetados para cima. No estágio oito observa-se a formação dos lóculos da antera, semelhante a protuberâncias convexas na superfície interna (adaxial) dos estames médios, logo após, ocorre a formação dos lóculos da antera nos estames laterais. Nos próximos estágios, ocorre o alongamento dos órgãos florais até que as flores atinjam o último estágio do desenvolvimento do botão floral, o estágio doze (Smyth *et al.*, 1990).

Dentre os órgãos formadores da flor, o carpelo e o estame possuem os processos mais sofisticados de diferenciação celular. Estes órgãos são responsáveis pela formação dos óvulos e dos grãos de pólen, que representa a fase gametofítica dos vegetais superiores.

Figura 1 Representação esquemática da parte aérea de *A. thaliana*

- (A) Planta adulta. F – flores; IS – Inflorescência secundária; FR – folhas da roseta
(B) Flor após a antese. Se – sépala; Pe – pétala; St – estame; C – carpelo [Ferrario et al., 2004].
(C) Órgãos reprodutivos masculino e feminino (An – antera; Fil – filete; Estg – estigma; Est – estilete; Ov – ovário).



1.1.1. Formação do estame

No interior do primórdio do estame, os eventos de especificação celular e diferenciação dão origem a dois domínios morfológicamente distintos: (1) aquele que irá formar propriamente a antera, e (2) o filete, que fornece suporte e transporta nutrientes para a antera. Em uma seção transversal, a antera possui um par de lóbulos bilaterais contendo tipos celulares estereotípicos que são repetidos em cada lóculo (Goldberg *et al.*, 1993). Os pares de lóbulos bilaterais são separados pelos feixes vasculares e pelo conectivo.

O desenvolvimento da antera inicia-se com o surgimento do primórdio do estame no terceiro anel do meristema floral e é finalizado com a liberação dos grãos de pólen na deiscência (Goldberg *et al.*, 1993). A microsporogênese em *A. thaliana* segue o padrão típico das dicotiledôneas, ocorrendo no interior dos lóculos reprodutivos de cada lóbulo (Misra, 1962; Bhandari, 1984). O desenvolvimento da antera em *A. thaliana* pode ser dividido em 14 estágios, nos quais os distintos eventos celulares podem ser observados em nível de microscopia ótica. A fase de diferenciação da antera é representada pelos estágios 1 - 8 (Figura 2), e as fases de maturação e senescência da antera são representadas pelos estágios 9 - 14 (Figura 4) (Sanders *et al.*, 1999).

A fase de diferenciação é caracterizada pela formação dos tecidos presentes no androceu (epiderme, estômio, endotécio, camada média e o tapete) a partir de tecido indiferenciado do meristema floral. A segunda etapa, a senescência, é caracterizada por um processo de degeneração dos tecidos da antera e maturação dos grãos de pólen. As duas fases são caracterizadas por uma mudança radical em

nível anatômico e ultraestrutural dos tecidos formadores do androceu (Mepham & Lane, 1970). Estas mudanças são resultantes da expressão característica de genes presentes em cada um dos estágios (revisão por Scott *et al.*, 1991).

A histo-especificação, a morfogênese e os eventos meióticos constituem a fase de diferenciação que ocorre na antera. Os processos moleculares que direcionam a especificação celular e a diferenciação ainda são pouco conhecidos. As figuras 2 e 3 demonstram esta etapa do desenvolvimento da antera que será descrita abaixo.

Inicialmente, a antera consiste em uma massa de células uniformes, revestida por uma única camada parcialmente diferenciada de células epidermais. As células hipodermis oriundas da L2, localizadas nos quatro cantos da massa celular da antera expandem-se radialmente e diferenciam-se em células arqueosporais, no estágio dois. No estágio três, as células arqueosporais sofrem divisões periclinais e originam as células esporogênicas primárias (PSCs – *primary sporogeneous cells*) na camada interna, e as células parietais primárias (PPCs – *primary parietal cells*) na camada externa. As PPCs sofrem divisões periclinais e anticlinais para formar duas camadas de células parietais secundárias: a camada mais interna (ISPCs – *inner secondary parietal cells*) e a mais externa (OSPCs – *outer secondary parietal cells*), no estágio quatro. No estágio cinco, as OSPCs diferenciam-se em endotécio, enquanto as ISPCs sofrem mais uma divisão periclinal dando origem a duas camadas de células, a mais interna diferencia-se em células do tapete e a outra camada diferencia-se nas células médias. Ao mesmo tempo, as PSCs diferenciam-se em microsporócito ou células mãe do pólen (PMCs – *pollen mother cells*). No estágio seis, as PMCs se dividem meioticamente (Sanders *et al.*, 1999) e ocorre a

deposição de calose na parede celular destas células, tornando-as isoladas umas das outras (Owen and Makaroff, 1995). Concomitantemente, o tapete se torna evidente e binucleado. No estágio sete, a meiose é finalizada com cada microsporócito diplóide dando origem a uma tétrade de micrósporos livres haplóides dentro de cada lóculo. Finalmente, no estágio oito, a calose que recobre as tétrades é degenerada e os micrósporos individuais são liberados (Sanders *et al.*, 1999). A microsporogênese é finalizada com a formação dos micrósporos unicelulares.

O tapete é a camada esporofítica que está em contato direto com os microsporócitos em desenvolvimento e desempenha um papel crucial na maturação dos micrósporos. Estudos utilizando técnicas citológicas e de microscopia revelaram que as células do tapete contêm um denso citoplasma com abundantes organelas celulares, indicando que estas células apresentam um elevado estado metabólico (Stevens and Murray, 1981). O tapete é indispensável durante o desenvolvimento do micrósporo e isto foi demonstrado pela destruição específica das células do tapete através de genes citotóxicos, que resultou em um aborto prematuro dos micrósporos (Goldberg *et al.*, 1993).

As fases de maturação e senescência envolvem os programas funcionais que ocorrem dentro dos tipos celulares diferenciados da antera após a formação das tétrades nos lóculos, representados na figura 4 (Koltunow *et al.*, 1990; Goldberg *et al.*, 1993). Nestas fases ocorrem o desenvolvimento do gametófito, o alongamento do filete e a degeneração celular (Goldberg *et al.*, 1993). No estágio nove, os micrósporos são revestidos por uma parede externa, a exina, e uma parede interna, a intina. A exina é composta de uma substância muito resistente, a esporopolenina que aparentemente é derivada do tapete. A intina, composta por celulose e pectina,

é formada pelo protoplasto do micrósporo. No estágio dez ocorre o início da degeneração das células do tapete (Sanders *et al.*, 1999).

A microgametogênese começa no estágio onze quando ocorre a divisão mitótica do pólen. A divisão forma uma grande célula, denominada célula vegetativa, e uma célula menor, denominada célula germinativa. Este grão de pólen é o microgametófito imaturo. Neste estágio, o tapete está completamente degenerado e começa a degradação das células do septo, também ocorre a diferenciação do estômio. No estágio doze, a célula germinativa sofre mais uma divisão mitótica gerando as duas células espermáticas. A antera torna-se bilocular após a degeneração e o rompimento do septo. No estágio treze, ocorre o rompimento das paredes celulares na região do estômio permitindo que os grãos de pólen sejam liberados da antera. O último estágio corresponde a senescência do estame (Sanders *et al.*, 1999).

Alguns dos eventos que ocorrem na fase de maturação e senescência, tal como: a diferenciação do grão de pólen, a degeneração celular e a deiscência da antera permanecem desconhecidos (Sanders *et al.*, 1999).

Figura 2 Fase de diferenciação dos tecidos da antera de *A. thaliana* [Estágios 1-8 / Sanders *et al.*, 1999]. Ar – Células arqueosporais; C – Conectivo; E – Epiderme; En – Endotécio; L1, L2 e L3 – As três camadas do primórdio do estame; MC – Célula meiótica; ML – Camada média; MMC – Célula mãe do micrósporo; MSp – Micrósporo; 1°P – Camada parietal primária; 2°P – Camadas parietais secundárias; 1°Sp – Camada esporogênica primária; Sp – Células esporogênicas; StR – Região do estômio; T – Tapete; Tds – Tétrades; V – Feixe vascular.

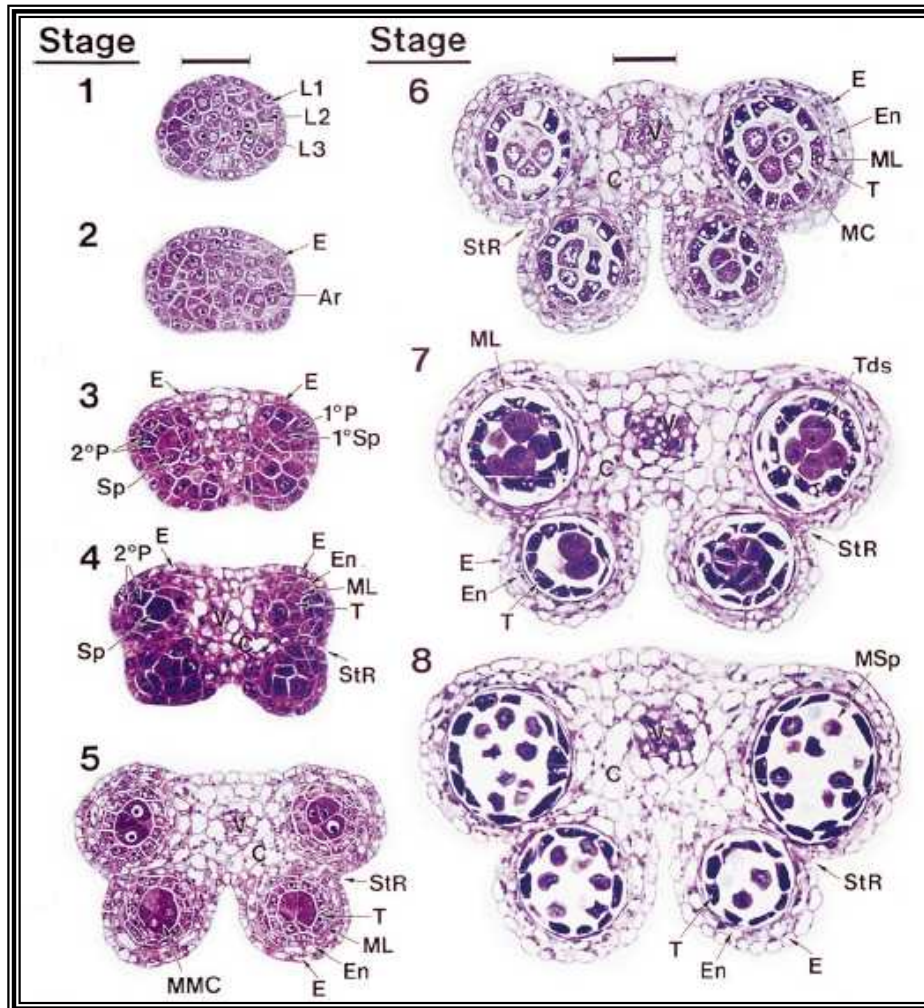


Figura 3 Representação esquemática da fase de diferenciação da antera.

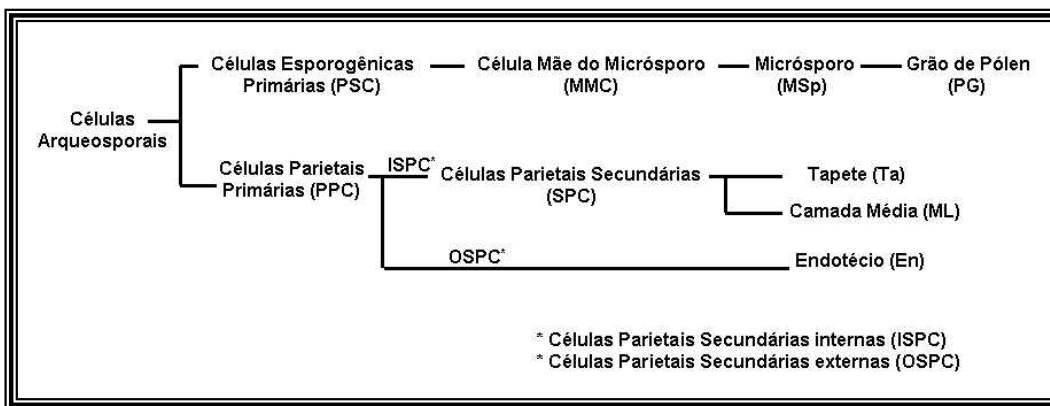
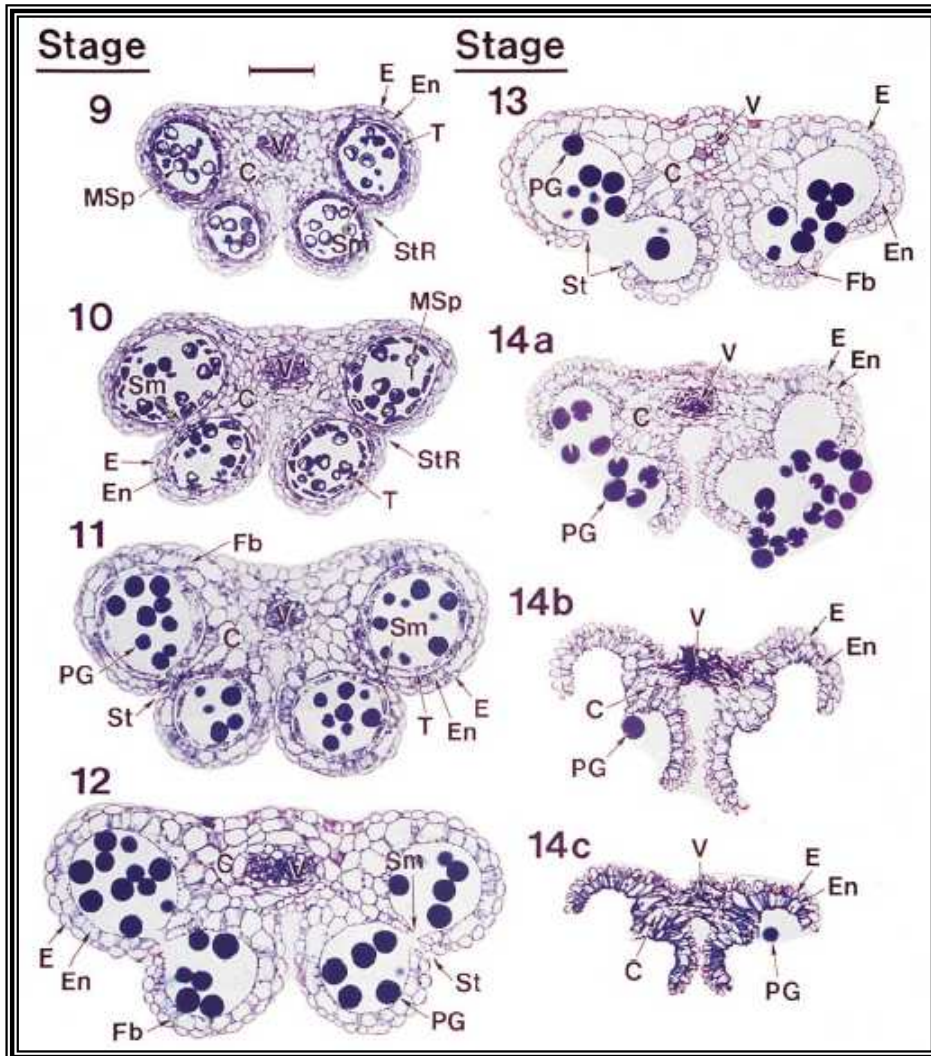


Figura 4 Fase de maturação do grão de pólen e senescência da antera de *A. thaliana* [Estágios 9 -14 / Sanders *et al.*, 1999]. C – Conectivo; E – Epiderme; En – Endotécio; Fb – Bandas fibrosas; MSp – Micrósporos; PG – Grão de pólen; Sm – Septo; StR – Região do estômio; T – Tapete; V – Feixe vascular.



2. Genética do desenvolvimento vegetal

Recentemente novas tecnologias como a genômica, a proteômica e a bioinformática vêm contribuindo para a aceleração do conhecimento científico. Muitos projetos de seqüenciamento genômico têm sido realizados com o objetivo de compreender melhor os sistemas biológicos. Genomas completos de plantas já foram totalmente seqüenciados, como é o caso da *A. thaliana* (*A. thaliana Genome Initiative*, 2000), gerando uma grande quantidade de informações.

Além do seqüenciamento do genoma, uma outra maneira de se obter informações da expressão gênica de um determinado organismo é através do seqüenciamento de cDNAs. As ESTs (*Expressed Sequence Tags*), seqüências de genes expressos, são obtidas de cDNAs gerados ao acaso a partir de tecidos específicos selecionados. Recentemente, foi realizado o projeto genoma de eucalipto, que teve por objetivo o seqüenciamento de cDNAs gerando ESTs (*FORESTs: Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium*).

O próximo passo após ter sido gerado um banco de dados com as ESTs é a identificação dos genes representados nestas seqüências. Nesta etapa a bioinformática é de fundamental importância. No primeiro momento é realizado o agrupamento das ESTs para identificar as seqüências abertas de leitura, que podem constituir genes ou fragmentos destes. Na segunda etapa é realizada a identificação das seqüências a partir da comparação com seqüências já identificadas de outros organismos, esse processo é denominado *datamining*. Assim, a primeira informação sobre o gene é obtida através da comparação de seqüências em banco de dados. Desta forma, podendo ser inferida uma provável função a um determinado gene.

Para compreender a função de um gene é importante entender seu processo de expressão, isso inclui a informação espacial e temporal, assim como o nível de expressão. Informações adicionais podem ser obtidas através da avaliação de características fenotípicas de linhagens mutantes.

2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudo

A. thaliana (L.) Heynh, é uma angiosperma, pertencente à família Brassicaceae, sendo encontrada principalmente em regiões de clima temperado da Europa, Ásia e norte da África (Meyrowitz e Somerville, 1994).

Esta planta possui uma série de vantagens que explicam porque ela tem sido utilizada como planta modelo. Uma delas é seu pequeno porte, atingindo de 15 cm a 20 cm, podendo ser cultivada em grande quantidade e em pequenos espaços. As flores são autógamas, produzindo um grande número de sementes por planta, suas sementes permanecem viáveis durante vários anos à temperatura ambiente. Seu ciclo de vida é rápido (8 - 12 semanas sob ótimas condições de cultivo), sendo bastante adequado aos estudos genéticos. Possui um genoma pequeno ($2n=10$) que foi completamente seqüenciado (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Este fato é de grande valia na identificação e isolamento de novos genes, podendo servir como base para a busca de genes em outras plantas.

A. thaliana possui características semelhantes com outras angiospermas no que se refere à morfologia, anatomia, respostas ambientais, crescimento, desenvolvimento vegetal e na arquitetura floral. Essa diversidade de características

serve de estímulo para o avanço do conhecimento científico através das técnicas em biologia molecular. Apesar de importantes instrumentos fornecidos pela genética molecular, a genética clássica, através do estudos de mutantes, ainda é fundamental para o estudo de uma série de processos relacionados ao desenvolvimento vegetal.

2.2. Instrumentos para o estudo da genética do desenvolvimento vegetal

A indução da mutagênese em plantas pode ser feita através dos métodos de mutagênese física, química e insercional. Entre os procedimentos da mutagênese física empregados em *A. thaliana*, cabe mencionar a exposição à raios X e o bombardeamento com nêutrons rápidos. A utilização destas técnicas produz quebras, deleções e reorganizações cromossômicas que correspondem, com freqüência, a alelos nulos. O mutagêneo químico de uso mais freqüente é o etil metano sulfonato (EMS) que é um agente alquilante e causa mutações pontuais. Por fim, é possível a obtenção de mutantes por mutagênese insercional através de um T-DNA modificado de *Agrobacterium tumefaciens* ou através de elementos de transposição modificados de milho. Estes métodos constituem os instrumentos da genética clássica para estudo da função gênica.

Com o avanço das técnicas em biologia molecular, um outro ramo da genética, denominado genética reversa, tem contribuído de forma substancial para o estudo da função gênica. A genética reversa tem como ponto de partida uma

proteína ou uma sequência de DNA, de que não se tenha nenhuma informação sobre a função desempenhada. Essa informação já é suficiente para, através de técnicas de transformação genética, gerar plantas mutantes nulas para a caracterização de um determinado gene.

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) ou interferência de RNA (RNAi) é um dos métodos utilizados para induzir fenótipos com perda de função. Este fenótipo pode ser conseguido através da inativação do gene de interesse. Uma das maneiras é transformar as plantas com um T-DNA que contenha o fragmento do gene de interesse na orientação anti-sense. Após a transcrição deste fragmento, o mecanismo do PTGS é disparado e conseqüentemente ocorre o silenciamento gênico. Porém, foi observado que quando se utiliza esta metodologia uma pequena proporção de indivíduos é silenciada (Smith *et al.*, 2000). Uma outra estratégia utiliza vetores de transformação com fragmentos do gene de interesse nas orientações sense e anti-sense, sendo flanqueados por um intron. Essa estratégia favorece uma alta proporção de plantas silenciadas (quase 100%) e vem sendo denominada intron hairpin RNA (ihpRNA) (Smith *et al.*, 2000).

Os mutantes fornecem uma valiosa fonte para o estudo do desenvolvimento vegetal, uma vez que o efeito do gene pode ser identificado e seu papel no desenvolvimento atribuído.

2.2.1. Genética do desenvolvimento do estame

Defeitos no desenvolvimento da antera podem gerar fenótipos de macho esterilidade, ou seja, a ausência de grãos de pólen ou a incapacidade destes na fertilização dos óvulos. Estes mutantes podem ser distinguidos do tipo selvagem pela ausência do desenvolvimento da siliqua, já que o desenvolvimento da siliqua está condicionado a fertilização. Entre os mutantes descritos foram relatados aqueles que apresentam defeitos na morfologia da antera, microsporogênese, desenvolvimento e função do pólen.

A interação entre os genes MADS-box das classes: B (*APETALA 3* [*AP3*] e *PISTILLATA* [*PI*]), C (*AGAMOUS* [*AG*]) e E (*SEPALLATA1/2/3* [*SEP1/2/3*]) são responsáveis por especificar a formação do estame. Após a especificação, os genes das classes B, C e E continuam sendo expressos durante todo o desenvolvimento do estame (Bowman *et al.*, 1991; Pelaz *et al.*, 2000; Jack *et al.*, 1992). Mutações em qualquer um dos genes MADS-box das classes B, C ou E produzem flores com alterações homeóticas, nas quais os estames encontram-se ausentes.

Muitos dos genes responsáveis pela especificação dos tecidos formadores da antera permanecem, em grande parte, desconhecidos. Um dos genes descritos envolvido neste processo é o *SPOROCYTELLES/NOZZLE* (*SPL/NZZ*). Este gene é necessário para o desenvolvimento das células arqueosporais e, conseqüentemente, para o desenvolvimento das células mãe do micrósporo de *A. thaliana* (Schiefthaler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999).

Ito e colaboradores (2004) demonstram, em *A. thaliana*, que AG possui diferentes funções durante o desenvolvimento inicial e tardio do estame. A atividade prolongada de AG é necessária na formação dos estames normais. Este fato sugere que AG regula a expressão de genes com diferentes funções que atuam de uma maneira combinada na formação do estame. Os resultados demonstraram que a microsporogênese é induzida pela atividade temporalmente controlada de AG. Uma vez o processo induzido, ele procede independentemente da função de AG. Foi mostrado também que o gene *SPL/NZZ*, é um dos alvos diretos de AG. Desta forma, este gene parece ser parte da cascata central do desenvolvimento floral, induzindo a esporogênese até chegar o processo final da gametogênese (Ito *et al.*, 2004).

O gene *EXS (EXTRA SPOROGENOUS CELLS) / EMS1 (EXCESS MICROSPOROCTES1)*, em *A. thaliana*, também é um dos genes responsáveis pela microsporogênese e formação dos tecidos da antera. Os mutantes apresentam o aumento do número de divisões celulares na camada L2 da antera, gerando uma grande quantidade de células esporogênicas. O tapete e, freqüentemente, a camada média encontram-se ausentes. Este gene é exigido para a especificação do número inicial de células arqueosporais. Ainda não está claro, se este gene é exigido para a especificação do tapete, ou se, o aumento da quantidade das células esporogênicas seria responsável pela ruptura do tapete e da camada média (Canales *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002).

Recentemente outros genes como: *TAPETUM DETERMINANT1* (Yang *et al.*, 2003), *ABORTED MICROSPORES* (Sorensen *et al.*, 2003) e *MALE STERILE1* (Wilson *et al.*, 2001) têm sido associados a fenótipos de macho esterilidade. Foi demonstrado que estes genes são fundamentais para o desenvolvimento normal da

antera e a sua ausência ou má função inviabiliza a formação de grãos de pólen viáveis.

2.3.1. Estudo da expressão gênica

Muitos genes com funções regulatórias conhecidas ou supostas são freqüentemente expressos em domínios limitados e/ou durante certos estágios do desenvolvimento floral. A expressão ectópica destes genes, como por exemplo, *AP3*, *AG* e *PI* resultam em novos fenótipos (Jack *et al.*, 1992; Mizukami and Ma, 1992; Goto and Meyerowitz, 1994). Estes resultados indicam que o controle espacial e temporal da expressão gênica é crucial para o desenvolvimento dos órgãos florais. Portanto, o conhecimento do padrão de expressão vinculado aos dados morfológicos e fisiológicos dos tecidos podem fornecer informações importantes para discriminar a função do gene. As análises temporais do acúmulo de RNA podem ser verificadas por uma série de técnicas como *northern blot*, RT-PCR, PCR de tempo real. Além da análise temporal, a localização do mRNA no tecido da planta fornece a informação espacial da expressão.

As funções desempenhadas pelos genes responsáveis na especificação dos órgãos florais já foram bem caracterizadas. Contudo, ainda não está claro de que maneira estes fatores transcricionais participam do processo de formação dos tecidos florais através da organogênese. Não se sabe se há redundâncias funcionais, *feedback* regulatórios, interações sinérgicas ou interdependências funcionais entre os fatores. Uma das questões que permanece sem resposta está relacionada ao desenvolvimento do estame, pois ainda não são conhecidos os

genes que atuam nas vias secundárias aos fatores transcricionais das classes B (*AP3/PI*) e C (*AG*) de identidade dos órgãos florais. Desta forma, estes fatores transcricionais podem ser diretamente ou indiretamente responsáveis pela ativação de muitos genes envolvidos na morfogênese do estame. Além disso, é desconhecido se eles controlam a expressão de outros reguladores transcricionais ou se afetariam os níveis transcricionais dos genes que codificam proteínas estruturais, exigidas para a diferenciação celular.

Para identificar os possíveis alvos dos genes de classe B e C duas estratégias têm sido utilizadas: (1) *screening* para mutações que afetam a formação do estame, e (2) métodos de perfil transcricional, incluindo a hibridização subtrativa e o *screening* diferencial de bibliotecas de cDNA ou arranjos. Estas técnicas permitem a identificação de genes que são específicos ou preferencialmente expressos nos estames.

A utilização da tecnologia do microarranjo permite a verificação de todos os genes presentes no genoma. A grande vantagem do microarranjo em relação às outras técnicas já utilizadas é permitir a detecção simultânea de milhares de transcritos em um único experimento (Graves, 1999).

Recentemente foi analisada a expressão em nível global dos genes de cada órgão floral através da comparação de diferentes mutantes florais com microarranjo. Muitos dos genes identificados podem ser prováveis componentes das vias regulatórias envolvidas no desenvolvimento dos órgãos florais. Alguns destes genes codificam proteínas com pressupostas funções regulatórias, muitas das quais ainda não foram caracterizadas (Wellmer *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi realizada a comparação entre o perfil da expressão de genes da inflorescência e botões florais

das plantas selvagens e dos mutantes homeóticos florais, *ap1* (*apetala1*), *ap2* (*apetala2*), *ap3*, *pi* e *ag*. Para este experimento foi utilizado arranjo de oligonucleotídeos de todo o genoma, bem como arranjos de cDNA, cuja composição foi enriquecida de elementos representando transcritos específicos de flores. O fato de diferentes tipos de órgãos florais serem perdidos nos mutantes permite que se identifique transcritos que são especificamente expressos ou que pelo menos contribuam enriquecendo um dos tipos de órgãos florais. A predição na identificação dos transcritos órgão-específico é feita pela comparação do conjunto de dados de cada experimento das plantas mutantes em relação as do tipo selvagem. Desta forma, foram identificados um total de 1453 genes com expressão órgão-específico, sendo: 13 genes específicos de sépalas, 18 genes específicos de pétalas, 260 genes específicos do carpelo e 1162 genes específicos do estame. Dentre os 1162 genes específicos do estame, 992 foram preditos por apresentar expressão no pólen (Wellmer *et al.*, 2004).

Para confirmar os resultados obtidos no experimento de microarranjo, foi feito PCR de tempo real para alguns genes e, posteriormente, realizado hibridização *in situ*. Os resultados obtidos destes experimentos corroboraram com os resultados do microarranjo. Na hibridização *in situ*, o padrão de expressão dos transcritos caracterizados órgãos-específicos sugere que a maioria é expresso nos estágios tardios do desenvolvimento floral (Wellmer *et al.*, 2004).

Este estudo foi realizado com a utilização de inflorescências inteiras das linhagens dos mutantes florais (Wellmer *et al.*, 2004). Esse primeiro trabalho visou catalogar os genes expressos nos órgãos florais sem preocupação inicial de relacioná-los com os estágios do desenvolvimento. Apesar destas informações

serem extremamente valiosas do ponto de vista biológico, o fato de terem sido utilizadas inflorescências inteiras acabou por “diluir” os transcritos expressos nos estágios iniciais do desenvolvimento (Wellmer *et al.*, 2004). Como o processo de diferenciação celular ocorre no início do desenvolvimento da antera, transcritos presentes nesta etapa possivelmente podem ser regulados pelo complexo transcricional *AP3-PI-AG-SEP3* responsável pela identidade do estame.

2.3.1.1. Produção do chip de cDNA específico de flor

Nos últimos anos, uma série de instituições públicas nos Estados Unidos e Europa oferecem serviços de preparação de *chips* de cDNA a preço de custo para os pesquisadores interessados em utilizá-los em pesquisas sem fins lucrativos. Algumas empresas também oferecem esse tipo de serviço fornecendo chips de cDNA ou chips de oligonucleotídeos. No laboratório do Prof. Meyerowitz (California Institute of Technology – Pasadena, USA) no final de 1999 começou a ser realizado o projeto de produção um *chip* de cDNA. Na época, o único material disponível para construção do mesmo era a coleção da ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center). Essa coleção era limitada, sendo constituída por 10.000 elementos. Estes elementos foram gerados por um número relativamente pequeno de ESTs que apresentavam redundâncias. Havia problemas de contaminação, assim como de endereçamento dos clones. Também foi possível constatar que genes importantes no processo de desenvolvimento floral estavam pouco representados ou ausentes.

Para a produção da biblioteca de genes foi utilizada a hibridização subtrativa entre RNA de flor e folha. Posteriormente, realizando a síntese de cDNA e em seguida a subtração baseada em PCR. Os fragmentos resultantes foram clonados em vetores específicos para clonagem de produtos de PCR. Após esta etapa, 400 clones foram seqüenciados e o grau de redundância avaliado. Os genes identificados que possuíam mais de três cópias na amostra foram selecionados. Estes clones foram utilizados para produção de sondas e na seleção negativa de colônias para a introdução na biblioteca de cDNA de flor. Um total de 1600 clones foram seqüenciados e utilizados para redução do grau de redundância da biblioteca. O PCR também foi utilizado como estratégia alternativa para diminuição da redundância, já que a hibridização de colônias se demonstrou pouco eficaz para uma população de genes específicos (Wellmer *et al.*, 2004).

No final um total de 7449 elementos resultantes da hibridização subtrativa foram incorporados ao *chip*. Além destes elementos, foram introduzidos ao *chip*: 297 genes caracterizados como relevantes ao desenvolvimento floral; 2632 elementos originários do banco de genes do Instituto Kazusa do Japão (expressos em flor); 195 elementos controle com expressão constitutiva; 243 elementos para controle interno (136 elementos ocupados com genes não específicos de *A. thaliana* e 107 elementos onde não foi introduzido DNA). O número total de elementos no chip produzido foi de 10816 (Wellmer *et al.*, 2004).

2.3.1.2. Identificação de genes expressos na antera

A comparação entre o mutante *apetala3-3* (mutante nulo do gene *AP3*) e o tipo selvagem nas etapas iniciais de desenvolvimento floral (Figura 5) visa identificar genes que são preferencialmente expressos nos estames e nas pétalas (Alves-Ferreira *et al.*, 2002). No mutante nulo floral *ap3-3* estes órgãos encontram-se ausentes. As flores do tipo selvagem e do mutante *ap3-3* foram divididas em duas fases: (1) de diferenciação (botões florais menores que 0,5 mm), e (2) de maturação (botões florais maiores que 0,5 mm). Somente flores menores que 0,5 mm foram utilizadas para extração de RNA. Os RNAs foram extraídos e utilizados no processo de marcação com cianinas 3 e 5. A cianina 3 foi incorporada ao cDNA das flores mutantes *ap3-3* e a cianina 5 ao cDNA das flores do tipo selvagem. A reversão dos corantes também foi utilizada para diminuição de ruído por incorporação inespecífica. A hibridização foi realizada em microarranjos produzidos pela técnica de gotejamento pelo robô da *BIROBOTICS* com iniciadores longos contendo o genoma completo da *A. thaliana* fornecido pela empresa *OPERON-QIAGEN*. Todos os experimentos de hibridização foram realizados no mínimo com três amostras biológicas independentes. Os microarranjos foram lidos no scanner confocal Axon 4000A e os resultados capturados pelo programa *GENEPIX*. As planilhas com os resultados foram avaliadas no pacote de software *ROSETTA RESOLVER* (Alves-Ferreira *et al.*, 2002).

Após a identificação de dezenas de genes diferencialmente expressos, nos estames e nas pétalas, foi realizada uma seleção dos genes que codificavam para proteínas com possíveis domínios envolvidos na ligação ao DNA ou proteínas com

funções ainda desconhecidas. O vetor onde o gene estava clonado foi utilizado para síntese da sonda de RNA através da transcrição *in vitro* marcada com digoxigenina. Após a determinação do padrão espacial da expressão dos genes nos tecidos da inflorescência, foram selecionados aqueles que apresentaram expressão relacionada com o processo de histo-diferenciação do estame (Alves-Ferreira *et al.*, 2002).

Experimentos posteriores de hibridização *in situ* e PCR em tempo real confirmaram que três dos genes identificados são expressos especificamente durante as fases iniciais do desenvolvimento do estame (Alves-Ferreira *et al.*, 2002). Os genes identificados foram:

(1) **At1g27710**, expresso especificamente no tapete da antera (Figura 6A - C). Este gene codifica para uma proteína sem similaridade com qualquer proteína já caracterizada. A análise de PCR em tempo real demonstrou que este gene é expresso preferencialmente nas flores (Figura 6D).

(2) **At1g12080**, possui um amplo padrão de expressão, sendo encontrado nos tecidos parenquimáticos associados ao tecido vascular do filete da antera e do pedúnculo floral, no funículo do óvulo e no septo central do ovário (Figura 7A - I). Este gene codifica para uma proteína com alta similaridade com a proteína moesina. Análise de PCR em tempo real demonstrou que este gene é preferencialmente expresso em flores, raízes e também no eixo de inflorescência (Figura 7J).

(3) **At2g42940**, expresso exclusivamente no tapete da antera, mais especificamente na fase em que os micrósporos encontram-se associados em tétrades, após esta fase não se observa mais sua expressão (Figura 8A - C). Este gene codifica para uma proteína que possui alta similaridade com proteínas HMGA

relacionadas com o controle da transcrição gênica em plantas. A análise de PCR em tempo real demonstrou que este gene é preferencialmente expresso nas flores (Figura 8D).

Para o estudo das funções destes três genes o Prof. Marcio optou pela estratégia de transformação das plantas utilizando vetores binários para a indução do PTGS, assim como para a super-expressão dos genes em questão. Para a construção destes vetores, foram utilizados os mesmos fragmentos obtidos na transcrição *in vitro*. Ambas as estratégias são utilizadas com frequência para a caracterização de genes em plantas e outros organismos. A estratégia de super-expressão foi realizada através da inserção de cDNA, dos genes *At1g12080* e *At2g42940*, sob controle transcricional do promotor de expressão ectópica em plantas, no caso o promotor 35S do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV) (Figura 9A). O objetivo desta estratégia é verificar se a super-expressão do gene em outros tecidos e órgãos da planta, onde ele não é originalmente expresso, pode resultar em alterações fenotípicas geralmente por ganho de função. A estratégia para o silenciamento gênico foi através da transformação das plantas com um T-DNA que possui fragmentos do cDNA, dos genes em questão, nas orientações sense e anti-sense flanqueadas por um intron (Figura 9B). Os fragmentos de cDNA dos genes *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940* utilizados possuem: 109, 180 e 150 nucleotídeos, respectivamente. Houve um cuidado especial na seleção dos fragmentos de cDNA para que não houvesse 20 nucleotídeos de homologia com outra seqüência nucleotídica existente. Isto, para que não ocorresse o silenciamento inespecífico de outros genes similares aos escolhidos. Para o controle da expressão do mecanismo de indução do PGTS também foi utilizado o promotor 35S CaMV. O

objetivo neste caso é verificar se a ausência da expressão dos genes em questão pode resultar em diferenças fenotípicas nas plantas transgênicas.

As construções para a super-expressão e para o silenciamento dos genes (Figura 9A e B) foram feitas através da tecnologia *GATEWAY™* (Invitrogen, Gainthesburg, MD, USA). Esta técnica é baseada na recombinação-sítio específica. Desta forma, quando há a introdução do fragmento de interesse ocorre a retirada dos genes *ccdB* e *CmR* contidos nos vetores. Esta estratégia fornece uma rápida, prática e confiável alternativa para a clonagem de seqüências.

As plantas selvagens foram transformadas pelo Prof. Marcio através do método de infiltração com as construções *At2g42940-RNAi*, *35S::At2g42940*, *At1g12080-RNAi*, *35S::At1g12080* e *At1g27710-RNAi* e as sementes coletadas. Além da região que será responsável por conferir o silenciamento ou a super-expressão de cada gene, há o gene *NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE II (NPTII)* no T-DNA que confere à planta resistência à canamicina. A resistência à canamicina será utilizada no processo de seleção das plantas transgênicas.

Figura 5 Estratégia para a identificação dos genes específicos do estame expressos durante o estágio inicial do desenvolvimento floral (Alves-Ferreira et al., 2002). Se – sépala; Pe – pétala; St – estame; C – carpelo; Wt – selvagem.

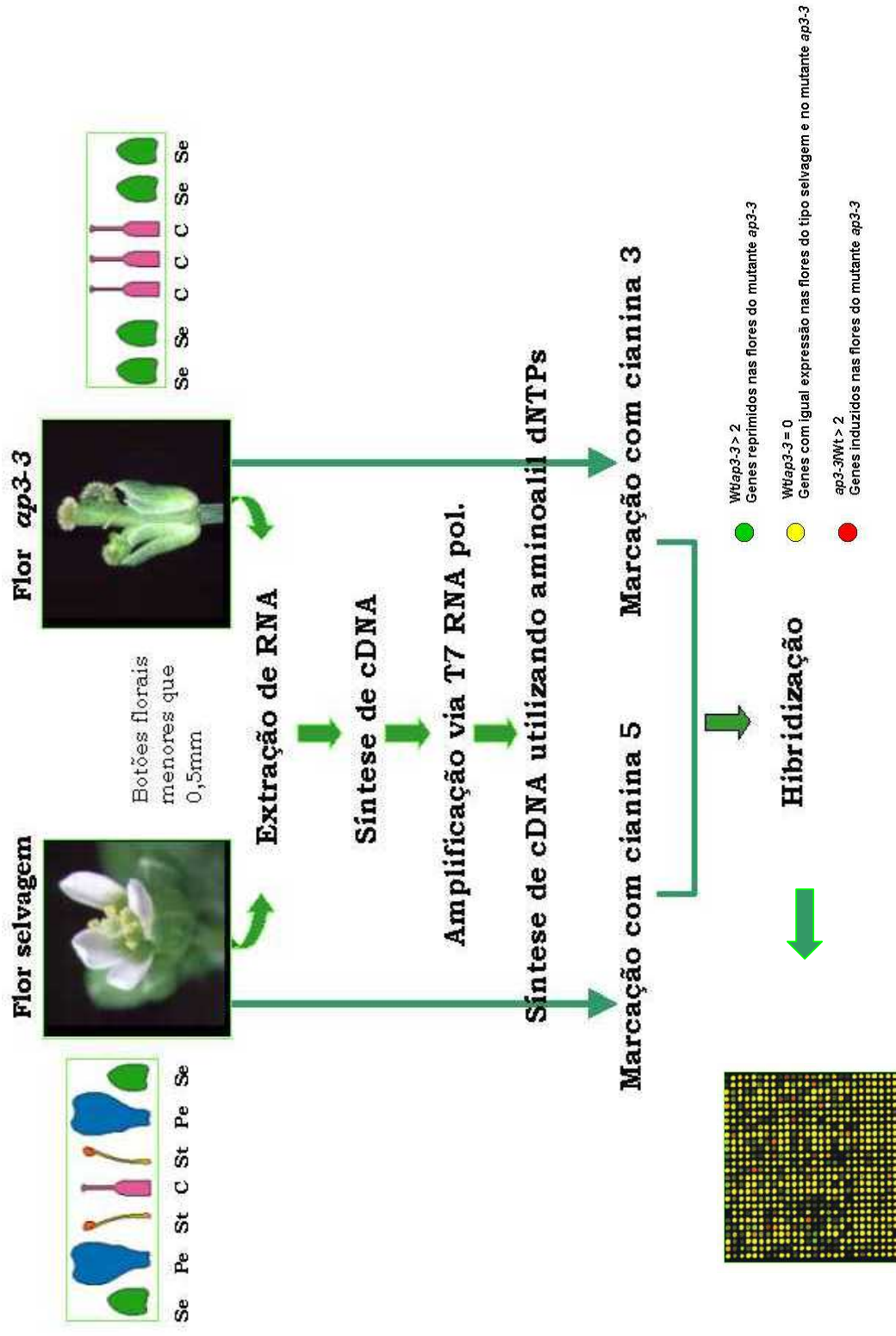


Figura 6 Análise da expressão do gene *At1g27710*.

Hibridização *in situ* utilizando sonda anti-sense do RNA *At1g27710*. O híbrido mRNA do gene *At1g27710*/sonda marcada com digoxigenina é identificado pelo precipitado roxo azulado no tecido. Cortes transversais de flores selvagem no estágio 7 (A, B e C). C – Carpelo; St – Estame; Pe – Pétala; Se – Sépala; Setas– Sinal de hibridização.

PCR em tempo real do *At1g27710* em diferentes órgãos. Ct (cycle threshold) corresponde ao número de ciclos em que todas as amostras estão em fase logarítmica de amplificação onde é possível fazer uma análise semiquantitativa da mRNA das amostras. Uma unidade de Ct corresponde a aproximadamente 1.9x a quantidade de transcrito quando duas amostras são comparadas em um experimento. Como controle de quantidade e amplificação foram utilizados iniciadores para o gene da actina2 e 8 de *A. thaliana* (D).

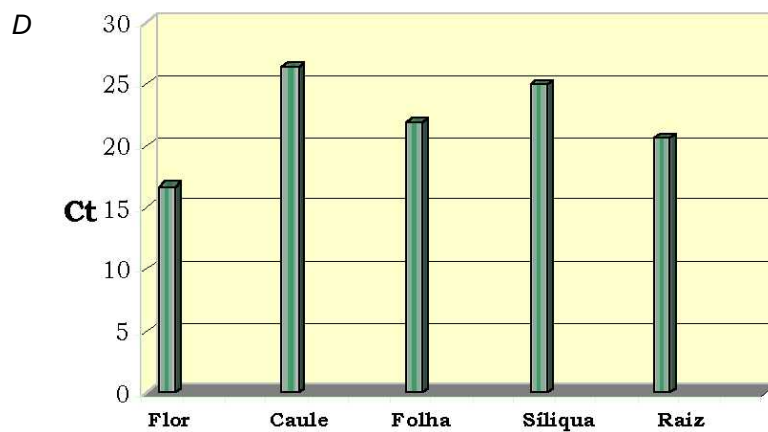
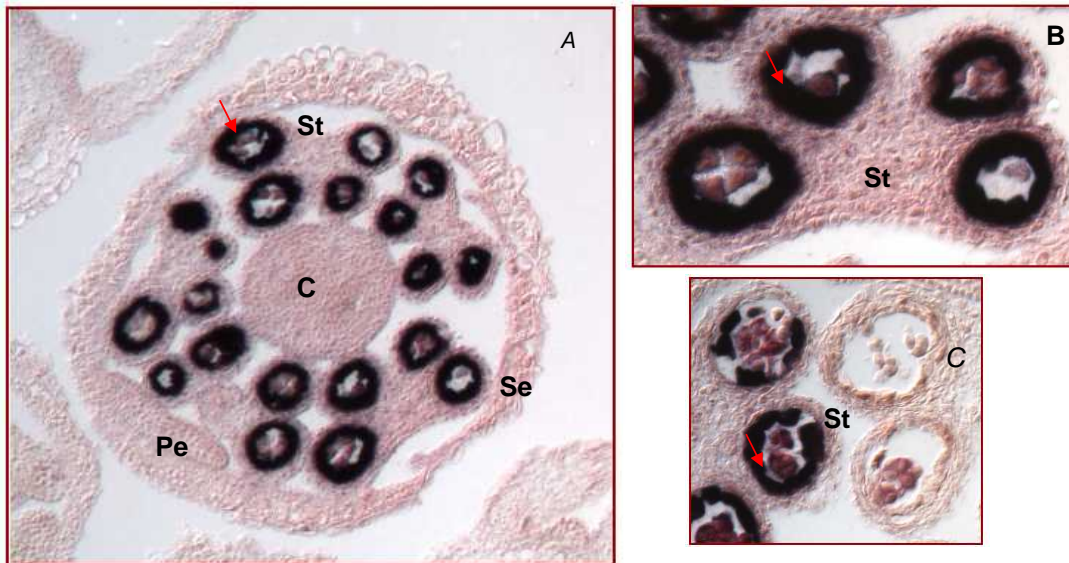


Figura 7 Análise da expressão espacial do gene *At1g12080*.

Hibridização *in situ* utilizando sonda anti-sense do RNA *At1g12080*. O híbrido mRNA do gene *At1g12080*/sonda marcada com digoxigenina é identificado pelo precipitado roxo azulado no tecido. Cortes longitudinais de flores selvagem no estágio 6 (A); estágio 7 (B e C); 11 (D) do desenvolvimento floral. Cortes transversais do ovário das flores do tipo selvagem (E, F) e longitudinal (G e H). Corte transversal da flor do tipo selvagem (I). PCR em tempo real do gene *At1g12080* em diferentes órgãos (J). Setas – Sinal de hibridização; fu – Funículo; Ov – Ovário; St – Estame; Pd – Pedicelo.

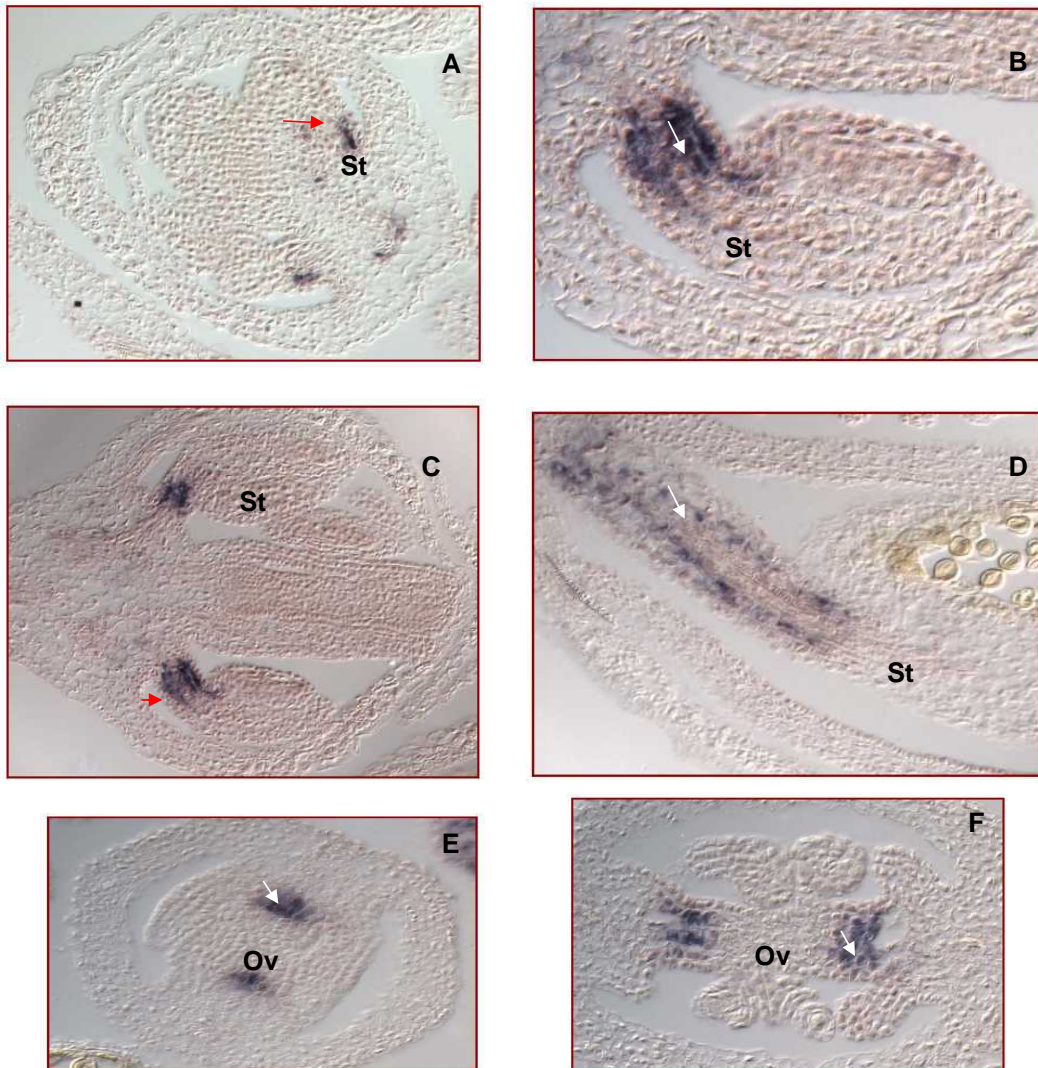


Figura 7 Análise da expressão do gene *At1g12080* – continuação

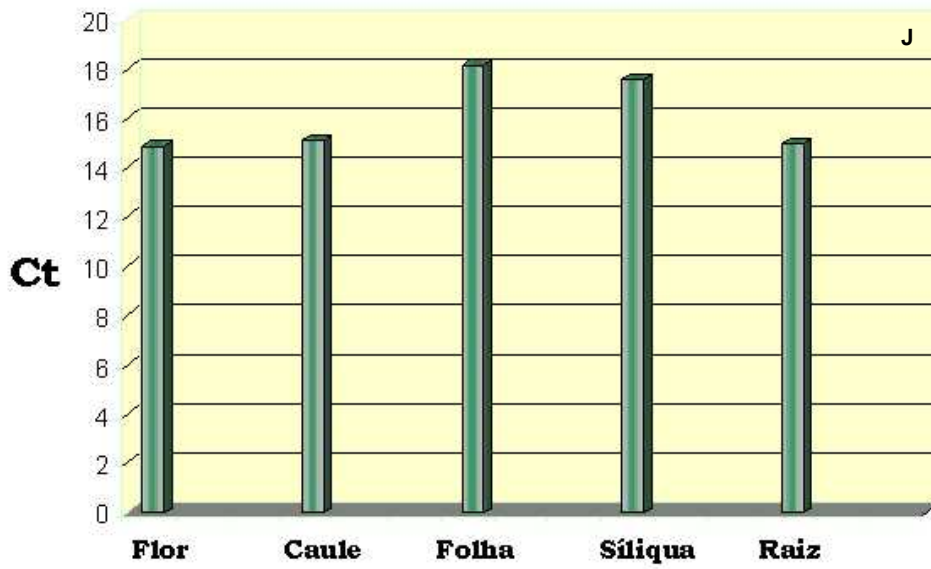
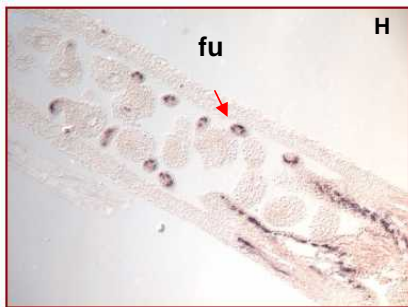


Figura 8 Análise da expressão do gene At2g42940.

Hibridização *in situ* utilizando sonda anti-sense do RNA At2g42940. O híbrido mRNA do gene At2g42940/sonda marcada com digoxigenina é identificado pelo precipitado roxo azulado no tecido. Cortes transversais e longitudinais de flores selvagem no estágio 7 do desenvolvimento floral (A, B e C). PCR em tempo real do At2g42940 em diferentes órgãos (E). Setas – sinal de hibridização; St – estame.

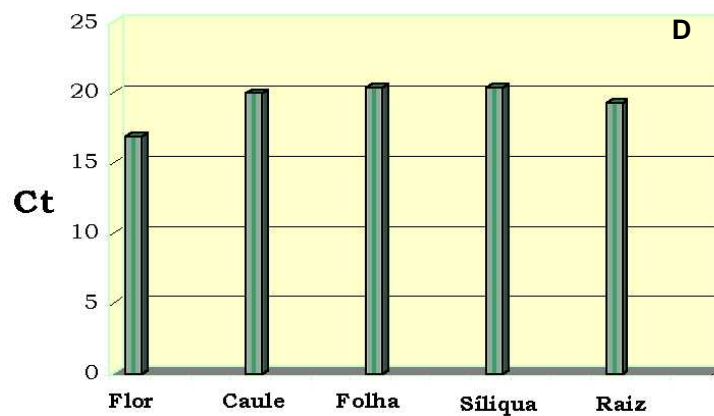
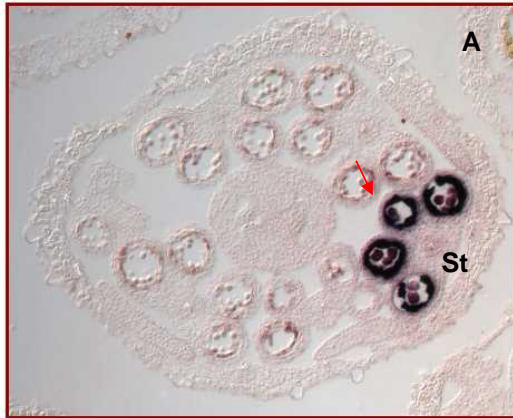


Figura 9 Diagrama das construções usadas para a transformação de *A. tumefaciens*

- (A) Sistema GATEWAY™ foi utilizado para construção dos vetores para induzir superexpressão dos genes em plantas transgênicas. Para a super expressão dos genes *At2g42940* e *At1g12080*, foi utilizado o vetor de destinos PK2GW7. Os cDNAs foram clonados nos vetores pDONR201 após serem amplificados por PCR. Os fragmentos de cDNA foram transferidos para o vetor PK2GW7 que contém sítios de recombinação compatíveis (attB x aatP ou attL x attR), a reação é mediada pela enzima clonase (GATEWAY™ Clonase Enzyme Mix).
- (B) Sistema GATEWAY™ foi utilizado para construção dos vetores para induzir o silenciamento gênico pós-transcricional dos genes *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940* em plantas transgênicas. Para a co-supressão dos genes endógenos nas plantas foi utilizado o vetor de destino pK7GWIWG2. O intron clonado entre os fragmentos na orientação sense e anti-sense foi selecionado do banco de dados de *Arabidopsis* com base nas características ideais para que haja um eficiente *splicing*. Nas plantas o vetor de expressão permite com que sejam produzidos RNAs de dupla fita (*hairpin RNA*) para a seqüência de interesse inserida no vetor. Este RNA será o alvo para que seja disparado o PTGS.

Legenda:



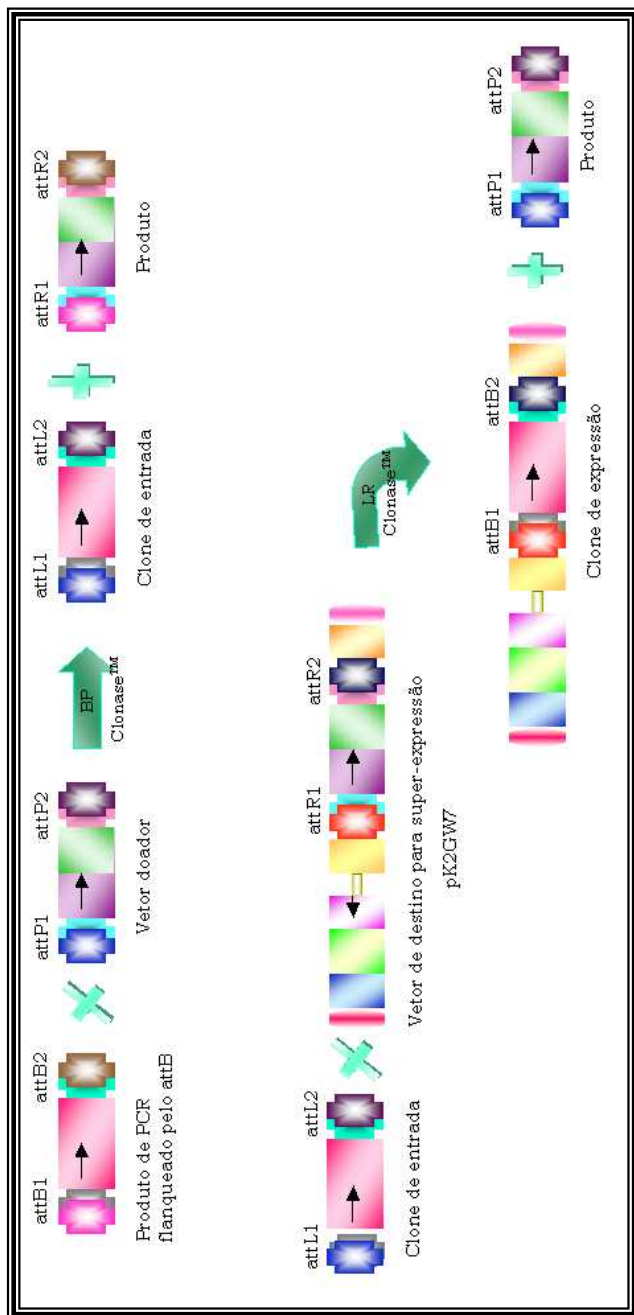


Figura 9 A

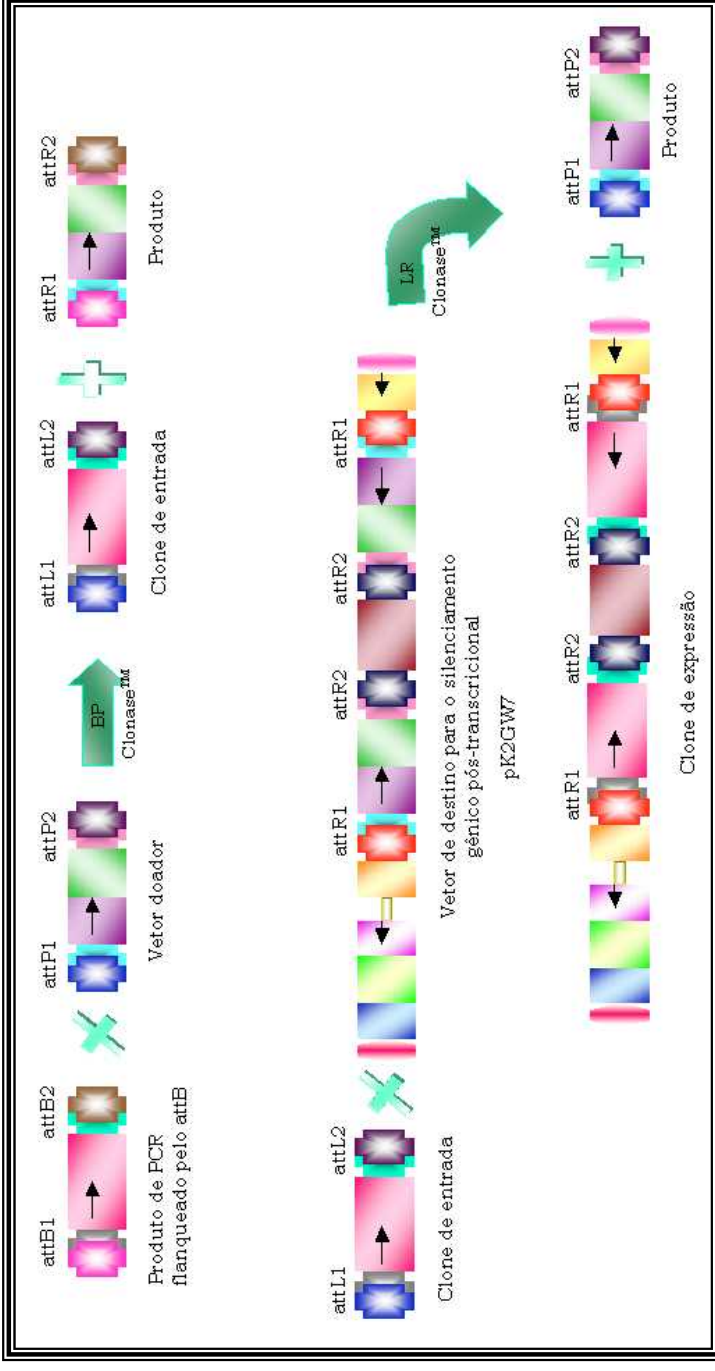


Figura 9 B

2.4. Famílias gênicas envolvidas com o desenvolvimento vegetal

O estudo da morfologia floral no contexto evolutivo tem sido sustentado pela análise genética que permite compreender os mecanismos moleculares envolvidos na formação dos órgãos na planta e na evolução destas estruturas. Os genes responsáveis por controlar o desenvolvimento, na maioria das vezes, são os genes homeóticos. Estes genes pertencem a um número limitado de famílias multigênicas que codificam fatores transcricionais. As análises demonstraram que os membros do grupo de genes homeóticos são altamente conservados e tendem a compartilhar funções similares na morfogênese das flores. A grande maioria dos genes homeóticos florais pertence à família gênica MADS-box.

2.4.1. Genes MADS-box

Todos os membros da família gênica MADS-box atuam como fatores transcricionais e compartilham uma seqüência altamente conservada de aproximadamente 180 nucleotídeos. Esta seqüência codifica um domínio de ligação ao DNA, denominado de MADS-box. O domínio MADS reconhece a seqüência específica [CC(A/T)₆GG], denominada CArG-box, na região regulatória de seus genes alvos (Hayes *et al.*, 1988; Shore and Sharrocks, 1995; Riechmann *et al.*, 1996). O nome da família gênica MADS-box é uma acronímia derivado dos primeiros genes descritos, respectivamente de: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE1*

(*MCM1*) em leveduras (Passamore *et al.*, 1988), *AGAMOUS (AG)* em *A. thaliana* (Yanofsky *et al.*, 1990), *DEFICIENS (DEF)* em *Antirrhinum majus* (Sommer *et al.*, 1990; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992) e *SERUM RESPONSIVE FACTOR (SRF)* em humanos (Norman *et al.*, 1988).

As análises filogenéticas demonstraram que a duplicação do gene MADS-box ancestral ocorreu antes da divergência de plantas, animais e fungos, dando origem a duas linhagens, que foram caracterizadas como: tipo I e tipo II (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a).

A grande maioria das proteínas MADS-box de plantas fazem parte da categoria tipo II, também denominada de MIKC. Da região N-terminal a C-terminal da proteína, podem ser identificados quatro domínios funcionais característicos (Figura 10A): MADS-box (M); intermediário (I), queratina-*like* (K) e carboxi terminal (C). O domínio MADS-box é altamente conservado (semelhante ao *MEF2-like* – *MYOCYTE ENHANCER FACTOR2-like*). O domínio K, moderadamente conservado, é específico dos genes MADS-box de plantas. Este domínio é importante na dimerização entre proteínas e na especificidade funcional provavelmente formando uma estrutura *coiled-coil* (Davies *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1997). O domínio I, pouco conservado, ajuda determinar a formação dos dímeros que se ligam ao DNA (Riechmann and Meyerowitz, 1997). Por fim, o domínio C-terminal, pouco conservado, pode funcionar como um domínio de trans-ativação (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Honma and Goto, 2001).

Ao contrário das proteínas do tipo II, as proteínas tipo I são caracterizadas por possuírem o domínio MADS-box semelhante ao *SRF* (Figura 10B). A análise estrutural destas proteínas demonstrou a presença de alguns motivos conservados

na região C-terminal. A identificação destes domínios permitiu a separação em duas classes distintas (classe M e N), entretanto a terceira classe (classe O) contém proteínas que não possuem domínios conservados (De Bodt *et al.*, 2003).

Apenas uma proteína do tipo I, PHERES1 em *A. thaliana*, foi caracterizada. Esta proteína é expressa transitoriamente durante o desenvolvimento do embrião e do endosperma (Köhler *et al.*, 2003). As outras proteínas pertencentes ao tipo I são pouco exploradas e não se tem conhecimento sobre as funções desempenhadas por elas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b; De Bodt *et al.*, 2003). A ausência de fenótipos mutantes para os genes do tipo I, talvez seja devida à redundância funcional com outros genes ou por serem expressos apenas sob condições específicas.

Há duas diferenças entre as proteínas MADS-box do tipo I e tipo II: (1) a ausência do domínio K nas proteínas do tipo I (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b), e (2) os genes do tipo I apresentam um ou dois exons, enquanto a maioria dos genes do tipo II apresentam em média sete exons (De Bodt *et al.*, 2003).

A conclusão do seqüenciamento do genoma de *A. thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) possibilitou a identificação de todos os possíveis genes MADS-box. A anotação baseada no genoma, resultou na descoberta de aproximadamente 100 genes (Parenicová *et al.*, 2003), o que permitiu uma melhor análise e classificação dos componentes desta família gênica.

Nas angiospermas os genes MADS-box abrangem diversas funções biológicas, sendo importantes nos mais variados processos relacionados ao desenvolvimento. Com relação ao controle do desenvolvimento vegetativo, os genes MADS-box estão envolvidos no desenvolvimento das raízes, folhas e embriões (Zhang and Forde, 2000; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b; Huang *et al.*, 1995; Ma *et al.*,

1991; Rounsley *et al.*, 1995; Theißen *et al.*, 2000); pigmentação da semente e desenvolvimento do endotélio (*TRANSPARENT TESTA16* [*TT16*], Nesi *et al.*, 2002). No desenvolvimento reprodutivo, os genes MADS-box participam do período de floração (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* [*SOC1*], Samach *et al.*, 2000; *AGAMOUS-LIKE24* [*AGL24*], Michaels *et al.*, 2003, *SHORT VEGETATIVE PHASE* [*SVP*], Hartmann *et al.*, 2000); determinação da identidade do meristema floral (*AP1*, Mandel *et al.*, 1992; *FRUITFULL* [*FUL*], Gu *et al.*, 1998); determinação da identidade dos órgãos florais (*AP1*; *SEP1/SEP2/SEP3*, Pelaz *et al.*, 2000; *AP3*, Jack *et al.*, 1992; *PI*, Goto and Meyerowitz, 1994; *AG*, Yanofsky *et al.*, 1990) e desenvolvimento do fruto (*SHATTERPROOF 1 e 2* [*SHP1 e SHP2*], Liljegren *et al.*, 2000). Apesar de estarem associados a vários processos do desenvolvimento, os genes MADS-box foram melhor caracterizados no desenvolvimento reprodutivo.

2.4.2. Controle genético do desenvolvimento reprodutivo

A formação do meristema de inflorescência marca a transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva. Uma vez que o meristema de inflorescência é estabelecido, ocorre a expressão dos genes necessários para a formação do meristema floral. No meristema floral, por sua vez, há a ativação de genes responsáveis pela formação dos órgãos florais.

Algumas proteínas estão envolvidas na formação do meristema de inflorescência como por exemplo, os fatores transcricionais MADS-box *FUL*, *CAULIFLOWER* e *AP1* que atuam em conjunto com a proteína não relacionada

LEAFY (LFY) (Blázquez *et al.*, 1997; Hempel *et al.*, 1997; Ferrádiz *et al.*, 2000; Mandel and Yanofsky, 1995; Weigel *et al.*, 1992).

TERMINAL FLOWER1 (TFL1) possui um importante papel na manutenção do estado indeterminado do meristema de inflorescência, reprimindo a atividade de *AP1* e *LFY* e impede a formação de flores terminais (Shannon and Meeks-Wagner, 1993; Ratcliffe *et al.*, 1998).

No meristema floral a expressão dos genes *LFY* e *AP1* (Weigel *et al.*, 1992; Mandel *et al.*, 1992) perdura até os estágios iniciais do desenvolvimento floral. Estes genes são essenciais para a formação das flores, assim como para todas as vias de indução da floração.

Antes da formação dos órgãos nos primórdios florais, o meristema floral é dividido em quatro regiões concêntricas. Cada região é caracterizada por um único padrão de expressão dos genes responsáveis pela identidade das sépalas, pétalas, estames e carpelo. Esta teoria foi proposta de acordo com o modelo “ABCE” de identidade dos órgãos florais. A maioria dos genes pertencentes a este modelo fazem parte da família gênica MADS-box e possuem seus papéis funcionais bem caracterizados.

2.4.3. Família MADS-box e o desenvolvimento floral

Os fatores transcricionais MADS-box melhores caracterizados são aqueles que estão envolvidos na determinação da identidade dos órgãos florais. O modelo “ABC” de identidade dos órgãos florais explica como a ação combinada das três classes de genes determina a identidade dos quatro órgãos florais (Coen and

Meyerowitz, 1991). Para obter a formação das sépalas, no primeiro verticilo floral, é necessária somente a atividade de genes de função A [*AP1* e *AP2*]. Para a especificação das pétalas, no segundo verticilo floral, é necessária a presença de genes de funções A e B [*AP3* e *PI*]. Similarmente, a combinação de genes de funções B e C [*AG*] promovem a formação dos estames, no terceiro verticilo floral. A identidade do carpelo, no quarto verticilo floral, é resultante da atividade do gene de função C.

Recentemente, o modelo “ABC” foi refinado e passou a ser designado de modelo “ABCDE” (Theiβein and Saedler, 2001; Theiβein, 2001) (Figura 11A). Neste modelo os genes de função D são necessários para a identidade dos óvulos. Os genes de função E (*SEP1/2/3*) são necessários para a especificar a identidade das pétalas, estames e carpelos (Pelaz *et al.*, 2000). A base molecular do modelo “ABCE” é a formação de complexos proteicos ternários ou quaternários (Honma and Goto, 2001) (Figura 11B). Dentre todos os genes do modelo “ABCE” o único que não faz parte da família gênica MADS-box é o *AP2*.

Mutações nas classes de genes “ABCE” que regulam a identidade dos órgãos florais em *A. thaliana* resultam em fenótipos com alterações homeóticas (Figura 11C). As plantas que apresentam mutações nos genes de função A, possuem conversão homeótica no primeiro e no segundo verticilo floral (Figura 11C).

Plantas mutantes *ap3* e *pi* possuem fenótipos similares com alterações no segundo e terceiro verticilos florais apresentando sépalas no lugar das pétalas e carpelos no lugar dos estames (Jack *et al.*, 1992; Goto and Meyerowitz, 1994) (Figura 11C). As proteínas *AP3* e *PI* formam heterodímeros que se reconhecem e se ligam *in vitro* as seqüências CArG-box (Riechmann *et al.*, 1996), presumivelmente

atuam regulando sua própria transcrição. Estas proteínas também podem regular a transcrição de genes de vias secundárias responsáveis pela morfogênese das pétalas e estames e na diferenciação de tipos celulares específicos nestes órgãos.

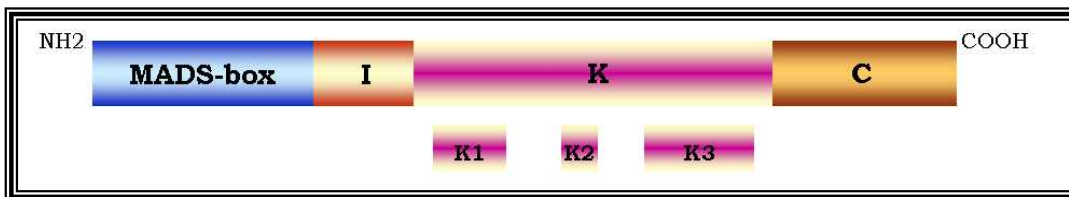
O mutante *ag* apresenta conversões homeóticas no terceiro e quarto verticilos florais. Os estames são substituídos por pétalas, porém no lugar do carpelo ocorre a formação de um nova flor com o fenótipo (sépala, pétala, pétala)_n. Neste mutante foi observado a perda de determinância do meristema, isto é, há uma contínua produção de órgãos florais dentro do quarto verticilo (Bowman *et al.*, 1991; Yanofsky *et al.*, 1990). Desta maneira, o gene *AG* é necessário tanto para a determinação do meristema floral quanto para a identidade dos órgãos florais. *AG* e *AP1* são antagônicos, ou seja, *AG* reprime *AP1* gerando a restrição da expressão de *AP1* nos dois primeiros verticilos florais. *AG* por sua vez é reprimido pelo *AP2* gerando a restrição da expressão de *AG* nos dois últimos verticilos florais.

Os três genes *SEP* são altamente redundantes e os mutantes para cada um dos genes apresentam apenas uma leve alteração no fenótipo. Por este motivo, foi construído um triplo mutante *sep1, 2, 3* que apresentou o fenótipo igual ao da perda de função dos genes das classes B e C, ou seja, as pétalas, estames e carpelos são substituídos por órgãos sepalóides. Este fato indica que os genes *SEP* são necessários na formação dos três verticilos florais (Pelaz *et al.*, 2000; Honma and Goto, 2001).

Figura 10 Estrutura das proteínas MADS-box.

- (A) Proteínas do tipo II. Domínio MADS-box é o domínio de ligação ao DNA. Este domínio é semelhante ao domínio *MEF-2* de animais. O domínio I (intermediário) ajuda a determinar a formação dos dímeros que se ligam ao DNA. O domínio K (*queratina-like*) atua na dimerização entre proteínas e na especificidade funcional da proteína. Os domínios K1, K2 e K3 formam a estrutura *coiled-coil*. O domínio C-terminal pode atuar como um domínio de trans-ativação.
- (B) Proteínas do tipo I. Não possuem o domínio K e o domínio MADS-box é semelhante ao domínio SRF de animais.

A



B

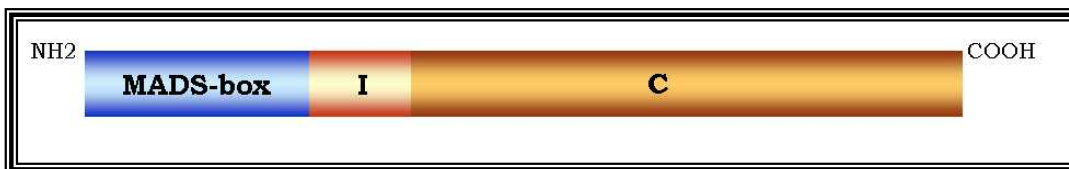
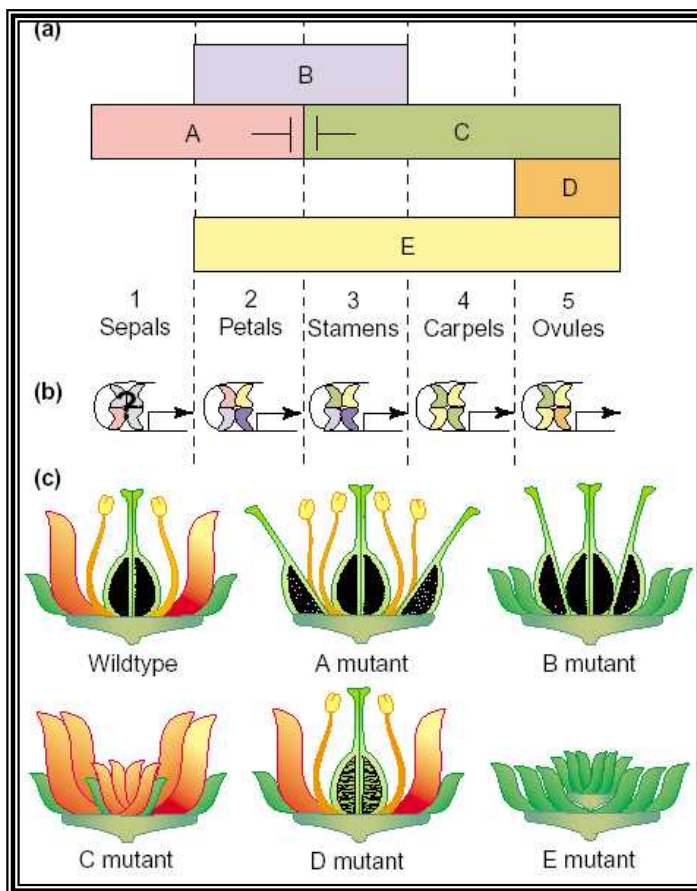


Figura 11 Modelo “ABCDE” de identidade dos órgãos florais (Ferrario *et al.*, 2004).

- (A) Os fatores transcricionais das classes A, B, C, D e E possuem atividades sobrepostas em dois verticilos florais adjacentes. As proteínas da classe A especifica as sépalas; A+B+E as pétalas; B+C+E os estames; C+E os carpelos; C+D+E os óvulos.
- (B) Esquema representativo da interação das proteínas para formar o complexo de ligação ao DNA.
- (C) Esquema demonstrando as alterações homeóticas nos mutantes de cada uma das classes. Nos mutantes da classe A, as sépalas são substituídas por carpelos e as pétalas por estames. Nos mutantes da classe B, as pétalas são substituídas por sépalas e os estames por carpelos. No mutante da classe C, os estames são substituídos por sépalas e no lugar do carpelo uma nova flor é originada com o fenótipo (sépala, pétala, pétala)_n. No mutante da classe E apenas sépalas são produzidas. Nos mutantes da classe D, os óvulos são convertidos em órgãos carpelóides.



3. Conservação dos mecanismos do desenvolvimento floral

Há mais de 200 anos acredita-se que cada um dos distintos órgãos florais tenha sido derivado de especializações foliáceas (von Goethe, 1790).

O carpelo em sua forma primitiva é considerado como uma folha dobrada, cujas margens são formadas pelas papilas estigmáticas. O carpelo envolve os óvulos servindo de proteção contra os predadores. Os carpelos primitivos eram separados, conseqüentemente ao longo do processo evolutivo fundiram-se e reduziram em número. O androceu das plantas existentes atualmente, raramente se assemelha as folhas, porém podem ser encontrados estames foliáceos entre as magnólias. Os estames talvez tenham sido originados a partir dos ramos mais finos das plantas, que eram os sustentadores dos esporângios terminais.

As sépalas e as pétalas, órgãos estéreis, formam o perianto. As sépalas na maioria das flores são verdes e fotossintetizantes. As pétalas possuem cores variadas e são atrativas para os polinizadores. As flores são, sem dúvida, um dos mais bem sucedidos produtos da evolução das plantas. Com aproximadamente 250.000 espécies existentes as angiospermas dominaram o mundo, desde seu surgimento no início do período cretáceo, há cerca de 130 milhões de anos (Ferrario *et al.*, 2004 - revisão).

A identificação dos genes que possuem funções importantes na ontogenia floral permite correlacionar o desenvolvimento com a evolução. As informações obtidas, em grande parte, ajudam a compreender como os mecanismos moleculares evoluíram. Desta forma, fornecendo uma base para a análise da evolução na diversificação da morfologia floral.

A conservação da estrutura típica da flor nas diferentes espécies de angiospermas pode ser explicada pela conservação das vias gênicas que controlam o desenvolvimento floral. Por outro lado, existe uma enorme variação da estrutura básica das flores quando se compara: o número, o tamanho e a disposição dos órgãos florais. A diversidade morfológica entre os taxa, supostamente, reflete a variabilidade genética. Admite-se que a origem e a filogenia das flores seja baseada na sua evolução molecular. Os genes MADS-box são importantes no controle das vias regulatórias e excelentes candidatos nos estudos dos processos evolutivos e do desenvolvimento.

3.1. A família MADS-box e sua importância no estudo do desenvolvimento floral durante a evolução

O suporte para a hipótese de que as flores representam folhas modificadas é fornecido pelos estudos genéticos. Os genes identificados pertencem ao modelo "ABCE" de identidade dos órgãos florais. Este modelo pode ser aplicado a quase todas as angiospermas.

As evidências genéticas demonstram que um triplo mutante com mutações nos genes de funções A, B e C apresentam conversões de todos os órgãos florais em órgãos semelhantes às folhas. Entretanto estudos de expressão ectópica indicam que os genes A, B e C não são suficiente para converter folhas em flores (Mizukami and Ma, 1992; Krizek and Meyerowitz, 1996).

Recentemente foi descoberto que os genes da classe E (*SEP1/SEP2/SEP3*) são exigidos para a especificação de pétalas, estames e carpelos. A construção do triplo mutante demonstrou que na ausência destes genes às flores são compostas apenas por órgãos sepalóides, semelhantes às folhas (Pelaz *et al.*, 2000) (Figura 11C). A expressão ectópica dos genes *SEP* combinado com os genes expressos constitutivamente de função A (*AP1*) e B (*AP3* e *PI*) são suficientes para converter as folhas vegetativas da roseta em pétalas (Pelaz *et al.*, 2001). A expressão ectópica de *PI/AP3/SEP3/AG* promove a transformação de folhas caulinares em órgãos estaminóides (Honma and Goto, 2001).

Essas informações em conjunto com a identificação de genes MADS-box em outras espécies vegetais fornecem uma base sólida corroborando com a hipótese de que as flores representam folhas modificadas. Portanto, os genes MADS-box devem ter exercido um importante papel na evolução das plantas, particularmente na evolução da arquitetura floral em angiospermas.

Apesar da separação das eudicotiledôneas e monocotiledôneas ter ocorrido há ~ 200 milhões de anos, fortes evidências genéticas e moleculares sustentam a conservação do modelo “ABCE”. Este modelo reflete uma via regulatória bastante antiga, provavelmente ocorrendo antes da divergência dos dois grupos de plantas. Paralelos podem ser feitos entre os órgãos florais das monocotiledôneas e das eudicotiledôneas através de critérios anatômicos que corroboram com as evidências moleculares (Ng and Yanofsky, 2000 –revisão).

A busca por genes ortólogos aos genes MADS-box em outras espécies de plantas ajudaria à compreensão da evolução das plantas. Além das angiospermas, genes ortólogos das classes B e C foram encontrados em gimnospermas. Isto indica

que os genes de funções B e C estavam presentes no ancestral comum de angiospermas e gimnospermas e que o padrão de expressão dos genes nas estruturas reprodutivas pode ser pré-datado da divergência destes dois grupos de plantas (~300 milhões de anos). Entretanto, a homologia das estruturas reprodutivas entre angiospermas e gimnospermas permanece incerta (Ng and Yanofsky, 2000 – revisão).

A reconstrução filogenética dos genes MADS-box permite com que estes sejam agrupados em distintas sub-famílias (ou clados). Na maioria das vezes o agrupamento em uma determinada sub-família está correlacionado com a função do gene ou com seu padrão de expressão (Theißein *et al.*, 1996; Purugganan *et al.*, 1995; Doyle, 1994). A conservação funcional dos genes ortólogos aos genes MADS-box podem determinar a identificação de homologias entre taxon de angiospermas distantemente relacionados.

3.2. Eucalipto

O eucalipto é uma angiosperma, pertence à família Myrtaceae. O gênero é formado por espécies arbóreas que possuem um crescimento acelerado. Este gênero se adapta às condições climáticas e às condições do solo, mesmo que este se encontre desgastado pelo intenso cultivo após ação do fogo (McComb & Bennett, 1986; Grothge, 1992). Por este motivo, suas espécies, vem sendo cada vez mais utilizadas no reflorestamento.

Com a crescente necessidade de matéria-prima para diversos fins industriais, muitas espécies e híbridos de eucaliptos são empregados na obtenção de fibras para a fabricação de papel, em virtude da estrutura do seu lenho. O lenho também é utilizado na produção de carvão vegetal e principalmente na indústria metalúrgica e de construção civil (McComb & Bennett, 1986). O eucalipto é uma das fontes de extração de produtos secundários como, por exemplo, óleos essenciais e taninos.

Dentre as espécies introduzidas no Brasil, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *E. urophylla* S.T. Blake foram selecionadas devido à alta qualidade de sua madeira e pelo seu rápido crescimento. Estas espécies, convencionalmente, têm sido utilizadas em técnicas de clonagem (Carvalho, 1988).

Devido à importância econômica, o eucalipto passou a ser um cultivo estratégico para o Brasil, o que suscitou uma série de iniciativas para o melhoramento genético deste gênero. Além das técnicas de melhoramento clássico empregadas, a genética molecular pode representar um salto quantitativo na domesticação desta espécie. Dentre as iniciativas realizadas, o seqüenciamento de ESTs representa o primeiro passo para o melhor conhecimento de algumas espécies.

O Projeto Genoma de Eucalipto – FORESTs: Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium (<https://forests.esalq.usp.br/>), teve por objetivo identificar o maior número possível de genes através do seqüenciamento de aproximadamente 130000 ESTs preparadas a partir de bibliotecas de diferentes tecidos e abrangendo diversos estados fisiológicos (Tabela 1). Para a identificação dos genes, as seqüências de ESTs foram anotadas automaticamente e agrupadas. Através das tecnologias de bioinformática foram realizadas as análises das

seqüências. Foi avaliada a redundância durante o seqüenciamento, a comparação (BLAST) das seqüências nos bancos de dados disponíveis mundialmente e dentro do Programa Genoma/FAPESP. Posteriormente, foi realizado o agrupamento das seqüências através de programas especiais, como CAP3 entre outros (<https://forests.esalq.usp.br/>).

O objetivo final deste projeto não é apenas a identificação dos genes em eucalipto, mas o uso dessas informações nas análises da expressão gênica permitindo o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis ao melhoramento vegetal nesta espécie arbórea. Através deste projeto poderão ser identificados genes que estejam envolvidos no controle genético dos órgãos florais e da qualidade da madeira, resistência a doenças e pragas, estresses ambientais e tolerância a deficiências nutricionais.

Através do conhecimento dos genes envolvidos no desenvolvimento reprodutivo é possível manipular esses dados visando: (1) diminuição do tempo de florescimento para auxílio em programas de melhoramento genético clássico, e (2) desenvolvimento de plantas macho estéreis para auxílio à produção de híbrido e para contensão gênica.

As características supracitadas possivelmente estão sob controle direto dos genes da família MADS-box em eucalipto. Portanto, a identificação e estudo destes genes em eucalipto, pode mais tarde fornecer os instrumentos necessários para o melhoramento genético do gênero.

Tabela 1 Descrição das bibliotecas utilizadas no Projeto Genoma de Eucaliptos para o seqüenciamento das ESTs

Biblioteca (Siglas)	Descrição da biblioteca
BK1	Casca, alburno, cerne e medula de árvores de <i>E. grandis</i> com 8 anos
CL1	Calos de <i>E. grandis</i> formados no escuro
CL2	Calos de <i>E. grandis</i> formados no claro
FB1	Botões, flores e frutos
LV2	Folhas de árvores eficientes e pouco eficientes na utilização de fósforo e boro
LV3	Folhas colonizadas com lagarta <i>Thyrinteina</i> por 7 dias
RT3	Raízes de mudas de viveiro
RT6	Raízes de árvores resistentes e susceptíveis a geada
SL1	Plântula de <i>E. grandis</i> cultivadas no escuro e expostas a luz por 3 horas antes da extração de RNA
SL4	Plântulas de <i>E. globulus</i> cultivadas totalmente no escuro
SL5	Plântulas de <i>E. saligna</i> cultivadas totalmente no escuro
SL6	Plântulas de <i>E. urophylla</i> cultivadas totalmente no escuro
SL7	Plântulas de <i>E. grandis</i> cultivadas totalmente no escuro
SL8	Plântulas de <i>E. camaldulensis</i> cultivadas totalmente no escuro
ST2	Caule de mudas com 6 meses suscetíveis a déficit hídrico preparadas com fragmento de DNA entre 0,6 e 2,0 Kb
ST6	Caule de mudas suscetíveis a déficit hídrico
ST7	Caule de árvores resistentes e suscetíveis à geada
WD2	Madeira de <i>E. grandis</i>

OBJETIVOS

Para o estudo da função de genes MADS-box em plantas utilizamos duas estratégias independentes: O datamining do banco de ESTs de eucalipto (FORESTs) na busca de seqüências que codificam para membros desta família e o estudo da função dos possíveis genes alvos de ativação transcricional das proteínas codificadas por genes MADS-box durante o desenvolvimento floral de *A. thaliana*.

Os objetivos específicos para a primeira estratégia são:

1. Identificar as possíveis seqüências expressas (ESTs) pertencentes à família gênica MADS-box presentes no banco de dados do projeto genoma de eucalipto (FORESTs: Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium).
2. Inferir prováveis funções às proteínas identificadas no banco de dados do FORESTs através da comparação de seqüência e do padrão de expressão de proteínas já identificadas em diversas espécies vegetais.

Os objetivos específicos para a segunda estratégia são:

1. Inferir as funções dos genes *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940*, expressos durante o desenvolvimento da antera de *A. thaliana*, através da indução da super-expressão e silenciamento de cada um dos genes em plantas transgênicas de *A. thaliana*.

CAPÍTULO 1



MATERIAIS E MÉTODOS

➤ Identificação das seqüências MADS-box

Com o objetivo de identificar as seqüências MADS-box presentes no banco de dados do FORESTs, foi utilizada a seqüência consenso MADS-box (Tabela 2). Esta seqüência consenso foi gerada automaticamente pelo programa *COBBLER* (*C*onsensus *B*iasing *B*y *L*ocally *E*mbedding *R*esidues, <http://blocks.fhcrc.org/blocks/cobbler.html>) sendo baseada em todas as seqüências de aminoácidos do domínio MADS-box disponíveis. Com o objetivo de comparar a eficiência da utilização da seqüência *COBBLER* também foram utilizadas, nas buscas, as seqüências consensos de aminoácidos dos domínios MADS-box referente à MEF-2 e SRF, obtidas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabela 2).

As buscas foram feitas utilizando o programa *tBLASTN*, que compara seqüências de aminoácidos com seqüências de nucleotídeos do banco de dados (Altschul *et al.*, 1997), utilizando como parâmetro matriz *BLOSUM80*. Este parâmetro é utilizado para seqüências que possuem entre 50 - 85 caracteres.

➤ Tradução da seqüências

Após as buscas foram obtidas 138 seqüências de agrupamentos de ESTs que apresentaram similaridade estatisticamente significativa com a seqüência consenso

(e-valeu menor que 10^{-5}). Para simplificar a descrição dos resultados passaremos a denominar os agrupamentos de ESTs encontrado em *Eucalyptus* como agESTs. Foi necessário utilizar as seqüências nucleotídicas de cada um dos agESTs disponíveis no banco de dados (<https://forests.esalq.usp.br/>) para que fosse possível analisar a seqüência proteica. Para a tradução das seqüências nucleotídicas de cada um dos agESTs encontrados foi utilizado o programa *BCM Search Launcher: Sequence Utilities* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>). A tradução foi feita nas seis matrizes abertas de leitura, sendo utilizada apenas a matriz aberta de leitura que contivesse o provável domínio MADS-box.

➤ **Identificação dos domínios conservados**

Com intuito de verificar a existência de domínios conservados que caracterizam a proteína como MADS-box foram realizadas análises através do programa *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) que identifica seqüências consenso a partir de aminoácidos. O programa *ProDom* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/form.php>) também foi utilizado, pois através dele é possível identificar se uma mesma seqüência possui diferentes matrizes abertas de leitura. Este artefato pode acontecer por problemas no seqüenciamento ou quando é realizado o agrupamento das seqüências. Identificado o problema, as proteínas foram editadas e utilizadas posteriormente nas futuras análises.

Após todas as 138 seqüências serem inspecionadas para presença de domínios conservados, foi observado que apenas 24 agESTs foram positivamente

identificados como prováveis seqüências MADS-box contidas no banco de dados do FORESTs . Estas seqüências positivamente identificadas apresentaram o E-value $\leq 10^{-5}$.

➤ **Identificação de novas seqüências MADS-box**

Posteriormente, para verificar a presença de novas proteínas do tipo MADS-box no banco de dados foi utilizado individualmente cada seqüência nucleotídica dos 24 agESTs. As buscas foram feitas através do programa *BLASTN*, que compara seqüências de nucleotídeos dos agrupamentos com seqüências de nucleotídeos do banco de dados. Como parâmetro foi usado matriz *BLOSUM62* (empregado quando as seqüências apresentam mais de 85 caracteres). Após as buscas foram identificados 8187 agESTs, porém só foram analisados os agESTs que apresentaram E-value menor ou igual à 1×10^{-5} . No total foram inspecionados aproximadamente 900 agESTs através dos programas *InterProScan* e *ProDom*. Após as análises foram identificados apenas seis possíveis agESTs pertencentes à família gênica MADS-box. Entretanto, cinco destes agESTs possuem o domínio MADS-box incompleto ou ausente, e por este motivo foram excluídos das análises futuras.

Para finalizar a identificação das proteínas MADS-box no banco de dados realizou-se mais uma busca. Desta vez, utilizando a seqüência consenso de aminoácidos referente ao domínio MADS-box das prováveis proteínas de eucalipto. Esta seqüência foi gerada pelo programa *MultAlin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). As buscas no banco de dados

foram feitas através do programa *tBLASTN* usando como parâmetro matriz BLOSUM80. Porém, após as análises nenhum novo agESTs foi obtido.

➤ **Alinhamento das seqüências**

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado pelo programa *CLUSTALW* (www.ebi.ac.uk/index/clustalw.html) com os parâmetros pré-definidos do programa. Para as análises filogenéticas foram utilizadas as seqüências de aminoácidos referentes às regiões MIK (~150aa) de *A. thaliana* e das prováveis proteínas de *Eucalyptus*. Foram utilizadas as seqüências de aminoácidos devido ao alinhamento das seqüências de nucleotídeos apresentarem alta variabilidade quando comparadas entre si. O alinhamento final foi visualmente inspecionado e manualmente corrigido.

➤ **Análises Filogenéticas**

As árvores filogenéticas foram realizados em colaboração com a professora Cláudia A. M. Russo, Laboratório de Biodiversidade Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, UFRJ.

As análises filogenéticas foram feitas com o programa *The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)*, versão 2.0 (Kumar *et al.*, 2000). O modelo Poisson foi utilizado em razão das médias elevadas de distância-p para possibilitar estimativas confiáveis do número de substituições entre as seqüências. As árvores filogenéticas foram obtidas pelo método *Neighbor-joining* com distância *poisson* (Saitou & Nei, 1987) e parâmetro *pair-wise deletion*. Com o intuito de verificar a

instabilidade dos ramos, foi realizado o teste de probabilidade de confiança. Este teste é conhecido por estimar de forma robusta o grau de confiabilidade dos agrupamentos em árvores de distância (Sitnikova *et al.*, 1995).

➤ Northern blot digital

O “*Northern blot digital*” foi realizado em colaboração com o professor Rogério Margis, Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, UFRJ.

O *Northern* eletrônico foi obtido para cada agEST a partir das as frequências de leituras de seqüenciamento nas bibliotecas. O número de leituras foi calculado e normalizado. Estes cálculos foram feitos dividindo o número total de leituras de uma determinada biblioteca pelo número total de leituras de todas as bibliotecas, assim, obtendo-se a razão para cada biblioteca. Posteriormente, dividiu-se o número de leituras de cada agEST pela razão encontrada para cada biblioteca. Estes resultados foram lançados em uma matriz que relaciona os agESTs e as bibliotecas. Os agESTs e as bibliotecas foram agrupados hierarquicamente utilizando os programas *Cluster* e *Tree View* (Eisen *et al.*, 1998).

O agrupamento dos genes MADS-box, do banco de dados do FORESTs, com as bibliotecas de expressão foi baseado na matriz de correlação *Spearman Rank*, com os agrupamentos formados inicialmente sendo substituídos pelo padrão médio. Os dados da matriz foram reordenados de acordo com a similaridade do padrão de expressão dos genes e apresentados em arranjos em preto e branco, utilizando como escala o degrade cinza que corresponde ao número de leituras de uma biblioteca específica para cada agESTs.

Tabela 2 Sequências consenso de aminoácidos utilizadas para a identificação dos genes MADS-box no banco de dados do FORESTs. As letras maiúsculas são os aminoácidos conservados. Nas sequências consenso de *Eucalyptus* e *Arabidopsis*, a letra "n" minúscula representa os aminoácidos variáveis.

Sequência consenso COBBLER	MGRKKIEIKRIENKTNRQVTFSKRRNGLFKKAHEL SVLCDAEVALIVFSPSGrlyeyannni
Sequência consenso MEF-2 de animais	MGRGKIEIKRIENSTNRQVTFSKRRNGLLKKAHEL SVLCDAEVALIFSSSGKLYEFSSPSM
Sequência consenso SRF de animais	MGRKKIKIKRIENKIKKRAVTFSKRRQGLFKKASELSTL CGAEVAVIVYSPSGKLYVFWFS
Sequência consenso de <i>Eucalyptus</i>	MhRGKnnnnRIENnnnRQVTFSKRRnGGLnKKAHEL SVLCDAE VnnlnF SnnGKLYEnn
Sequência consenso de <i>Arabidopsis</i>	MhRhKnnnnlnNnnnRQVTFSKRRnGGLnKKAHEL S nL CDAE VnnlnF SnnGnLnEnn

RESULTADOS

Após a eliminação das seqüências artificiais ou incompletas, obtiveram-se 25 agESTs de eucaliptos. Todos estes agrupamentos apresentaram alta similaridade com a seqüência consenso do domínio MADS-box. A alta similaridade nos permite dizer que esses agESTs codificam para proteínas MADS-box.

Dentre os 25 agESTs, apenas um pertence à família gênica MADS-box do tipo I. Os outros 24 pertencem à família gênica MADS-box do tipo II. 23 deles foram agrupados em 8 sub-famílias diferentes, entre elas: *AGL2* (4 agESTs), *SQUA* (2 agESTs), *TM3* (5 agESTs), *AG* (1 agEST), *AGL17* (2 agESTs), *STMADS11* (3 agESTs), *GGM13* (1 agEST) e *DEF+GLO* (4 agESTs). Um único agEST (*EGUTST6222D07.g*) não foi agrupado em nenhuma das 11 sub-famílias existentes (Figura 12). Entre os agESTs pertencentes às proteínas MADS-box do tipo II, as sub-famílias mais representativas, ou seja, que apresentaram um maior número de membros identificados foram a *TM3-like*, *AGL2-like* e *DEF+GLO* (Figura 12).

A análise da expressão gênica *in silico* baseada na freqüência das leituras nas bibliotecas de cDNA permite comparar o perfil da expressão de genes que são específicos nos tecidos da planta. Desta forma, os dois grupos mais representativos foram separados e denominados de grupo I e II (Figura 13). O grupo I corresponde ao agESTs cujo padrão de expressão é referente à

biblioteca dos tecidos reprodutivos (FB1); enquanto no grupo II o padrão de expressão dos agESTs é referente à biblioteca do tecido vegetativo, especificamente da madeira (WD2).

As siglas representando cada uma das bibliotecas onde houve expressão dos agESTs podem ser encontradas na tabela 1.

Família Gênica MADS-box Tipo I em eucaliptos

O único agEST (EGEZST2245G11.g) identificado em eucaliptos foi expresso especificamente na biblioteca ST2 (Figura 13).

EGEZST2245G11.g pertence à classe M, subclasse M3, por apresentar apenas o motivo conservado “FSFGHPSVDAV”. A análise filogenética demonstrou uma alta similaridade entre EGEZST2245G11.g e AGL29 de *A. thaliana*, respectivamente de 62,2% (Figura 14).

Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente na biblioteca FB1

Através da análise do padrão de expressão foi possível identificar que 12 dos 24 agESTs são expressos nas bibliotecas de botões florais, nas flores e frutos (FB1) (Figure 13). Destes, apenas dois agESTs também apresentaram expressão em outras bibliotecas: EGMCFB1109A09.g (RT3) e EGCCSL1018C10.g (CL1 e SL1).

Através das análises filogenéticas foi possível a identificação de genes homólogos em eucaliptos para quase todos os genes pertencentes ao modelo “ABCE” de identidade dos órgãos florais de *A. thaliana* (Figura 12).

Na sub-família *AGL2* (classe E), quatro agESTs de eucaliptos formaram um grupo com os três genes *SEP* provenientes de *A. thaliana* (Figura 12). Os quatro agESTs são especificamente expressos na biblioteca FB1 (Figura 13). EGCBFB1277A03.g e EGEZFB1006G06.g são prováveis ortólogos de *SEP3*, enquanto EGEQFB1200B04.g possui alta similaridade com *SEP1* e *SEP2* (Figura 12).

EGMCFB1109A09.g e EGJMFB1092E09.g, de eucaliptos, pertencem à sub-família *SQUA* (classe A) (Figura 12). EGMCFB1109A09.g foi expresso tanto na biblioteca FB1 como na RT3 (Figura 13). EGJMFB1092E09.g, de *E. grandis*, foi expresso unicamente na biblioteca FB1 (Figura 13) e apresentou alta similaridade com a proteína previamente identificada e caracterizada *EAP2* de *E. globulus* (Figura 12).

Foi identificado apenas um agEST de eucalipto (EGABFB1059E05.g) pertencente à sub-família *AG* (Figura 12). Pela análise filogenética, este gene codifica possivelmente para um ortólogo de *SHP1* de *A. thaliana*. O padrão de expressão deste agEST foi específico da biblioteca FB1 (Figura 13).

EGBMFB1132D01.g, de eucalipto, é um novo membro descrito presente em angiospermas sendo pertencente à sub-família *GGM13* (Figura 12). Provavelmente é o ortólogo de *TT16* de *A. thaliana*. O padrão de expressão é exclusivo da biblioteca FB1 (Figura 13).

No banco de dados do FORESTs foram identificados quatro agESTs pertencentes à sub-família *DEF+ Glo-like* (classe B). Dois deles fazem parte da sub-família *DEF (AP3)* e os outros dois da sub-família *GLO (PI)* (Figura 12). EGUTFB1102F11.g e EGJFFB1118D11.g provavelmente são ortólogos do *PI* de *A.*

thaliana. As análises filogenéticas demonstram que possivelmente em eucaliptos houve uma duplicação recente entre estes dois genes e estes podem ser considerados parálogos (Figura 12). Ambos encontram-se expressos exclusivamente na biblioteca FB1 (Figura 13). Os dois agESTs, EGJEW2299A04.g e EGEZFB1005C02.g, pertencentes à sub-família *DEF* podem ser considerados ortólogos de AP3 de *A. thaliana*. Porém, os dois agESTs quando comparados entre si são considerados parálogos. Estes dois agESTs, possivelmente, foram oriundos de um evento de duplicação gênica (Figura 12). EGEZFB1005C02.g é expresso especificamente na biblioteca FB1 (Figura 13). Entretanto, o seu parálogo (EGJEW2299A04.g) apresentou padrão de expressão diferenciado, sendo exclusivamente encontrado na biblioteca WD2 (madeira de *E. grandis*) (Figura 13).

Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente nos tecidos vegetativos

Dentre os 24 agESTs pertencentes às proteínas MADS-box do tipo II em eucaliptos, 12 agESTs foram identificados como expressos nos órgãos vegetativos e distribuídos basicamente em três sub-famílias (Figura 12).

Cinco agESTs pertencem à sub-família *TM3* (Figura 12). A filogenia desta sub-família foi analisada separadamente. Nas análises foram incluídos genes de diferentes espécies que possuem padrões de expressão conhecidos (Figura 15). EGBGWD2290D12.g foi expresso exclusivamente na biblioteca WD2 e EGEQRT6267G10.g apresentou expressão tanto na biblioteca WD2 como na biblioteca RT6 (Figura 13). Na análise filogenética EGBGWD2290D12.g apresentou

similaridade com AGL42, AGL71 e AGL72 de *A. thaliana* (Figura 15), e EGEQRT6267G10.g ficou agrupado com as proteínas AGL14, AGL19 de *A. thaliana* e ETL de *E. globulus*, previamente identificadas e caracterizadas. Este agEST apresentou alta similaridade com a proteína ETL (Figura 15).

Os outros três membros da sub-família *TM3* encontrados em eucaliptos foram: EGMCLV2264A02.g, EGAGLV2211H06.g e EGJMLV2226B02.g. O agEST EGMCLV2264A02.g apresentou um amplo padrão de expressão quando comparado com todos os outros agESTs (Figura 13), sendo expresso nas bibliotecas: RT3, ST2, ST7 e LV2 (Tabela 1). A árvore filogenética demonstrou que EGMCLV2264A02.g possui alta similaridade com a proteína PTM5 de *Populus tremuloides* (álamo) e que provavelmente pode ser considerado ortólogo a ele.

A análise filogenética dos outros dois agESTs, EGAGLV2211H06.g e EGJMLV2226B02.g, indica que houve um recente evento de duplicação que originou estes dois genes (Figura 12 e 15). O padrão de expressão de ambas ESTs foi restrito à biblioteca LV2 (Figura 13).

Através da análise filogenética foi possível identificar dois agESTs pertencentes à sub-família *AGL17*. Na árvore filogenética EGSBRT3311C06.g ficou agrupado com as proteínas AGL16, AGL21 e AGL17 de *A. thaliana* (Figura 12), sendo expresso nas bibliotecas RT3 e ST7 (Figura 13). EGCCCL1325E06.g foi expresso exclusivamente na biblioteca CL1 (Figura 13).

No banco de dados do FORESTs foram identificados três agESTs pertencentes à sub-família *STMADS11* (Figura 12). Para melhor caracterizar os membros deste grupo foi gerada uma árvore filogenética contendo representantes de diversas espécies (Figura 16). EGCCSL1018C10.g foi expresso nas bibliotecas

FB1, CL1 e SL1 (Figura 13). A análise filogenética demonstrou que este agEST forma um grupo com SVP (*A. thaliana*), JOINTLESS (*Lycopersicon ssp*), PKMADS1 (*Paulownia kawakamii*) e IBMADS3 (*Ipomoea batatas*) (Figure 15). Os outros dois agESTs, EGEZWD2255G02.g e EGJMWD2252E02.g foram expressos exclusivamente na biblioteca de madeira (WD2) (Figura 13). EGEZWD2255G02.g não teve seu posicionamento definido na árvore filogenética. Porém, apresenta similaridade com dois sub-grupos: (1) formado por AGL24 (*A. thaliana*), IBMADS4 (*I. batatas*), FBP13 (*Petunia hybrida*) e STMADS16 (*Solanum tuberosum*), e (2) pelos membros SVP, JOINTLESS, PKMADS1 e IBMADS3 (Figura 16).

Com relação ao EGJMWD2252E02.g não foi possível correlacioná-lo a qualquer outro gene com padrão de expressão conhecido ou função descrita até agora, porém a análise filogenética demonstrou que ele pertence à sub-família *STMADS11* (Figura 16).

Figura 12 Análise filogenética entre os membros da família gênica MADS-box do tipo MIKC presentes no banco de dados do FORESTs e nos bancos públicos de Arabidopsis. Também foram utilizadas algumas seqüências de aminoácidos de outras espécies como *E.globulus*, *P. Kawakamii*. Os agrupamentos foram feitos utilizando a seqüência consenso de aminoácidos de Arabidopsis e dos agESTs de eucalipto. Os agESTs codificando prováveis proteínas MADS-box foram selecionados como descrito no tópico materiais e métodos. Proteínas de *Arabidopsis*: (O22456) SEP3, (NP_186880) SEP2, (NP_568322) SEP1, (NP_973411) AGL3, (NP_182089) AGL6, (NP_191671) AGL13, (NP_189645) AGL79, (Q8RYD9) TT16, (NP_177074) AP1, (Q38876) FUL, (NP_849351) AGL11, (NP_565022) AGL12, (P17839) AGAMOUS, (NP_191437) SHP1, (NP_191002) AP3, (NP_197524) PI, (NP_196883) AGL15, (NP_974450) AGL18, (AAN52783.1) AGL68, (AAN52775.1) AGL31, (Q9S7Q7) FLC, (NP_974161.1) AGL27, (CAB79364.1) AGL24, (AAG24508.1) SVP, (CAB09793.1) ANR1, (NP_191282.2) AGL16, (AAL73213.1) AGL21, (NP_179848.1) AGL17, (NP_192925) AGL14, (NP_194026) AGL19, (AAN52777.1) AGL42, (AAN52784.1) AGL71, (AAN52785.1) AGL72, (O64645) SOC1. Proteínas de *Eucalyptus* ssp: (AAG30923) EAP2L, (AAG27459) EAP2S, (AAG24909) EAP1, (AAD16052.1) ETL. Proteína de *Populus tremuloides*: (AF377868.1) PTM5.

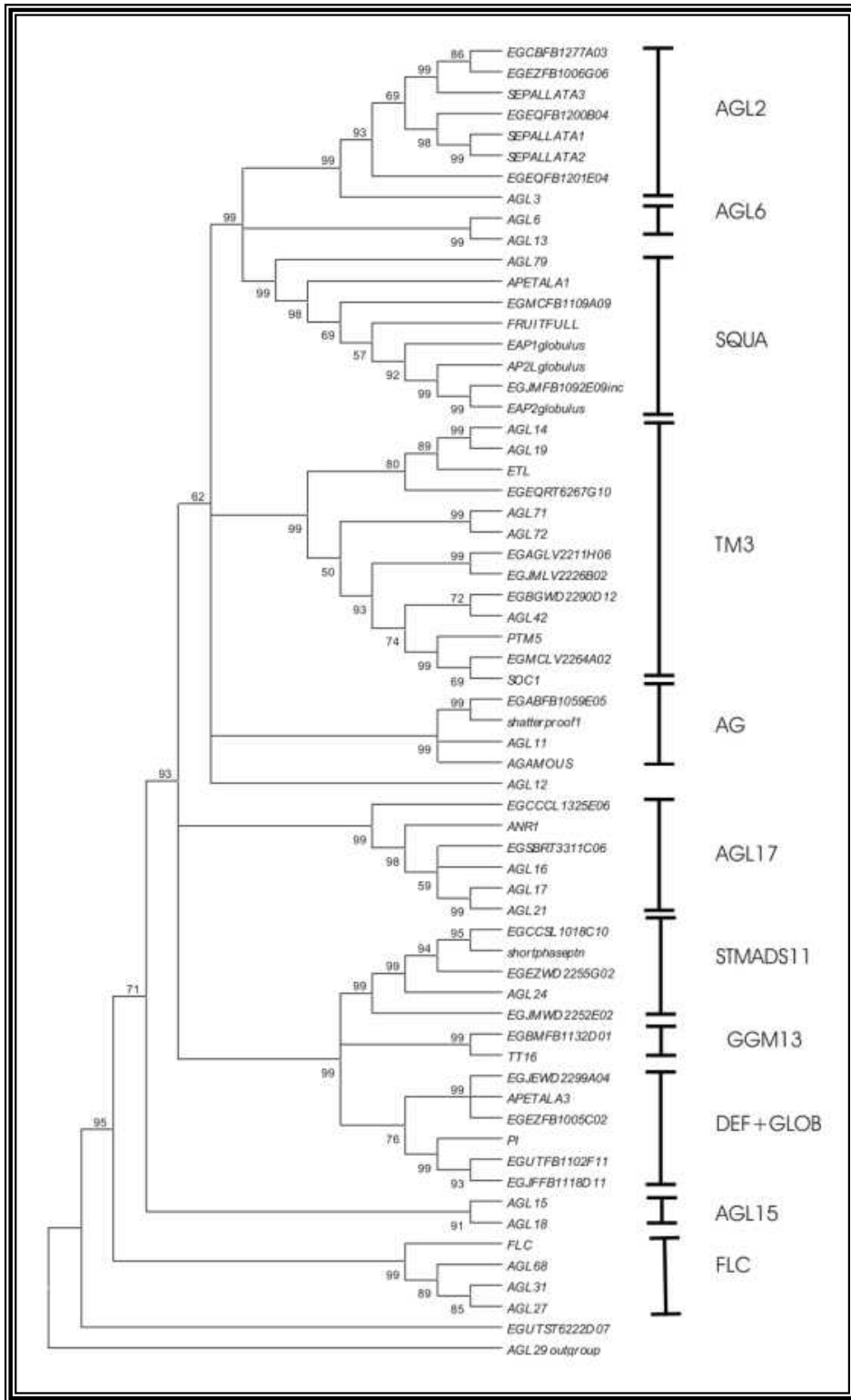


Figura 14 Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína AGL29 de *A. thaliana* e EGEZST2245G11.g de *Eucalyptus*. (*) aminoácidos idênticos; (.) substituição semi-conservada dos aminoácidos; (.) substituição conservada dos aminoácidos.

domínio MADS-box

```

AGL29
EGEZST2245G11.g
-MGRRKIKMEMVQDMNTRQVTFSKRRRTGLFKKASELATLCNAELGIVVFSGGKPFYSYK 59
MKGKTTGAKRMIEGVNAQRVAFSKRRPGLFKKASELCTLCATEMAIILFSPSGKPFSGH 60
*:. . . *:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:.*:.:

AGL29
EGEZST2245G11.g
PNLDSVAERFMREYDDSDSGDEEKSGNYPKLRKLSERLDLLNQVEAEKERGEKSOEKL 119
PSVDAVLDRFHFHPQIVFVTTQTQINGDQ-TLVELNRQYADVLERLEAEKKRAKELQHIK 119
*.:*:* : *:* : : : : : : . * . * . . : : : : * * * * : * . : : * .

AGL29
EGEZST2245G11.g
ESAGDERFKESIEITLDELNEYKDRLQTVHGRIEGQVNHQLQASSCLMLLSRK 172
P-----LEIENLSFEQLMVLKKGAAADLKEXXDRKG----- 149
.**. * : : : : * . : : : :

```

Figura 15 Filogenia dos genes MADS-box pertencentes à sub-família TM3-like. Todos os genes *TM3-like* conhecidos foram utilizados na reconstrução filogenética. A árvore filogenética foi gerada da mesma forma que a árvore da figura 12, porém utilizou-se as seqüências completas de aminoácidos das proteínas MIKC. Proteínas de *Arabidopsis*: (AAN52777.1) AGL42, (AAN52784.1) AGL71, (AAN52785.1) AGL72, (O64645) SOC1, (NP_192925) AGL14, (NP_194026) AGL19. Proteínas de *Eucalyptus*: (AAD16052.1) ETL. Proteína de *Populus tremuloides*: (AF377868.1) PTM5. Proteínas de *Picea abies*: (S51936) DAL3. Proteína de *G. gnemon*: (CAB44447) GGM1. Proteína de *P. radiata*: (AAB80807) PrMADS4. Proteína de *S. alba*: (AAB41526.1) SaMADSA. Proteína de *Magnolia*: (BAB70741.1) MpMADS6, (BAB70744.1) MpMADS9. Proteína de *Nicotiana*: (CAA53782.1) TOBMADS1. Proteína de *Petunia*: (AAQ72502) FBP28, (AAK21251) FBP20, (AAK21252) FBP21.

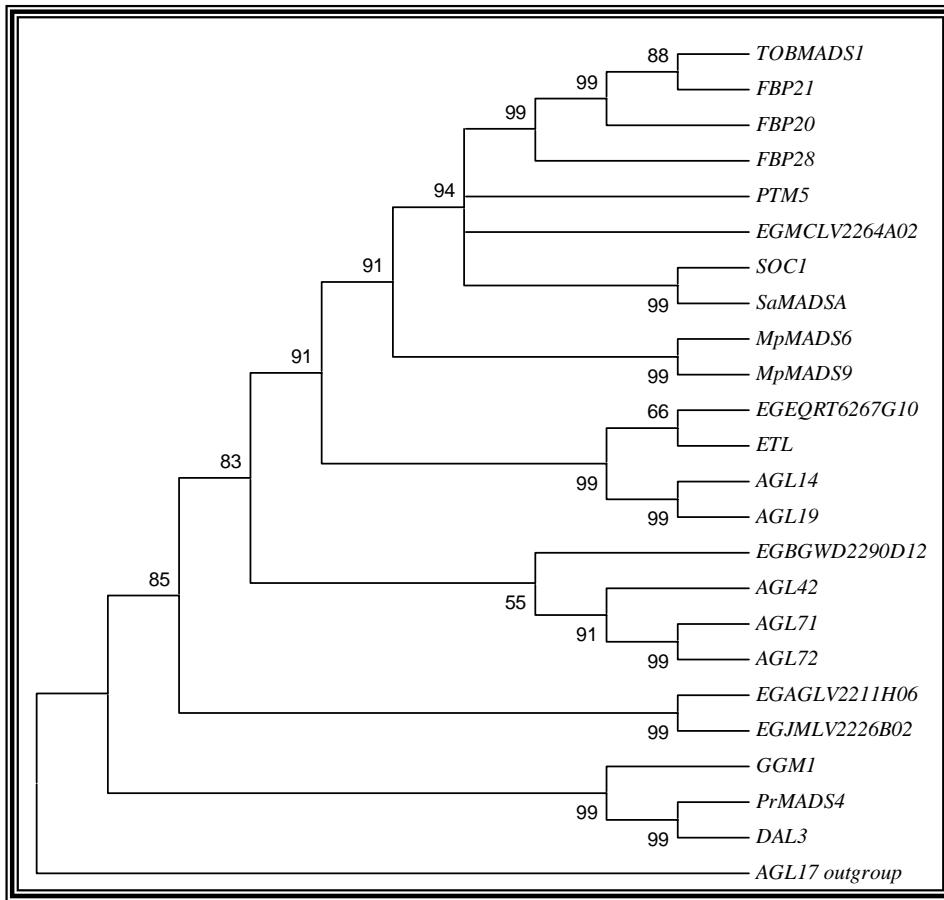
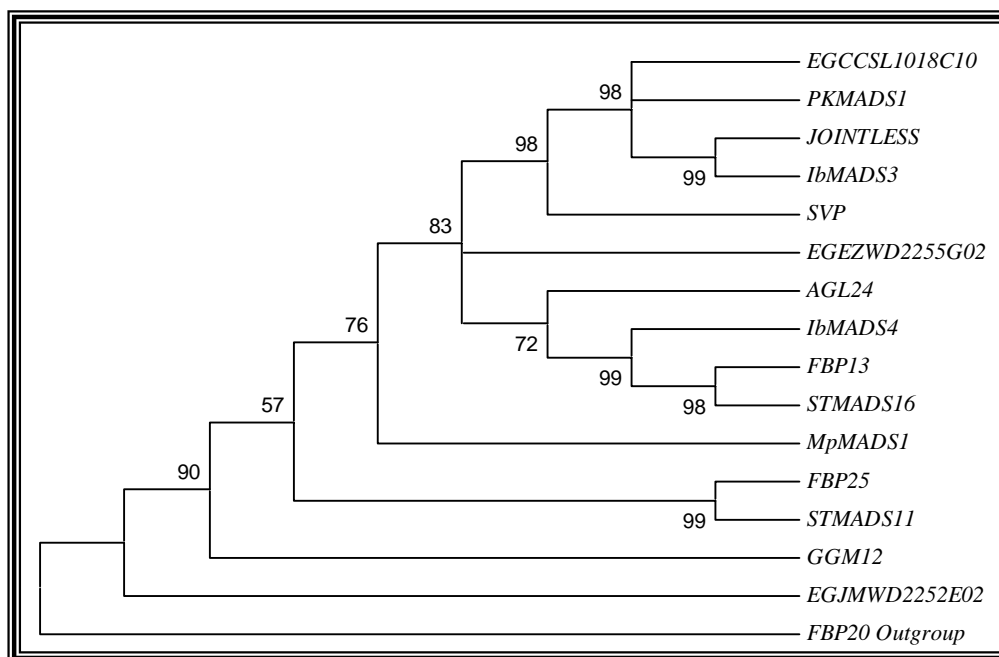


Figura 16 Filogenia dos genes MADS-box pertencentes à sub-família STMADS11-like. Todos os genes *STAMADS11-like* conhecidos foram utilizados na reconstrução filogenética. A árvore filogenética foi gerada da mesma forma que a árvore da figura 12, porém utilizou-se as seqüências completas de aminoácidos das proteínas MIKC. Proteína de *Paulinia kawakamii*: (AAF22455.1) PkMADS1. Proteína de *Arabidopsis*: (CAB79364.1) AGL24, (AAG24508.1) SVP. Proteína de *I. batatas*: (BAC15562.1) IbMADS4, (BAC15561.1) IbMADS3. Proteína de *Solanum*: (AAB94006.1) STMADS11, (AAB94005.1) STMADS16. Proteínas de *Magnolia*: (BAB70736.1) MpMADS1. Proteína de *Lycopersicon*: (Q9FUY6) JOINTLESS. Proteína de *Petunia*: (AAK21250) FBP13, (AAK21256) FBP25. Proteína de *G. gnemon*: (CAB44458) GGM12.



Família Gênica MADS-box Tipo I em eucalipto

Os genes MADS-box pertencentes ao tipo I constituem uma classe amplamente inexplorada e suas funções permanecem completamente desconhecidas. No genoma de *A. thaliana* foram anotados 47 genes MADS-box do tipo I (De Bodt *et al.*, 2003; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b). Estes genes foram agrupados em duas classes M e N, baseado na presença de motivos conservados (De Bodt *et al.*, 2003). O número de ESTs correspondente a estes genes, em diversas espécies de plantas, é extremamente baixo. *A. thaliana* é a planta que possui o maior número de ESTs (11) para os genes MADS-box do tipo I (De Bodt *et al.*, 2003). Além da *A. thaliana*, até o momento foram identificados 10 ESTs do tipo I distribuídos em 6 espécies de angiospermas. Dentre elas, as espécies que apresentam mais ESTs identificados foram *Glycine max* e *Triticum aestivum*, três cada uma (De Bodt *et al.*, 2003). O baixo número de ESTs para os genes do tipo I pode ser provavelmente atribuído ao fato dos genes do tipo I possuírem níveis de expressão muito baixos (De Bodt *et al.*, 2003-revisão). Uma outra explicação seria que estes genes podem ser expressos sob condições ambientais específicas, que ainda não foram monitoradas nos projetos de seqüenciamento de ESTs (De Bodt *et al.*, 2003 - revisão).

A identificação do baixo número de ESTs no banco de dados do FORESTs (apenas 1 agEST) coincide com o que é esperado pela literatura, além de ser expresso sob determinada condição específica.

Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente na biblioteca FB1

Dentre os 24 agESTs pertencentes ao tipo II, um total de 12 agESTs foram recuperados da biblioteca de cDNA apresentando expressão na biblioteca FB1. 10 agESTs são expressos especificamente nesta biblioteca. Este fato demonstra a importância dos genes MADS-box no desenvolvimento de flores e frutos em eucaliptos.

Os genes *SEP* pertencem à sub-família *AGL2-like* (classe E) estão envolvidos diretamente na organogênese floral (Pelaz *et al.*, 2000). Em *A. thaliana* há quatro proteínas pertencentes à *AGL2*. As proteínas *SEP1/2/3* possuem funções redundantes e seus padrões de expressão são restritos aos órgãos florais. De maneira análoga, encontramos 3 agESTs em eucaliptos (EGCBFB1277A03.g, EGEZFB1006G06.g, EGEQFB1200B04.g) que podem desempenhar as mesmas funções das proteínas *SEP1/2/3*. O padrão de expressão entre os agESTs e os genes *SEP* são semelhantes corroborando com esta hipótese.

Os membros sub-família *SQUA* (classe A) em *A. thaliana* são *AP1*, *FUL* e *AGL79*. Estes genes estão envolvidos com a iniciação floral e desenvolvimento de frutos. *AP1* também está envolvido com a determinação da identidade dos órgãos florais. Em *E. globulus* a proteína *EAP2* (Kypzuka *et al.*; 1997) foi identificada como equivalente funcional à proteína *AP1* de *A. thaliana*. Naturalmente, os resultados da análise filogenética e de expressão sugerem que o EGJMFB1092E09.g pode ser o ortólogo funcional em *E. grandis*.

Os membros da sub-família AG (classe C e D) estão envolvidos na especificação dos órgãos reprodutivos florais. Entretanto, são necessários para o desenvolvimento adequado dos frutos e na identidade dos óvulos (Pinyopich *et al.*, 2003). Em *A. thaliana* é relatada a presença de dois genes altamente redundantes SHP1/SHP2 (Liljegren *et al.*, 2000). A análise de expressão dos genes SHP demonstrou que eles são expressos nas zonas de deiscência dos frutos em desenvolvimento e também nos óvulos em *A. thaliana* (Savidge *et al.*, 1995; Flamagan *et al.*, 1996). Recentemente foi descrito que os genes SHP também contribuem para a formação do carpelo (Pinyopich *et al.*, 2003). Em eucaliptos apenas um agEST foi identificado possivelmente sendo ortólogo de SHP1.

No genoma de *A. thaliana* há apenas um único gene pertencente à sub-família GGM13, denominado de ABS, TT16, ou AGL32 (Becker *et al.*, 2002). GGM13-like é representado como grupo irmão da sub-família B (genes DEF- e GLO-like, e seus ortólogos em gimnospermas), portanto denominado de genes Bsister (Bs) (Becker *et al.*, 2002). Ao contrário dos genes de função B que são principalmente expressos nos órgãos reprodutivos masculinos, os genes Bs são principalmente expressos nos órgãos reprodutivos femininos, tanto nas gimnospermas como nas angiospermas (Becker *et al.*, 2002). Em *A. thaliana*, este gene está envolvido na especificação das células endoteliais, e também no controle da biosíntese de flavonóides do tegumento das sementes (Nesi *et al.*, 2002). O EGBMFB1132D01.g encontrado no banco de dados do FORESTs, expresso exclusivamente na biblioteca FB1, é um novo representante desta sub-família encontrado em angiospermas. Este agESTs é possivelmente ortólogo ao TT16,

porém seriam necessários experimentos adicionais como hibridização *in situ* para comprovar essa hipótese.

As reconstruções filogenéticas e a avaliação estrutural de exon-intron indicam que a duplicação que originou as sub-famílias dos genes DEF (AP3) e GLO (PI) ocorreu na linhagem ancestral que originou as angiospermas atuais, após serem separadas das gimnospermas. Entre as eudicotiledôneas (angiospermas) ocorreu uma nova duplicação nos genes DEF (AP3) dando origem a duas sub-linhagens: euAP3 e TM6 (paleoAP3). Posteriormente, eventos de duplicação nos genes DEF-/GLO-like ocorreram algumas vezes de forma independente em diferentes linhagens (Kramer et al., 1998; Kramer and Irish; 2000). Este fato também foi observado em eucaliptos (Figura 12). Em eucaliptos foi identificado um ortólogo à AP3 expresso exclusivamente em madeira. A associação dos genes pertencentes a DEF e GLO envolvidos com desenvolvimento do tecido vascular foi relatada em plantas herbáceas como a *Eranthis hyemalis* e *Solanum tuberosum* (Skipper, 2002; Garcia-Maroto et al., 1993). Entretanto, não há nenhum registro que relacione a expressão dos membros da sub-família AP3 com a formação da madeira. Presume-se que em eucaliptos, após ter ocorrido o evento de duplicação gênica, ocorreu a divergência funcional entre os parálogos. Desta forma, um deles manteve sua expressão restrita aos órgãos florais como esperado. Em contrapartida, o outro gene sofreu alterações na sua seqüência promotora que o levou a divergir quanto ao padrão de expressão e atualmente pode estar envolvido com a formação da madeira.

Genes MADS-box de eucaliptos expressos preferencialmente nos tecidos vegetativos

Os genes MADS-box também encontram-se relacionados com o desenvolvimento vegetativo. Já foram descritos vários genes MADS-box que possuem papéis regulatórios no desenvolvimento vegetativo, tal como desenvolvimento da folha, raiz e embrião. (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Huang et al., 1995; Ma et al., 1991; Rounsley et al., 1995; Theißen et al., 2000).

Os membros pertencentes à sub-família TM3 nas angiospermas, tal como nas gimnospermas, são preferencialmente expressos nos órgãos vegetativos da planta (Tandre *et al.*, 1995; Walden et al., 1998; Winter et al., 1999). O genoma de *A. thaliana* possui seis diferentes genes TM3-like, alguns dos quais ainda não foram completamente anotados (Becker and Theißen, 2003). Destes, apenas quatro, SOC1 (também conhecido como AGL20), AGL14, AGL19, e AGL42 foram anotados (Becker and Theißein, 2003). AGL14 e AGL19 são expressos exclusivamente nas raízes (Rounsley et al., 1995; Alvarez-Buylla et al., 2000a). AGL19 é expresso na columela, na coifa da raiz lateral, nas células epidérmicas da região meristemática e no cilindro central de raízes adultas (Alvarez-Buylla et al., 2000a).

Em *A. thaliana*, apenas um único mutante entre os genes da sub-família TM3 foi descrito, o SOC1, que supostamente é um dos alvos do gene CONSTANS (CO), responsável pela indução da floração (Yu et al., 2002). SOC1 (Onouchi et al., 2000; Samach et al., 2000) e seu ortólogo, o gene SaMADSA de *Sinapis alba* (Menzel et al., 1996) são abundantemente expressos no meristema apical. Entretanto, todos os outros membros desta sub-família que já foram descritos a expressão está

associada ao tecido vegetativo (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Winter et al., 1999 Tandre et al., 1995; Walden et al., 1998).

Recentemente, Cseke e colaboradores caracterizaram o gene PTM5 de *P. tremuloides* (álamo) expresso no câmbio vascular em diferenciação e nos tecidos xilemáticos em expansão durante a formação da madeira (Cseke et al., 2003). Este fato motivou uma melhor caracterização dos genes TM3-like de eucaliptos. Entretanto, pouco se conhece sobre a possível função destes genes no controle a nível molecular da formação da madeira.

As análises de expressão temporal do PTM5 demonstraram que a expressão no câmbio vascular e nas espigas florais em expansão é sazonal, sendo limitada à formação da madeira e aos feixes vasculares das espigas florais na primavera (Cseke et al., 2003). A análise da expressão espacial revelou que a expressão do PTM5 é localizada em poucas camadas de células em diferenciação do câmbio vascular, tecidos do xilema e nos feixes vasculares das espigas em expansão e em raízes jovens (Cseke et al., 2003). O provável ortólogo do PTM5 em eucaliptos (EGMCLV2264A02.g) também é expresso em raízes (RT3). Entretanto, este agEST apresenta um padrão de expressão mais amplo sendo expresso nas bibliotecas FB1, ST6, ST7 e LV2 (Tabela 1). Este agEST pode estar associado com a formação dos tecidos vasculares como proposto para PTM5. Não foi relatado nenhum padrão de expressão para os genes pertencente a esta sub-família que esteja relacionado com estresses abióticos e bióticos. Porém, ao que parece este agEST também pode estar envolvido em estresses.

A análise filogenética demonstrou a relação entre EGEQRT6267G10.g encontrado no banco de dados do FORESTs com os genes AGL19 e AGL14 de *A.*

thaliana e ETL de *E. globulus*. Os genes AGL14 e AGL19 de *A. thaliana* são expressos exclusivamente em raízes (Alvarez-Buylla *et al.*; 2000a). O gene ETL de *E. globulus* é expresso tanto nos órgãos vegetativos, predominantemente em raízes, como nos órgãos reprodutivos, nos primórdio dos órgãos florais (Decroocq *et al.*, 1999). Os transcritos do ETL encontrados no tecido vascular de raízes sugere que este gene esta relacionado com o desenvolvimento vascular de raízes. Este fato sugere que há diferenças com relação à função desempenhada pelo EGEQRT6267G10.g quando comparado com o ETL. A comparação entre os genes de *A. thaliana* (AGL14 e AGL19) e seu provável ortólogo em eucaliptos (EGEQRT6267G10.g) sugere que no eucalipto há um domínio mais amplo de expressão espacial, podendo incluir os tecidos formadores da madeira nas espécies arbóreas. Experimentos de hibridização *in situ*, utilizando como sonda EGEQRT6267G10.g, seriam importantes para confirmar esta hipótese.

A análise filogenética do EGBGWD2290D12.g demonstrou que este agEST está relacionado com AGL42, AGL71 e AGL72 de *A. thaliana*. Porém, o padrão de expressão destes genes em *A. thaliana* ainda não foi descrito. Em eucaliptos, o EGBGWD2290D12.g é expresso exclusivamente no tecido da madeira indicando que este gene poderia estar envolvido com a formação deste tecido.

Os EGAGLV2211H06.g e EGJMLV2226B02.g apresentam uma alta similaridade entre si. Tal fato, aliado a análise filogenética indica que eles passaram por um evento de duplicação recente. Ambos apresentaram expressão restrita à biblioteca LV2 sugerindo que estes genes estejam envolvidos nas respostas a deficiência de boro e fósforo ou no estresse biótico. Um único gene MADS-box, ANR1 de *A. thaliana*, foi relacionado com a resposta a deficiência de nutrientes, no

caso nitrato. Porém, este gene é pertencente à sub-família AGL17 (Zhang and Forde, 1998).

ANR1, assim como outros três genes (*AGL16*, *AGL17* e *AGL21*) de *A. thaliana* fazem parte da sub-família *AGL17*. ANR1 é o único gene desta sub-família para o qual um fenótipo mutante é conhecido. ANR1 é um componente chave da via de transdução de sinais pelo qual o nitrato estimula a proliferação das raízes laterais (Zhang and Forde, 1998). Transcritos do *AGL17*, *AGL21* e *ANR1* foram detectados exclusivamente em raízes (Zhang and Forde, 1998; Burgeff et al., 2002; Rounsley et al., 1995). *AGL17* e *AGL21* possuem padrões de expressão diferenciados nos tecidos das raízes (Burgeff et al., 2002). Por outro lado, o mRNA do *AGL16* acumula em altos níveis nas folhas e em níveis moderados nas raízes e caules (Alvarez-Buylla et al., 2000a). O EGSBRT3311C06.g de eucalipto, expresso nas bibliotecas RT3 e ST7, apresentou alta similaridade com *AGL16*, *AGL17* e *AGL21* de *A. thaliana*. O padrão de expressão deste agEST é, de certa forma, similar aos outros membros pertencentes a esta sub-família. Seria necessário um maior detalhamento do padrão de expressão espacial para que a função correta deste gene fosse inferida.

O EGCCSL1018C10.g, forma um sub-grupo maior com SVP (*A. thaliana*), JOINTLESS (*L. esculentum*), PkMADS1 (*P. kawakamii*) e IBMADS3 (*I. batatas*) pertencentes à sub-família STMADS11 (Figura 16). PkMADS1 foi relatado como sendo expresso no ápice vegetativo e nos primórdios das folhas de *P. kawakamii*, uma espécie arbórea (Prakash and Kumar, 2002). Este gene apresenta padrão de expressão semelhante ao SVP, na região do meristema apical. Porém, também foi detectado a expressão de PkMADS1 nos feixes pro-vasculares (Prakash and Kumar,

2002). As alterações observadas nas plantas transgênicas de *P. kawakamii* sugere que este gene está envolvido na regulação da morfogênese vegetativa apical (Prakash and Kumar, 2002). O gene IBMADS3 (I. batatas) é expresso nas raízes e em raízes tuberosas em desenvolvimento, com predomínio na região do câmbio vascular de batata (Kim et al., 2002). Este fato sugere que este gene esteja envolvido no alto potencial proliferativo dos tecidos vegetativos durante a organogênese do tubérculo (Kim et al., 2002).

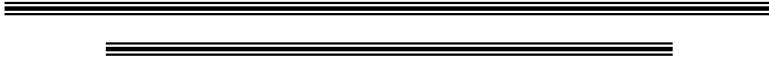
Por outro lado, há genes que estão relacionados com o desenvolvimento reprodutivo como: JOINTLESS, envolvido com a formação da zona de abscisão de flores e frutos no tomate (Mao et al., 2000) e o SVP (*A. thaliana*). SVP é abundantemente expresso no meristema apical e nos primórdio de folhas e codifica para um provável repressor da floração (Hartmann et al., 2000). Este repressor é responsável por prolongar o estágio vegetativo nas plantas, independente do controle fotoperiódico e da vernalização (Becker and Theißen, 2003 - revisão).

A análise filogenética assim como o padrão de expressão de EGCCSL1018C10.g sugere que este agEST esteja envolvido na regulação da morfogênese vegetativa. Porém, o EGCCSL1018C10.g também apresentou expressão na biblioteca FB1, o que poderia sugerir similaridade de função com JOINTLESS e SVP.

EGEZWD2255G02.g membro da sub-família STMADS11 apresenta similaridade com os dois subgrupos formados pelo SVP e AGL24, mas este agEST não teve seu posicionamento definido dentro da árvore filogenética (Figura 16). o gene AGL24 codifica um indutor da floração, atuando nas vias gênicas como um regulador central da identidade do meristema floral (Yu et al; 2004). Ao contrário, o

gene IBMADS4, de *I. batatas*, é predominantemente expresso na região do câmbio vascular das raízes (Kim et al., 2002). O gene STMADS16 de (*S. tuberosum*) é expresso no caule e nas folhas (Garcia-Maroto et al., 2000). Portanto, o padrão de expressão dos membros desta sub-família é bastante variado. Porém, considerando que a expressão do EGEZWD2255G02.g, de eucalipto, é restrita aos tecidos que formam a madeira, é possível que este gene esteja envolvido no desenvolvimento vegetativo, mais precisamente na formação e desenvolvimento da madeira.

CAPÍTULO 2



MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material Vegetal

- Desinfestação e cultura

As sementes de *A. thaliana* passaram por um processo de descontaminação, sob condições estéreis em câmara de fluxo laminar, através do seguinte procedimento: lavagem em etanol 70% por três min, lavagem em hipoclorito de sódio contendo tween 20 (0,05%) por 17 min, seguido de três lavagens em água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram distribuídas em placas de petri contendo meio nutritivo básico de Murashige & Skoog (MS) (1962) (tópico 10), acrescido de 0,03% de sacarose e 7% agar. O pH foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem (15 min a 120 °C e 1 libra de pressão).

- Seleção das plantas

Para a seleção das sementes transgênicas foi acrescido ao meio MS 25 µg/ml do antibiótico canamicina. No caso do cultivo das sementes não transformadas (tipo selvagem) foi realizado o mesmo procedimento, porém sem acréscimo de antibiótico ao meio MS.

Depois de semeadas em placas de petri as sementes foram mantidas por dois dias em câmara fria a 4 °C, para vernalização. Posteriormente, foram transferidas para a câmara de crescimento a 22 ± 2 °C, sob fotoperíodo diário de 16 h de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

As plantas foram selecionadas e transferidas para o solo e então crescidas em potes contendo uma mistura de terra e vermiculita, na proporção de 2:1, respectivamente. Essas plantas foram cultivadas em fitotron a 22 ± 2 °C, nas mesmas condições fotoperiódicas descritas acima. As sementes, posteriormente, foram individualmente coletadas e mantidas em sílica até a análise das próximas gerações.

O cultivo das plantas transgênicas seguiram as normas exigidas pelo padrão de segurança e foram liberados de acordo com o número do protocolo CQB 0076/98.

2. Fixação do Material para Microscopia

Após 75 dias do início da germinação, as inflorescências das plantas adultas crescidas no solo foram coletadas e fixadas. As inflorescências foram fixadas por imersão em tampão de fixação (tópico 10). Para aceleração do processo de fixação as inflorescências foram submetidas a vácuo por 2 h no tampão de fixação. O tampão de fixação foi trocado por um novo e o material foi deixado por 12 h sob agitação. Transcorrido este tempo, as amostras foram lavadas duas vezes por 15 min na solução tampão cacodilato de sódio 0,05 M; pH 7,4. A desidratação foi realizada em séries cetônicas (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%) com intervalos de 1 - 2 h em cada solução. Posteriormente, as amostras foram incluídas em concentrações crescentes da resina Spurr (1969) até que se obtivesse a resina pura.

Os materiais emblocados foram cortados no micrótomo Microm HM 325. Os cortes de 2 - 4 μm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina (0,05%). Posteriormente, as lâminas foram montadas com permout. As observações foram realizadas no microscópio Leica DMR acoplado ao sistema de captura de imagem DMLD para fotos. As fotos foram analisadas no programa ANALYSIS.

3. Coleta do Material para Northern blot

Após 75 dias do início da germinação as inflorescências das plantas adultas foram coletadas. 10 inflorescências, para cada uma das linhagens analisadas, foram selecionadas contendo apenas os botões florais. As inflorescências foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos de microcentrífuga. O macerado foi mantido no freezer – 80 °C, até o momento de uso.

4. Extração de RNA

Todos os procedimentos foram realizados em microtubos de 1,5 ml. Inicialmente ao macerado foi adicionado 600 μl de tampão de lise (tópico 10), 300 μl de fenol e 300 μl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguido de uma centrifugação de 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo

tubo ao qual foi adicionado 1VI de fenol e centrifugado por 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e recolocado em um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 VI de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguido de 15 min centrifugando a 14.000 rpm. Novamente transferiu-se o sobrenadante para um tubo e foi acrescentado 1 VI de LiCl 4 M, incubando a 4 °C por 16 h. Em seguida ao período de incubação, foi realizada uma centrifugação de 20 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionado 200 µl de etanol 70%, seguido por uma centrifugação de 15 min a 14.000 rpm. Esta etapa de lavagem foi repetida 3 vezes. O pellet foi seco a vácuo e re-suspenso em 50 µl de água Milli-Q (Millipore Crop.) incubado a 65 °C por 10 min. O RNA foi mantido no freezer – 80 °C até o momento do uso.

5. Análise por Northern blot

O RNA extraído foi quantificado através de leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro. A quantificação foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, a fim de estimar a pureza do RNA em relação às proteínas contaminantes. O RNA foi diluído na proporção 1:250 de água Milli-Q. O cálculo da concentração de RNA foi realizado utilizando o valor padrão, onde 1 D.O. equivale a 40 µg de RNA.

Cada amostra de RNA, com cerca de 20 µg de material, foi misturada com 2 µl de MOPS 10X, 4 µl de formaldeído 37%, 10 µl de formamida, 2 µl de tampão de amostra e 1µg de brometo, atingindo um volume final de 23 µl. Em seguida, as

amostras foram aquecidas por 15 min a 65 °C, e então aplicadas em gel de agarose 1,5%, contendo 1 X MOPS e 3% de formaldeído. A migração do RNA em gel foi feita por 18 h a 20 V em tampão de corrida MOPS 1 X.

Após o término da eletroforese, o gel foi colocado em uma ponte de transferência com SSC 20 X e o filtro de náilon (Hybond N/Amersham) sobre ela. A transferência do RNA do gel para o filtro foi realizada por capilaridade por aproximadamente 20 h. Em seguida, o filtro foi seco por 2 h a 80 °C e exposto ao UV por 3 min para a fixação do RNA.

5.a. Pré-Hibridização dos Filtros de Náilon

Os filtros foram pré-hibridizados a 65 °C por 2 h utilizando solução de hibridização contendo tampão fosfato 0,5 M; SDS 7% e EDTA 1mM (Church and Gilbert, 1984). Em seguida, os filtros foram submetidos a uma hibridização de 20 h a 65 °C com sondas marcadas radioativamente com $[\alpha]$ dCTP³² (tópico 5.b.) previamente purificada (tópico 5.b.). As subseqüentes lavagens foram realizadas utilizando as seguintes soluções: (1) 3X SSC e 0,1% SDS; (2) 1X SCS e 0,1% SDS; (3) 0,1X SSC e 0,1% SDS. O filtro foi condicionado em cassete fotográfico com filmes Kodak X AR (Kodak) e colocado a – 80 °C por períodos de tempo variáveis até o momento da revelação.

5.b. Preparo das Sondas Radioativas

As sondas utilizadas nesse trabalho derivaram de fragmentos de cDNA dos genes At1g12080, At2g42940 e At1g27710 clonados no vetor pGEM T easy (tópico 6).

As sondas foram preparadas de acordo com o método "Random Primed Probe" (Feinberg and Vogelstein, 1983). Em 11 μ l de água destilada estéril foi diluída 30 ng do fragmento de DNA purificado a ser utilizado como sonda. As amostras diluídas foram desnaturadas a 95 °C por 5 min, e logo em seguida colocadas no gelo. Para a marcação de sonda com [α]dCTP³² foram acrescentados aos fragmentos de DNA desnaturados 3 μ l de dNTP 5 mM; 2,5x de mix de marcação pd(N)₆ Random Hexamer (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 12,5 mM de MgCl₂; 25 mM de β -mercaptoetanol; 1 mg/ml de BSA e 750 μ g/ml de pd(N)₆ Random Hexamer); 2 U do fragmento maior da DNA polimerase de E. coli (Klenow) e por último 3 μ l de [α]dCTP³² (Amersham Pharmacia). A reação foi incubada por 2 h a 37 °C, e em seguida purificada com espermina para eliminação de radioatividade não incorporada.

Para purificação da sonda, adicionou-se 1 μ l de espermina 0,5 M a cada 30 μ l da reação de marcação da sonda, que foram incubando por 30 min no gelo. Após esse período foi realizada uma centrifugação de 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionado 100 μ l de tampão de re-suspensão (10 mM EDTA e 0,5% SDS) que foi incubado a 95 °C por 5 min.

5.c. Análise dos resultados de Northern blot

Apesar de terem sido calculados os valores equivalentes entre todas as amostras (em média 20 µg de RNA), após a eletroforese e/ou nos filtros após a transferência dos RNAs, foi possível observar que algumas pistas continham mais material que as outras. A intensidade da banda do rRNA 25S, corada com brometo de etídio, serviu como parâmetro de comparação entre as quantidades de RNA inicialmente aplicadas e a quantidade de mRNA específicos após os filtros serem expostos à radioatividade com as devidas sondas.

Para a normalização dos resultados foi utilizado o programa Scion Image, (Scion Corporation). Este programa permite inferir uma equivalência entre a quantidade de RNA aplicada no gel para cada amostra com a quantidade visualizada após a exposição do filtro à radioatividade. Esta normalização é importante quando se visa comparar a intensidade das bandas de mRNA de cada amostras para saber se a planta está super-expressando ou silenciando o gene de interesse.

6. Transformação de Escherichia coli através de Eletroporação

Para a inserção de uma construção em linhagens bacterianas competentes de E. coli foi utilizado o método de eletro-transformação. Utilizou-se 2 µl de DNA (referente a cada um dos fragmentos dos genes: At1g12080; At1g27710 e

At2g42940) acrescido de 40 μ l de células eletro-competentes, sendo a mistura incubada no gelo por 2 min. Após a incubação, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,1 cm, sendo então aplicado um pulso elétrico de 1,8 kV; 25 μ F; 200 Ω no aparelho de eletroporação (Gene Pulser apparatus - Biorad). Em seguida à aplicação do pulso, foi adicionado 1 ml de meio LB líquido, e a mistura foi incubada durante 1 h a 37 °C sob agitação. A mistura foi espalhada sobre meio LB sólido, em placas de petri, contendo antibióticos, tetraciclina (10 μ g/ml) e ampicilina (100 μ g/ml), sendo incubadas por aproximadamente 16 h a 37 °C.

Após esse período algumas colônias cresceram. Estas colônias foram selecionadas e crescidas individualmente em tubos de 15 ml com 3 ml de meio LB líquido contendo antibiótico por 16 h a 37 °C sob agitação para a extração do DNA plasmidial.

7. Extração do DNA Plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina e precipitação de DNA plasmidial – MINIPREP (Morelle, 1988). Após as colônias terem crescido por 16 h em meio LB líquido, 2 ml de cultura foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspensas em 200 μ l do tampão de lise (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; lisozima 4 mg/ml; glicose 50 mM) e incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 400 μ l de solução alcalina (NaOH 0,2N; SDS 1%). Após 5 min de incubação no gelo

foram adicionados 300 µl de acetato de sódio 7,5 M; pH 7,8. Após 10 min de incubação no gelo, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido, sendo repetida a centrifugação por 10 min. Foi adicionado ao sobrenadante 0,6 VI de isopropanol e incubado por 10 min a temperatura ambiente para precipitar o DNA, seguido de 10 min de centrifugação a 14.000 rpm. O precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% e centrifugado por 15 min a 14.000 rpm. Esta etapa foi repetida por 2 vezes. O material foi incubado a temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual, sendo então re-suspenso em 20 µl de água Milli-Q. Para facilitar a re-suspensão, as amostras foram incubadas por 10 min a 65 °C.

8. Manipulação do DNA com Enzima de Restrição

As amostras de DNA utilizadas no preparo das sondas, foram digeridas com a enzima de restrição EcoRI, no caso do At2g42940 e At1g27710, e com as enzimas de restrição PstI e SphI para o At1g12080. Os tampões de digestão utilizados foram os indicados pelos fabricantes. Foi respeitado um período de incubação de 2 h em temperatura adequada para a atividade das enzimas em questão. Os produtos da digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (TAE 0,5X).

9. Purificação de DNA a partir de Gel de Agarose

As amostras de DNA digeridas para a preparação de sondas foram isoladas a partir de gel de agarose pelo sistema High Pure PCR Product Purification Kit, seguindo as recomendações do fabricante (Roche). A separação do material digerido foi realizada em gel de agarose 1% (TAE 1X) por 3 h a 70 V. As bandas de interesse foram removidas do gel e transferidas para tubos de microcentrífuga. Foram adicionados 30 μ l do tampão de solubilização para cada 0,1 g de agarose. A mistura foi aquecida por 20 min a 50 °C e, em seguida, transferida para as colunas de purificação e centrifugadas por 1 min a 14.000 rpm. O filtrado obtido foi desprezado, sendo adicionados 500 μ l de tampão de solubilização nas colunas incubando por 1 min a temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação de 1 min a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado e as colunas foram lavadas com 700 μ l do tampão de lavagem fornecido pelo fabricante já adicionado etanol. Após a incubação por 5 min a temperatura ambiente, as colunas foram novamente centrifugadas por 1 min a 14.000 rpm, o filtrado descartado. As colunas foram centrifugadas por mais 1 min a 14.000 rpm para retirar o tampão residual. Finalmente, foram adicionados 50 μ l de tampão de eluição pré-aquecido a 65 °C, as colunas centrifugadas por 2 min a 14.000 rpm e o filtrado final recolhido e quantificado. O DNA purificado foi quantificado através da migração em gel de agarose 0,8% (TAE 0,5X) por comparação com a fluorescência de padrões de DNA do bacteriófago λ com massa conhecida.

10. Soluções

Meio LB líquido

Triptona 1%

Extrato de levedura 0,5%

NaCl 1%

pH 7,5

Meio LB sólido

Triptona 1%

Extrato de levedura 0,5%

NaCl 1%

Agar 1,5%

pH 7,5

Meio MS:

KNO 9,89 mM

CaCl₂.2H₂O 1,01 mM

MgSO₄.7H₂O 60,83 mM

NaH₂PO₄.H₂O 63 mM

NaHPO₄.7H₂O 11,18 mM

KCl 101,54 mM

(NH₄)₂SO₄.H₂O 16,42 mM

MnSO₄.H₂O 0,059 mM

ZnSO₄.7H₂O 0,010 mM

H₃BO₃ 0,048 mM

KI 0,0045 mM

Na₂MoO₄.2H₂O 0,001 mM

CuSO₄.5H₂O 0,001mM

CoCl₂.6H₂O 0,001 mM

Na₂EDTA.2H₂O 0,1 mM

FeSO₄.7H₂O 0,1 mM

Vitaminas do Meio MS:

Mio-inositol 0,055 mM

Tiamina.HCl 0,05 mM

Ácido nicotínico 0,0008 mM

Piridoxina.HCl 0,05 mM

MOPS 10X (pH 7):

MOPS 0,2M

Acetato de Sódio 0,05M pH 7

EDTA 0,01M

Tampão de amostra 10X:

Xylene Cyanol 0,125g

Glicerol 50% em H₂O

Tampão de fixação utilizado na microscopia

Glutaraldeído 2,5%

Formaldeído nascente 4%

Tampão cacodilato de sódio

21,402 g de cacodilato de sódio em 500 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7.4 com a adição de HCl.

Tampão de lise para extração de RNA:

Tris-HCl 200 mM em pH 8,0

EDTA 200 mM em pH 8,0

SDS 1%

SSC 20X (1 litro):

175,3g de NaCl

88,2g Citrato de Sódio

TAE 50X (pH 8,5):

Tris 242 g

Ac. Acético Glacial 57,1 ml

Na₂EDTA.2H₂O 37,2 g

RESULTADOS



Análise de Segregação

Sementes derivadas de plantas transformadas com *A. tumefaciens* contendo as construções: At2g42940-RNAi, 35S::At2g42940, At1g12080-RNAi, 35S::At1g12080 e At1g27710-RNAi foram selecionadas quanto à presença do T-DNA. A primeira análise teve o objetivo de selecionar plantas resistentes ao antibiótico canamicina. Como controle, foram utilizadas plantas tipo selvagem (não transformadas) e plantas transformadas apenas com o vetor binário utilizado para clonagem sem a presença de cDNA ou fragmento dos genes em questão.

As sementes das plantas tipo selvagem foram semeadas em placas contendo apenas meio MS. No decorrer de 2 a 3 semanas, as sementes germinaram e emitiram o par de cotilédones esverdeados. As sementes derivadas de plantas transformadas foram cultivadas da mesma forma, porém em meio com o agente de seleção, no caso a canamicina. As plantas resistentes, em placa, apresentam as mesmas características das plantas tipo selvagem. Ao contrário, as plantas sensíveis germinam e após a emissão do par de cotilédones acabam morrendo. Para cada uma das construções foram selecionadas 20 plantas resistentes que foram transferidas para a terra.

Após 3 a 4 meses de cultivo em terra as plantas da primeira geração produziram sementes, sendo coletadas individualmente. Cada planta resistente equivale a um evento de transformação, desta forma cada linhagem passou a ser

designada por um número. A próxima análise realizada teve como objetivo selecionar as linhagens da primeira geração que apresentassem 75% das plantas resistentes a canamicina, consistente com a razão esperada de 3:1 (resistentes: sensível). Esse resultado é consistente com a presença de um único evento de transformação. Foram selecionadas, no mínimo, 5 linhagens de plantas transformadas para cada construção. Dez plantas, de cada uma das linhagens, foram transferidas para a terra. Estas plantas, em terra, constituem a segunda geração (T2).

Por fim, com o objetivo de se trabalhar com as linhagem homozigotas para o T-DNA selecionou-se as linhagens que apresentassem a progênie 100% resistente quando crescidas em MS com canamicina. Foram selecionadas, no mínimo, 4 linhagens resistentes para cada uma das construções. Dez plantas de cada uma das linhagens foram transferidas para terra. Estas plantas, em terra, constituem a terceira geração (T3).

Caracterização fenotípica das linhagens

➤ Linhagens utilizadas como controle

As análises das características fenotípicas das plantas foram realizadas após 75 dias de cultivo em terra. No momento em que foi realizada a análise, as plantas tipo selvagem apresentaram 8 folhas com coloração verde na roseta e um eixo de inflorescência principal com botões florais, flores abertas e siliquas.

As 8 primeiras siliquas maduras do eixo de inflorescência, de aproximadamente 20 plantas, foram medidas na direção da base para o ápice. Foram calculados a média e o desvio padrão, e as siliquas apresentaram $0,9 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$. Fenotipicamente estas siliquas são verdes, delgadas e compridas. Foi avaliada a quantidade de flores abertas no eixo de inflorescência principal de aproximadamente 20 plantas. Foram calculados a média e o desvio padrão e obteve-se $3 \text{ f.a.} \pm 1 \text{ f.a.}$ (flores aberta). Após 105 dias de cultivo o comprimento final, de aproximadamente 20 plantas, foi medido e calculado tanto a média quanto o desvio padrão. As plantas apresentaram $14,4 \text{ cm} \pm 1,5 \text{ cm}$.

As plantas transgênicas utilizadas como controle, contendo apenas o vetor vazio, tanto para a construção do silenciamento como da super-expressão, apresentaram características fenotípicas semelhantes a linhagem selvagem.

Os mesmos critérios de avaliação empregados nas análises das plantas controles foram utilizados nas análises das linhagens transgênicas dos genes At1g12080; At1g27710 e At2g42940. Todas as linhagens analisadas foram derivadas de plantas que apresentaram a segregação em canamicina compatível com a presença de um T-DNA e que na geração seguinte apresentaram resistência de 100%, compatível com um genótipo homozigoto para o T-DNA.

➤ 35S::At1g12080

Foram analisadas 4 linhagens (#01.10; #02.02; #03.02 e #06.02) contendo a construção que leva a super-expressão do gene At1g12080.

As características fenotípicas das linhagens foram similares às obtidas no tipo selvagem. Não foram observadas diferenças nas características analisadas do desenvolvimento vegetativo, assim como do desenvolvimento reprodutivo das plantas (Figura 17; Gráfico 1). Também não foram observadas diferenças morfológicas de qualquer um dos órgãos avaliados nas condições usuais de cultivo.

➤ At1g12080::RNAi

Foram analisadas 5 linhagens (#05.01; #06.08; #12.03; #14,05 e #16.05). Não foram observadas diferenças morfológicas nos órgãos reprodutivos das linhagens transformadas e as características fenotípicas foram semelhantes às observadas no tipo selvagem (Figura 17).

A única característica observada que apresentou diferença significativa entre as linhagens das plantas At1g12080-RNAi quando comparada ao tipo selvagem foi a redução do porte da planta. Foram medidas, aproximadamente, 10 plantas de cada linhagem da construção At1g12080-RNAi. Foram calculados a média e o desvio padrão, e o tamanho final atingiu $10,5 \text{ cm} \pm 1,9 \text{ cm}$. Portanto, em média 4 cm menores que os indivíduos selvagens ($14,4 \text{ cm} \pm 1,5 \text{ cm}$) cultivados sob as mesmas condições (Gráfico 1).

➤ At1g27710::RNAi

Nas quatro linhagens analisadas (#07.06; #05.03; #01.10 e #02.06) observa-se com frequência que ao longo dos eixos de inflorescência as síliquas são fenotipicamente diferentes do controle, sendo menores e com a largura maior (Figura 18 B). Foi calculada a média das 8 primeiras síliquas maduras de, no mínimo, 5 plantas de cada uma das linhagens. As plantas At1g27710-RNAi apresentam redução no comprimento das síliquas maduras $0,4 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$ (Gráfico 2).

As flores das linhagens transgênicas apresentaram características fenotípicas semelhantes ao tipo selvagem assim como o desenvolvimento vegetativo (Figura 18 A).

➤ 35S::At2g42940

Foram analisadas 5 diferentes linhagens (#05.03; #04.10; #13.03; #18.02; #20.10).

As características fenotípicas das plantas com a construção 35S::At2g42940 foram semelhantes às observadas no tipo selvagem. Não foram observadas alterações morfológicas nos órgãos reprodutivos (Figura 19 A).

Com relação ao número de flores abertas no eixo principal da inflorescência foram analisadas 10 inflorescências de cada uma das linhagens. Foi observado que as linhagens transgênicas apresentaram uma maior quantidade de flores abertas quando comparado com o tipo selvagem (Figura 19 C; Gráficos 3A e B). Foram utilizados dois gráficos devido a grande variação entre os desvios padrões. As linhagens transgênicas #13 e #04 apresentaram: $7,8 \pm 2,1$ f.a. e $7,7 \pm 2,0$ f.a., respectivamente. A linhagem #18 apresentou $4,3 \pm 1,0$ f.a.; e ambas as linhagens #20 e #05 apresentaram $5,0 \pm 1,0$ f.a..

Também foi observada uma maior quantidade de botões florais nas linhagens transgênicas quando comparados com o tipo selvagem (Figura 19 C).

As siliquas maduras das linhagens analisadas são fenotipicamente semelhantes ao tipo selvagem. As siliquas são delgadas e compridas e quanto ao tamanho possuem $0,9 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$.

➤ At2g42940::RNAi

Foram analisadas 4 diferentes linhagens (#10.04; #06.06; #09.01; #13.17). Não foram observadas alterações no desenvolvimento da planta. Os órgãos reprodutivos das linhagens transformadas são semelhantes ao tipo selvagem (Figura 19 B).

Com relação ao número de flores abertas no eixo de inflorescência principal foi observado que as linhagens transgênicas At2g42940-RNAi apresentaram a mesma quantidade de flores abertas quando comparados com o tipo selvagem (Gráfico 3 C).

Observa-se com frequência nas linhagens At2g42940-RNAi a existência de dois grupos distintos de síliquas distribuídas ao longo da inflorescência possuindo: (1) características semelhantes ao tipo selvagem, (2) menores no tamanho e com a largura maior (Figura 19 D). Encontrou-se uma variação na medição das síliquas adultas abrangendo de 0,3 cm a 0,9 cm. Por este motivo foram criados dois grupos fenotípicos: grupo 1, que apresentam síliquas entre 0,3 cm e 0,5 cm ($0,4 \text{ cm} \pm 0,06 \text{ cm}$); e grupo 2, que apresentam síliquas entre 0,7 cm e 0,9 cm ($0,8 \text{ cm} \pm 0,08 \text{ cm}$).

Figura 17 Flores 35S::At1g12080, At1g12080-RNAi e Selvagem cultivadas sob as mesmas condições. Foram retirados algumas pétalas e/ou sépalas das flores para a visualização dos estames e carpelo. Pétala (Pe); Sépala (Se), Antera (An); Carpelo (Cp).

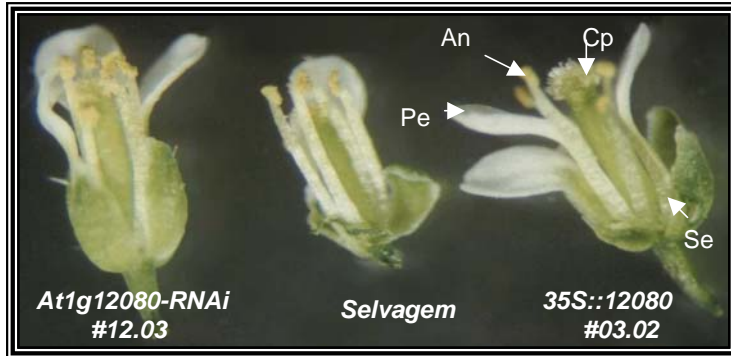


Gráfico 1 Comparação entre a média do comprimento final das inflorescências entre as linhagens 35S::At1g12080, At1g12080-RNAi e Selvagem. As barras no gráfico significam o desvio padrão.

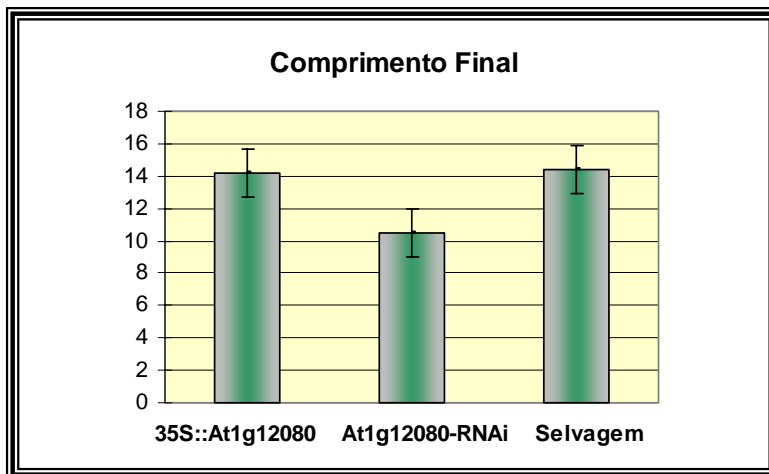


Figura 18 Flores At1g27710-RNAi e Selvagem cultivadas sob as mesmas condições (A). Foram retirados algumas pétalas e/ou sépalas das flores para a visualização dos estames e carpelo. Pétala (Pe); Sépala (Se), Antera (An); Carpelo (Cp).

Plantas adultas da linhagem At1g27710-RNAi (B) e Selvagem (C). As setas demonstram o tamanho reduzido das síliquas na linhagem At1g27710-RNAi (B).



Gráfico 2 Comparação entre a média do comprimento das 8 primeiras síliquas entre as linhagens At1g27710-RNAi e Selvagem. As barras no gráfico significam o desvio padrão.

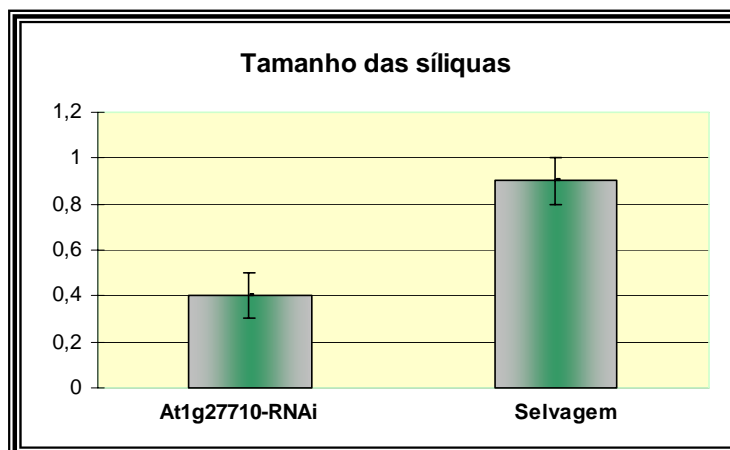


Figura 19 Flores das linhagens 35S::At2g42940 e Selvagem (A) e At2g42940-RNAi e Selvagem (B) cultivadas sob as mesmas condições. Foram retirados algumas pétalas e/ou sépalas das flores para a visualização dos estames e carpelo. Pétala (Pe); Sépala (Se), Antera (An); Carpelo (Cp).

Inflorescência apical da linhagem Selvagem e 35S::At2g42940 (C). As setas demonstram a maior quantidade de flores abertas e botões florais na inflorescência da linhagem 35S::At2g42940.

Plantas adultas da linhagem At2g42940-RNAi (D) e Selvagem (E). As setas demonstram o tamanho reduzido das síliquas na linhagem At2g42940-RNAi.

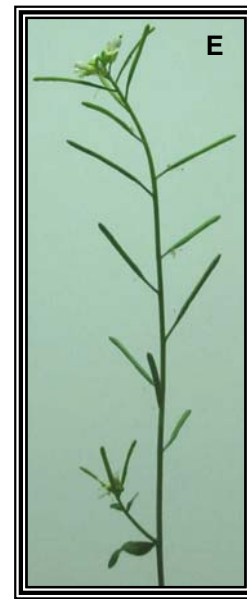
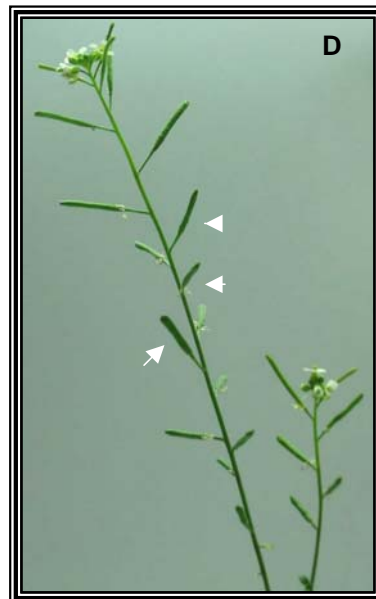
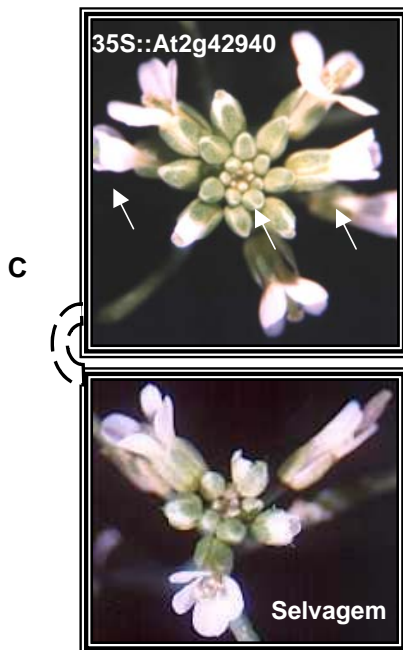
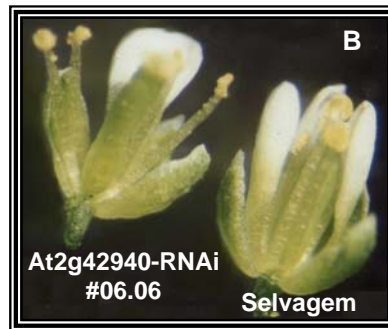
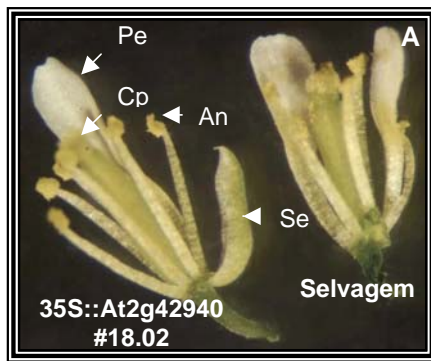
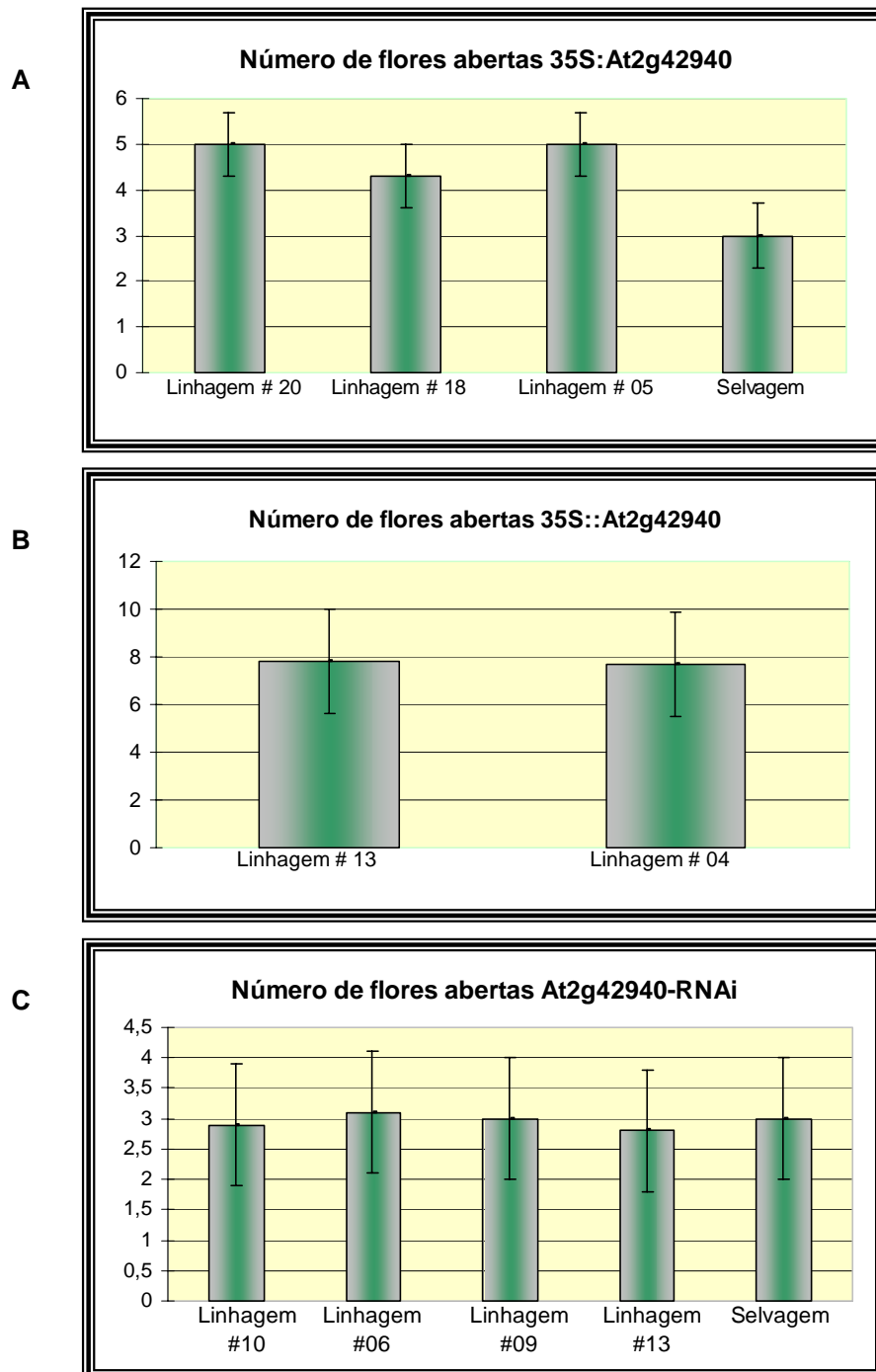


Gráfico 3 Comparação entre a média do número de flores abertas nas inflorescências das linhagens transgênicas 35S::At2g42940 (A e B) e At2g42940-RNAi (C) com o selvagem. As barras indicam o desvio padrão.



Northern Blot

A observação de fenótipos associados a super-expressão ou ao silenciamento de um gene nas linhagem obtidas nos motivou a fazer uma análise mais detalhada destas plantas. Para essa análise utilizamos experimentos de northern blot para avaliar a expressão dos genes At1g12080, At1g27710 e At2g42940.

Os experimentos foram realizados com as plantas transgênicas específicas para cada uma das construções, sendo o tipo selvagem utilizado sempre como referência. Devido aos problemas na quantidade de material aplicado no gel, todos os resultados foram normalizados. A normalização teve por intuito a comparação entre a quantidade de RNA aplicada no gel com o sinal observado após a hibridização da sonda. Em alguns caso, após a hibridização da sonda, não foi possível observar a banda referente ao mRNA, nesta situação foi inferido o valor do ruído do filtro para as amostras. Devido a falta de um marcador de peso molecular a inferência do tamanho das bandas dos mRNAs não é precisa. Entretanto, através da comparação entre as bandas dos rRNAs no gel de agarose marcadas com brometo de etídio e das bandas de mRNAs na autoradiografia foi possível estimar um tamanho aproximado dos mRNAs específicos.

➤ 35S::At1g12080

Formatado

Após o filtro ter sido hibridizado com a sonda, foi possível observar que o tipo selvagem apresentou uma única banda correspondente ao mRNA do gene At1g12080 (Figura 20 A). Esta banda é referente ao mRNA de menor peso molecular equivalente ao mRNA mais abundante no tecido floral. Em contrapartida, as linhagens transgênicas apresentaram duas bandas que hibridizaram para sonda referente ao gene At1g12080 (Figura 20 A). A banda semelhante aquela observada no tipo selvagem corresponde ao mRNA de menor peso molecular, enquanto a banda de maior peso molecular corresponde ao RNA derivado da cópia inserida no genoma por transgenia. O mRNA de menor peso molecular possui, aproximadamente, 545 pb, enquanto o mRNA de maior peso molecular possui, aproximadamente, 1490 pb. Após a normalização dos resultados foi possível observar que as linhagens transgênicas apresentaram níveis inferiores ao valor do selvagem para a banda de menor peso molecular (Gráfico 4 A).

Considerando o valor do ruído do filtro para o tipo selvagem, os resultados foram normalizados e foi demonstrado que as plantas transgênicas apresentaram quantidades elevadas de RNA derivado do transgene (banda maior) do gene At1g12080 (Gráfico 4 B).

A linhagem transgênica 35S::At1g12080 #06.02 não foi utilizada na caracterização molecular, devido a pouca quantidade de RNA conseguido na extração.

➤ At1g12080-RNAi

Após o filtro ter sido hibridizado com a sonda do gene At1g12080 foi possível a observação de uma única banda referente ao mRNA no tipo selvagem como também em algumas linhagens transgênicas (Figura 21 A). Esta banda possui, aproximadamente, 545 pb.

Posteriormente aos resultados normalizados foi possível observar que todas as linhagens transgênicas apresentaram valores inferiores ao do tipo selvagem (Gráfico 5). Este fato demonstra que todas as linhagens transgênicas encontram-se silenciadas para o gene At1g12080.

➤ At1g27710-RNAi

Após o filtro ter sido hibridizado com a sonda foi possível observar que todas as amostras possuem uma única banda de mesmo tamanho (Figura 22 A). As bandas possuem, aproximadamente 860 pb. Entretanto, as intensidades das bandas foram mais fracas do que a banda do tipo selvagem. Depois dos resultados normalizados foi possível observar que as linhagens transgênicas apresentaram valores inferiores ao do tipo selvagem (Gráfico 6). Este fato demonstra que as linhagens transgênicas encontram-se silenciadas para o gene At1g27710.

As amostras das linhagens transgênicas At1g27710-RNAi #01.10 e At1g27710-RNAi #02.06 não foram utilizadas na caracterização molecular, devido a pouca quantidade de RNA conseguido na extração.

➤ 35S::At2g42940

Após o filtro ser hibridizado com a sonda radioativa observa-se que as linhagens transgênicas apresentaram uma única banda de mesmo tamanho (Figura 23 A). Esta banda é referente ao cDNA super-expresso nas linhagens transgênicas possuindo, aproximadamente, 1260 pb. Em contra partida, não foi detectado nenhuma banda para o tipo selvagem (Figura 23 A).

Considerando o valor do ruído do filtro para o tipo selvagem, os resultados foram normalizados e foi demonstrado que as plantas transgênicas apresentaram quantidade elevadas de mRNA do At2g42940 (Gráfico 7). As linhagens transgênicas 35S::At2g42940 #04.10 e 35S::At2g42940 #13.03 não foram utilizadas na caracterização molecular, devido a pouca quantidade de RNA conseguido na extração.

➤ At2g42940-RNAi

Após o filtro ter sido hibridizado com a sonda não foi possível à verificação de nenhum transcrito de mRNA do gene At2g42940, tanto nas quatro linhagens transgênicas como da planta selvagem (Figura 24 A). O fato do mRNA do tipo selvagem não poder ser detectado por esta técnica, não permite com que seja possível afirmar que as plantas transgênicas estão silenciadas.

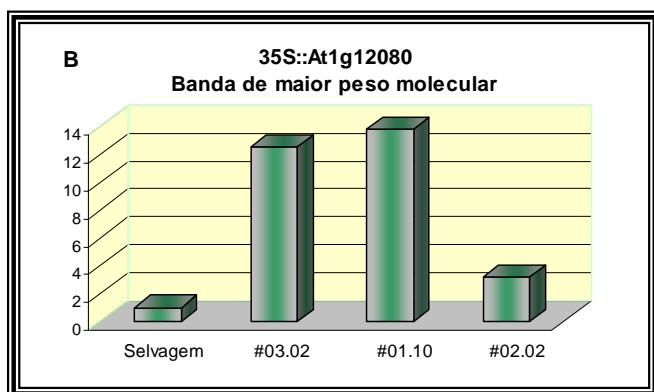
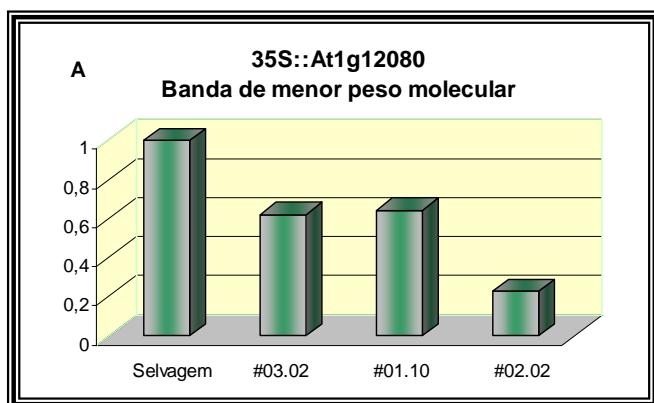


Gráfico 4 Quantificação do sinal observado após hibridização com uma sonda específica para o gene At1g12080.

(A) Banda referente ao mRNA de menor peso molecular.

(B) Banda referente ao mRNA de maior peso molecular. O sinal foi normalizado a partir das quantidades de RNA total aplicada em cada poço do gel.

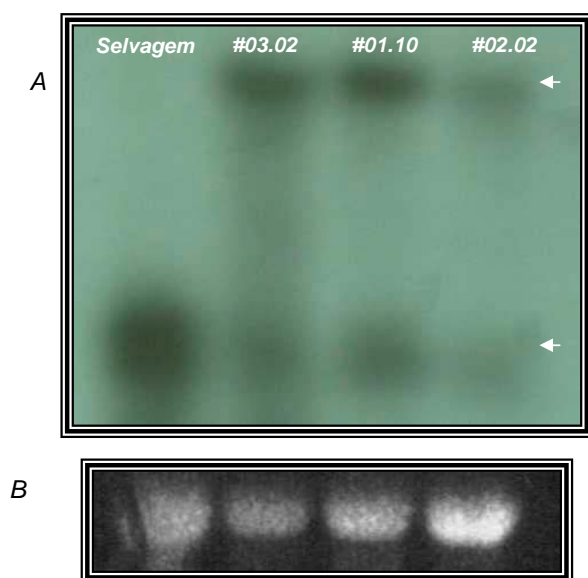


Figura 20 Análise da expressão por northern blot da expressão do gene At1g12080.

(A) Autorradiografia demonstrando os mRNAs específicos do gene At1g12080 que hibridizaram com a sonda específica para o gene At1g12080 nas plantas tipo selvagem e nas linhagens transgênicas que super-expressam o gene.

(B) Banda correspondente ao RNA ribossomal (25S) obtida após utilização de brometo de etídio no filtro de hibridização antes da transferência. A imagem foi captada pelo foto-documentador após visualização em trans-iluminador de UV.

Gráfico 5 Quantificação do sinal observado após hibridização com uma sonda específica para o gene At1g12080. O sinal foi normalizado a partir das quantidades de RNA total aplicada em cada poço do gel.

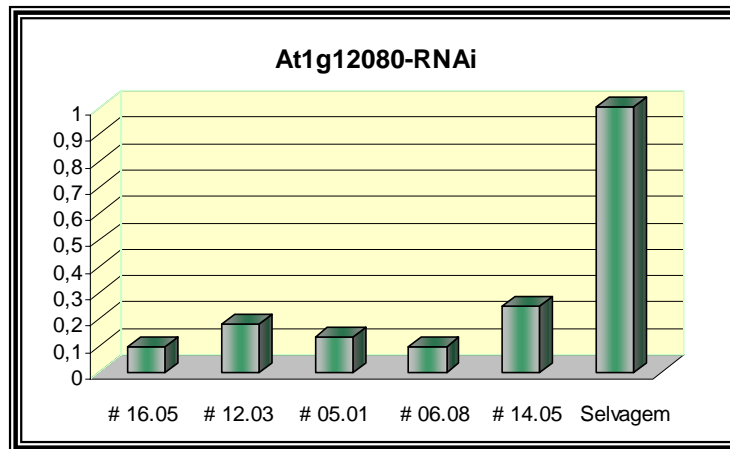


Figura 21 Análise da expressão por northern blot da expressão do gene At1g12080 (A) Autorradiografia demonstrando os mRNAs específicos do gene At1g12080 que hibridizaram com a sonda específica para o gene At1g12080 nas plantas tipo selvagem e nas linhagens transgênicas silenciadas para o gene At1g12080. (B) Banda correspondente ao RNA ribossomal (25 S) obtida após utilização de brometo de etídio no filtro de hibridização antes da transferência. A imagem foi captada pelo fotodocumentador após visualização em trans-iluminador de UV.

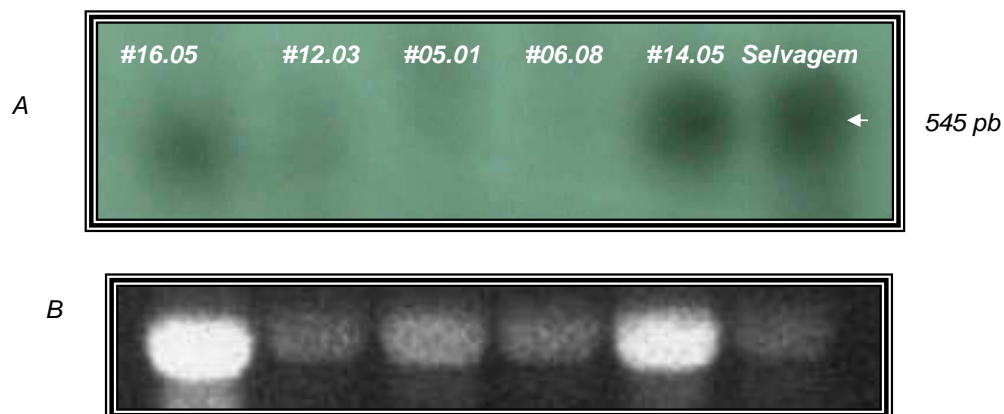


Gráfico 6 Quantificação do sinal observado após hibridização com uma sonda específica para o gene At1g27710. O sinal foi normalizado a partir das quantidades de RNA total aplicada em cada poço do gel.

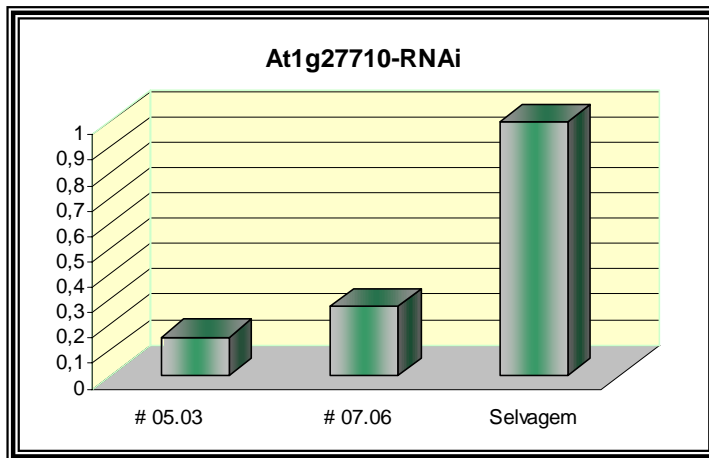


Figura 22 Análise da expressão por northern blot da expressão do gene At1g27710 (A) Autorradiografia demonstrando os mRNAs específicos do gene At1g27710 que hibridizaram com a sonda específica para o gene At1g27710 nas plantas tipo selvagem e nas linhagens transgênicas silenciadas para o gene At1g27710. (B) Banda correspondente ao RNA ribossomal (25 S) obtida após utilização de brometo de etídio no filtro de hibridização antes da transferência. A imagem foi captada pelo fotodocumentador após visualização em trans-iluminador de UV.

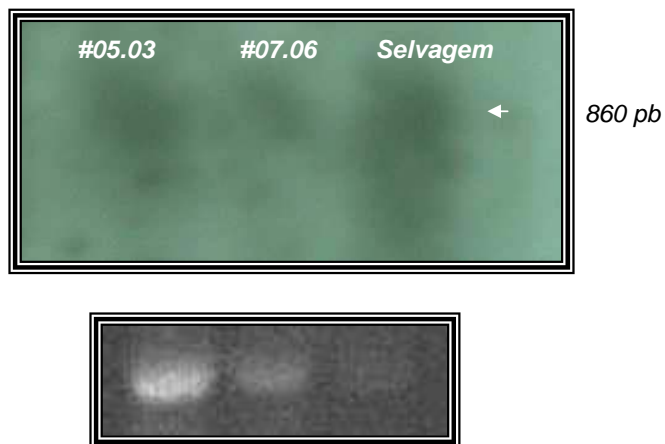


Gráfico 7 Quantificação do sinal observado após hibridização com uma sonda específica para o gene At2g42940. O sinal foi normalizado a partir das quantidades de RNA total aplicada em cada poço do gel.

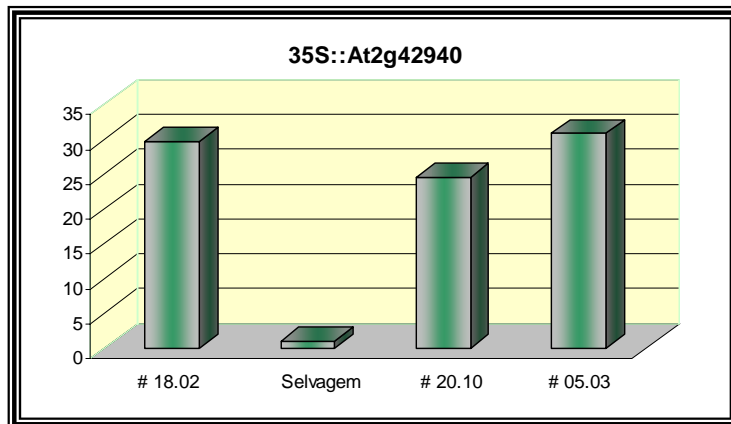


Figura 23 Análise da expressão por northern blot da expressão do gene At2g42940
(A) Autorradiografia demonstrando os mRNAs específicos do gene At2g42940 que hibridizaram com a sonda específica para o gene At2g42940 nas plantas tipo selvagem e nas linhagens transgênicas que super-expressam o gene.
(B) Banda correspondente ao RNA ribossomal (25 S) obtida após utilização de brometo de etídio no filtro de hibridização antes da transferência. A imagem foi captada pelo fotodocumentador após visualização em trans-iluminador de UV.

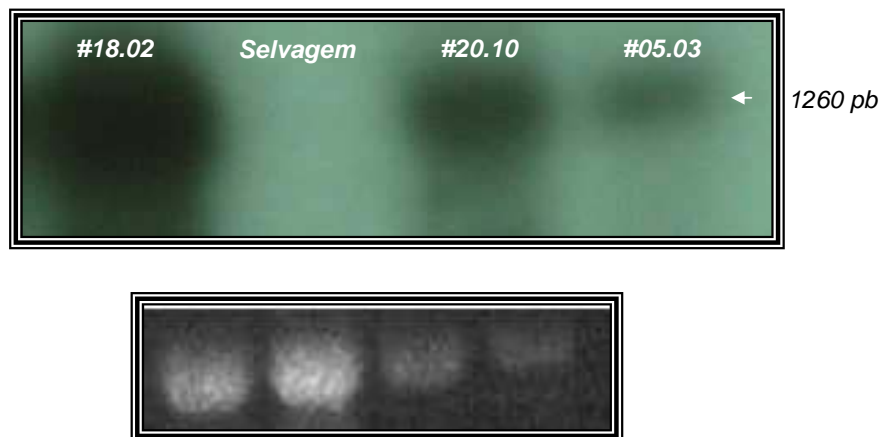
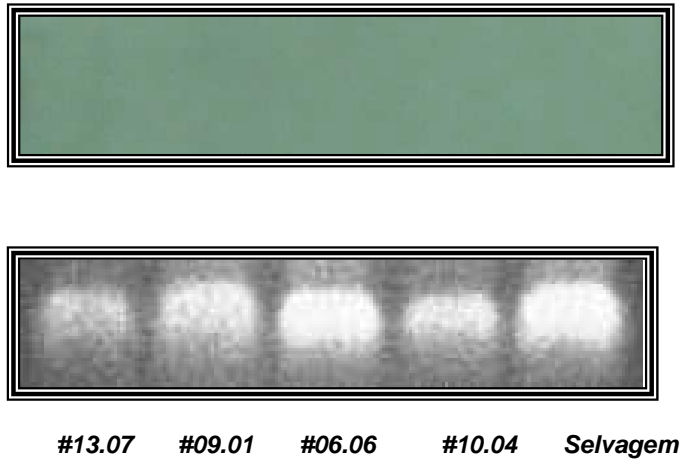


Figura 24 Análise da expressão por northern blot da expressão do gene At2g42940
(A) Autoradiografia demonstrando os mRNAs específicos do gene At2g42940 que hibridizaram com a sonda específica para o gene At2g42940 nas plantas tipo selvagem e nas linhagens transgênicas silenciadas para o gene At2g42940.
(B) Banda correspondente ao RNA ribossomal (25 S) obtida após utilização de brometo de etídio no filtro de hibridização antes da transferência. A imagem foi captada pelo fotodocumentador após visualização em trans-iluminador de UV.



Caracterização anatômica das linhagens

As inflorescências das plantas foram coletadas após 75 dias de cultivo, sendo posteriormente fixadas e emblocadas em resina Spurr. Foram selecionadas duas linhagens diferentes de cada construção para a realização destas análises.

➤ 35S::At1g12080 e At1g12080-RNAi

As análises anatômicas das linhagens transgênicas, para super-expressão e silenciamento do gene At1g12080, revelaram que as estruturas dos órgãos florais são semelhantes ao tipo selvagem. Nos estágios iniciais e tardios do desenvolvimento dos estames das plantas transgênicas não foram observadas nenhuma alteração (Figura 25).

➤ At1g27710-RNAi

A análise anatômica das linhagens transgênicas para o silenciamento do gene At1g27710 demonstrou a presença, ainda que não consistente, de plantas com anteras colapsadas em plantas analisadas nos estágios tardios do desenvolvimento da antera.

No estágio inicial do desenvolvimento da antera, nenhuma alteração anatômica foi observada nas linhagens transgênicas. Nos cortes longitudinais e transversais das anteras das linhagens transgênicas no estágio 12, é possível

observar a existência de anteras mau formadas (Figura 26). Nos casos mais severos as anteras encontram-se completamente colapsadas (Figura 26). Nos casos menos severos, detecta-se no interior do microsporângio a presença de restos celulares e pouquíssimos grãos de pólen que por alguma razão conseguiram continuar seu desenvolvimento (Figura 26). As células da epiderme e do endotécio podem ser identificadas (Figura 26) indicando que a degeneração está restrita aos micrósporos e/ou tapete.

➤ 35S::At2g42940

As análises anatômicas realizadas nas linhagens transgênicas com a super-expressão do At2g42940 não demonstraram nenhuma alteração nas estruturas dos órgãos florais. Foi realizado o acompanhamento dos estágios iniciais e tardios do desenvolvimento da antera das linhagens transgênicas e todas as etapas foram semelhantes ao tipo selvagem (Figura 27).

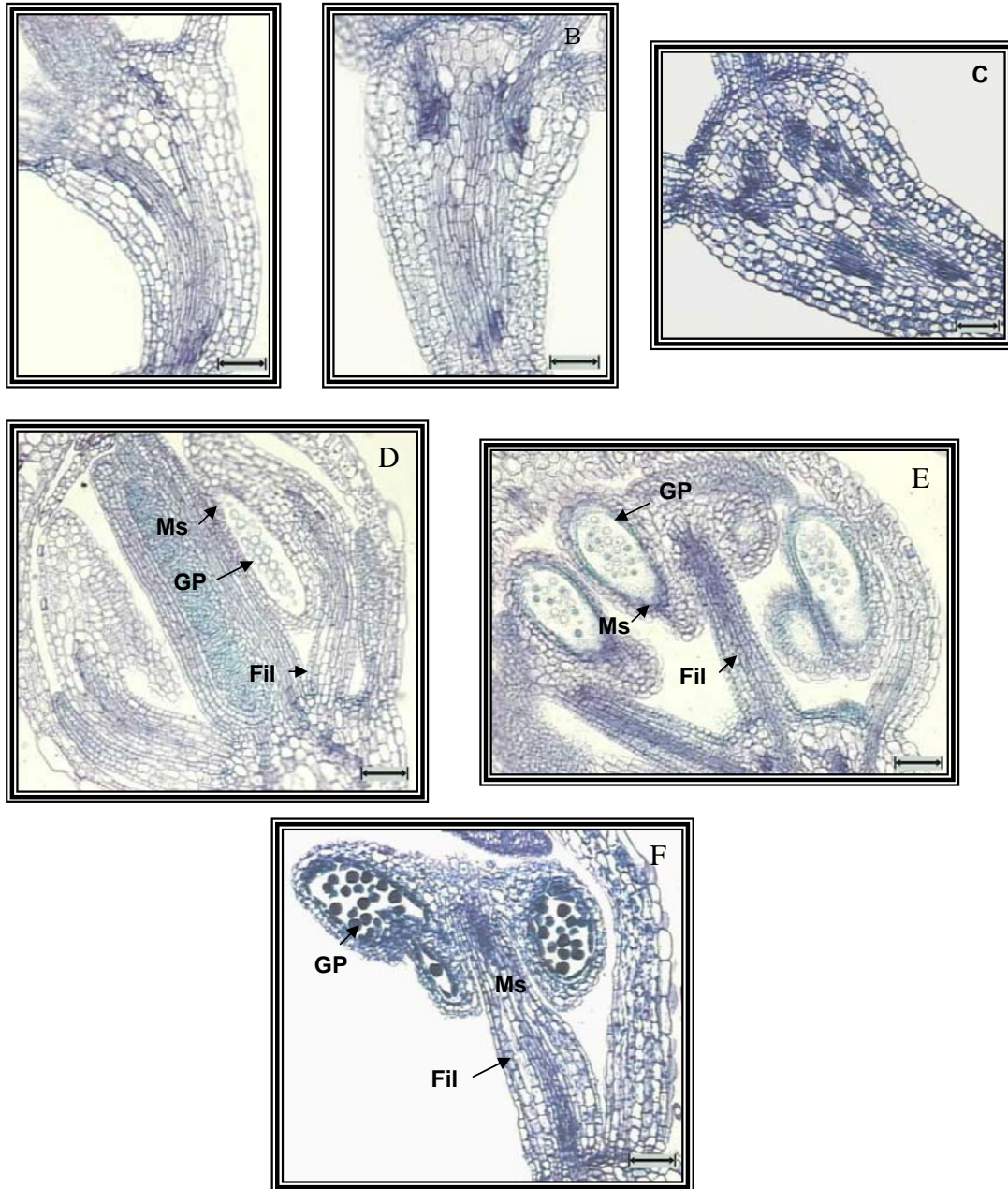
➤ At2g42940-RNAi

Mesmo não sendo possível avaliar o grau de silenciamento do gene At2g42940 decidimos avaliar anatomicamente as linhagens transgênicas At2g42940-RNAi. A análise anatômica das linhagens transgênicas demonstraram a presença, ainda que não consistente, de plantas com má formação das anteras nos estágios tardios do desenvolvimento.

Nenhuma alteração anatômica foi observada nos estágios iniciais do desenvolvimento da antera nas linhagens transgênicas (Figura 27). No estágio 12, foi possível observar a má formação das anteras. Nos casos menos drásticos, no interior do microsporângio há a existência de restos celulares juntamente com a presença de alguns grãos de pólen (Figura 28). Nos casos mais drásticos é possível observar as anteras completamente colapsadas apenas contendo restos celulares no interior do microsporângio (Figura 28). As células da epiderme e do endotécio podem ser identificadas (Figura 28), isto indica que houve degeneração dos micrósporos e/ou tapete.

Figura 25 Análise anatômica das linhagens 35S::At1g12080, At1g12080-RNAi e Selvagem cultivadas sob as mesmas condições.

Seções longitudinais do pedicelo das linhagens 35S::At1g12080 (A), At1g12080-RNAi (B) e Selvagem (C). Barra = 0,25 μ m. Seções longitudinais do filete das linhagens 35S::At1g12080 (D), At1g12080-RNAi (E) e Selvagem (F). Barra = 0,25 μ m. Fase de diferenciação da antera (Estágio 7) 35S::At1g12080 (G), At1g12080-RNAi (H) e Selvagem (I). Barra = 0,25 μ m. Fase de maturação da antera (Estágio 12) 35S::At1g12080 (J), At1g12080-RNAi (L) e Selvagem (M). Barra = 0,25 μ m. En – Endotécio, Ep – Epiderme, Fil – Filete, GP – Grão de pólen, Ms – microsporângio, T – Tétrade, Tp – Tapete.



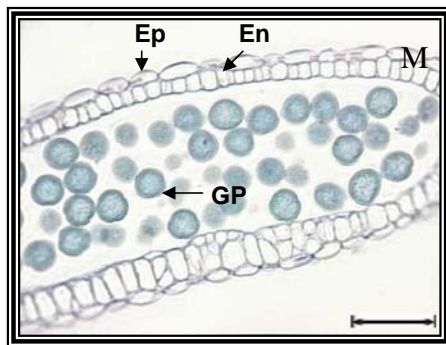
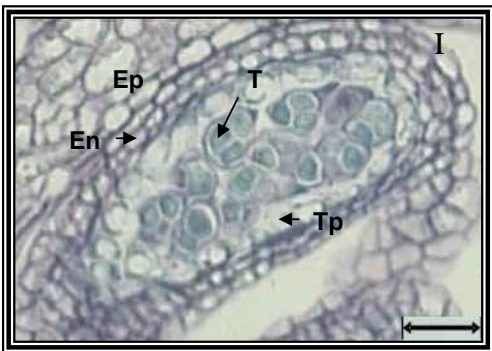
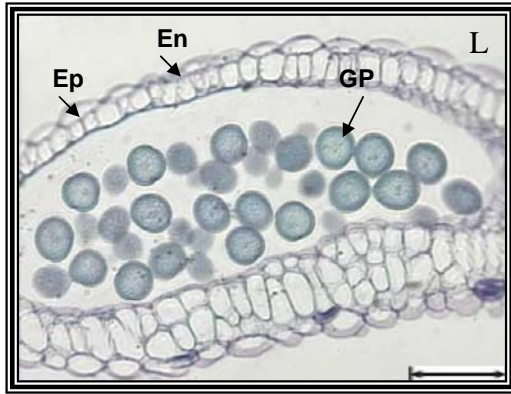
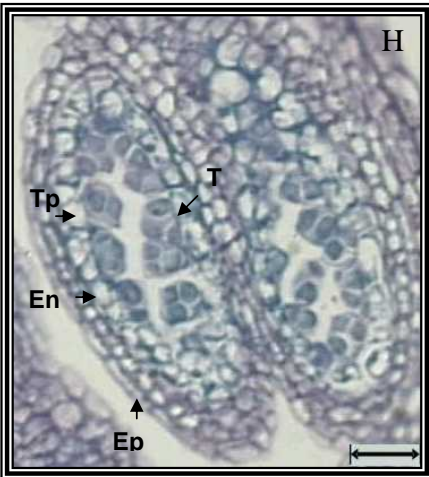
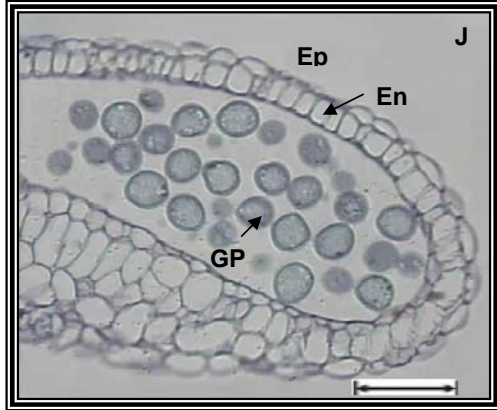
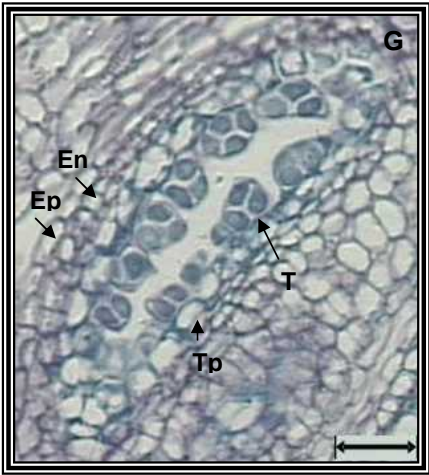
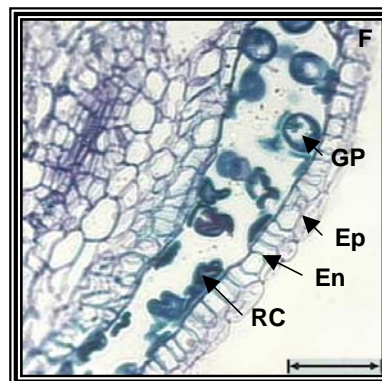
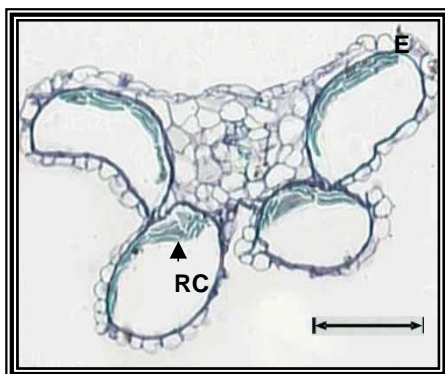
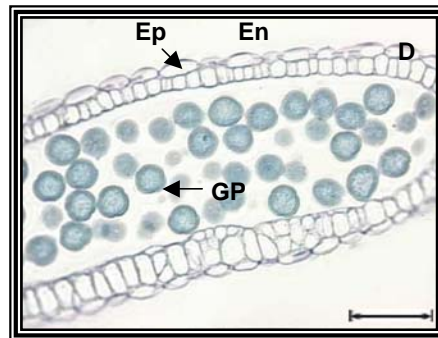
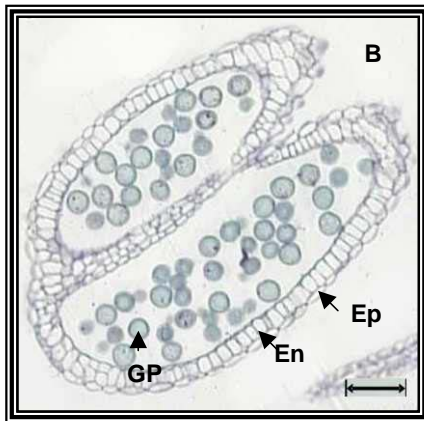
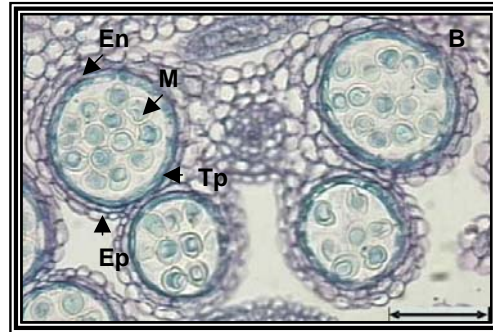
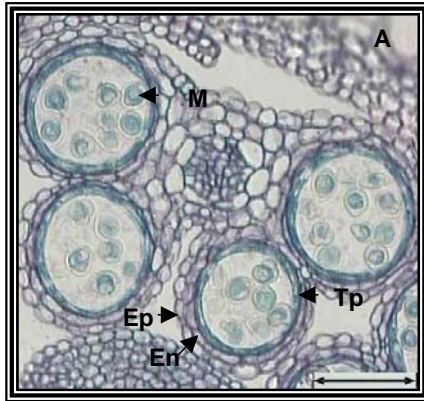


Figura 26 Análise anatômica das linhagens At1g27710-RNAi e Selvagem cultivadas sob as mesmas condições.

Fase de maturação da antera (Estágio 9 - 12). Seções transversais e longitudinais das anteras (A e B) At1g27710-RNAi com características normais, (C e D) Selvagem, (E - L) At1g27710-RNAi com anatomia alterada. En – endotécio, Ep – Epiderme, GP – Grão de pólen, M – Micrósporo, RC – Restos celulares, Tp – Tapete. Barra = 0,25 μ m.



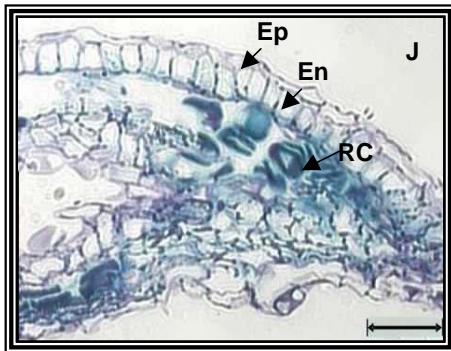
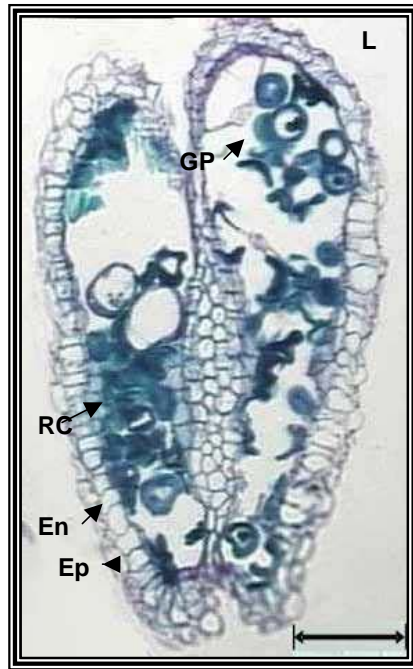
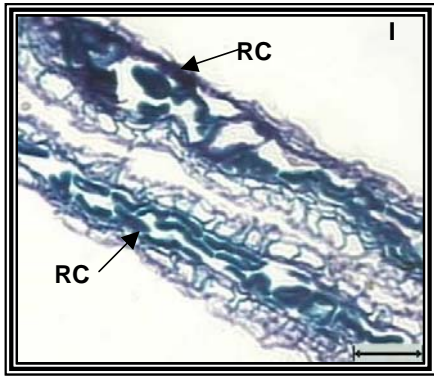
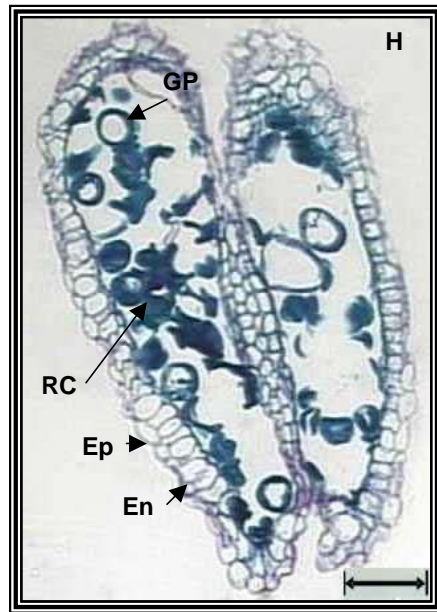
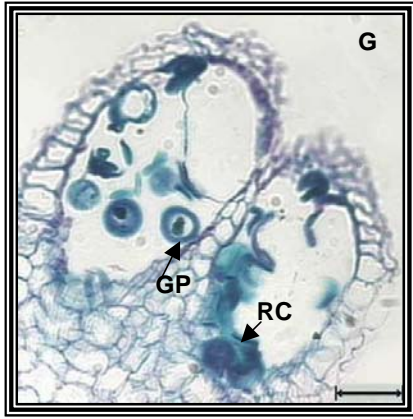


Figura 27 Análise anatômica das linhagens 35S::At2g42940, At2g42940-RNAi e Selvagem cultivadas sob as mesmas condições.

Fase de diferenciação da antera. Estágio 6, 35S::At2g42940 (A), Selvagem (B) e At2g42940-RNAi (C). Estágio 8, 35S::At2g42940 (E) e Selvagem (F). Barra = 0,25 μ m.

Fase de maturação. Estágio 12, 35S::At2g42940 (H), Selvagem (I) e At2g42940-RNAi (J) com características normais. En – Endotécio, Ep – Epiderme, GP - Grão de pólen, MMC – Célula mãe do microsporo, M - Microsporo, T – Tétrades, Tp – Tapete. Barra = 0,25 μ m.

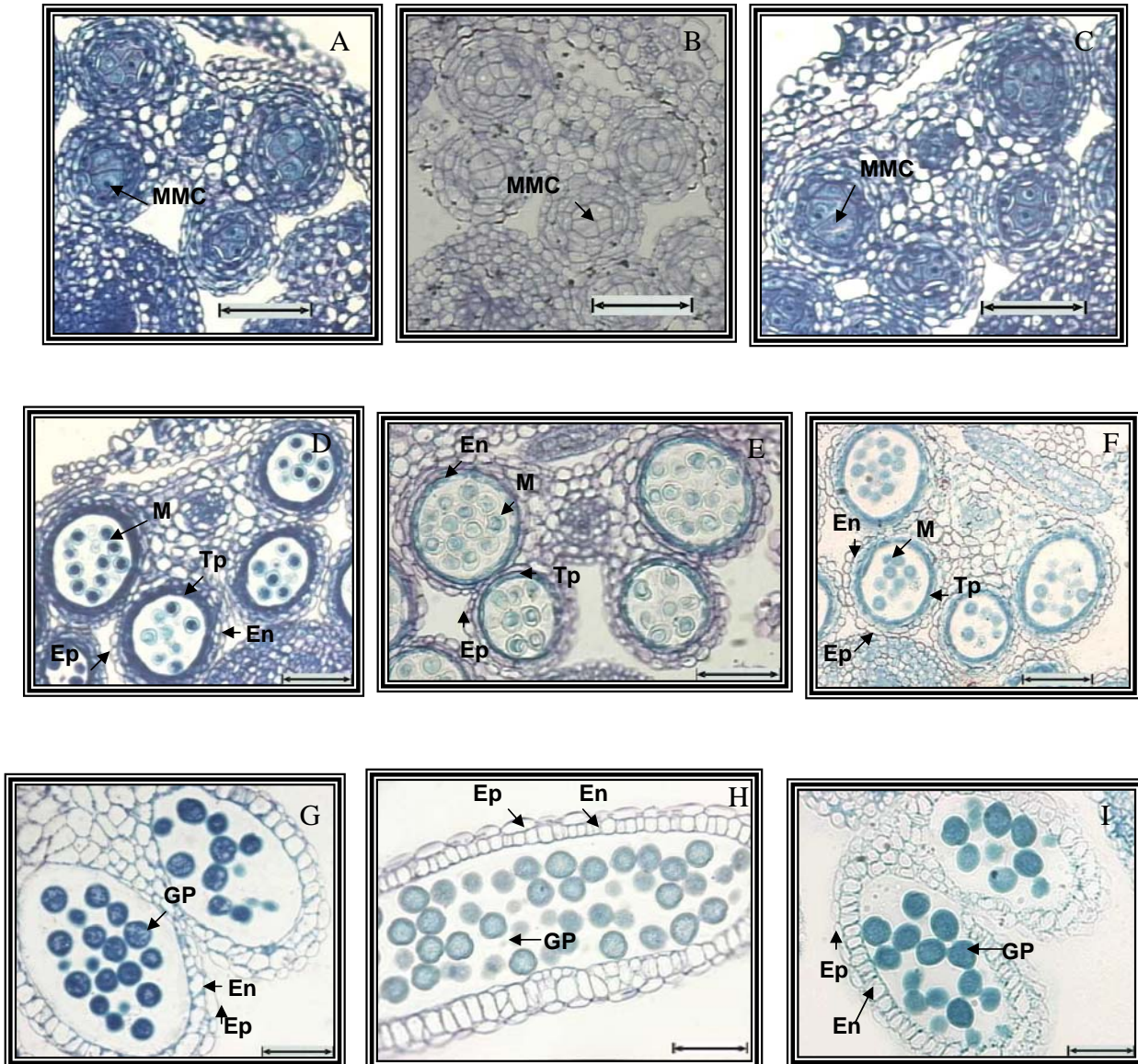
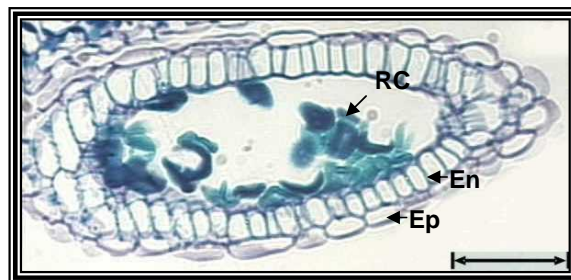
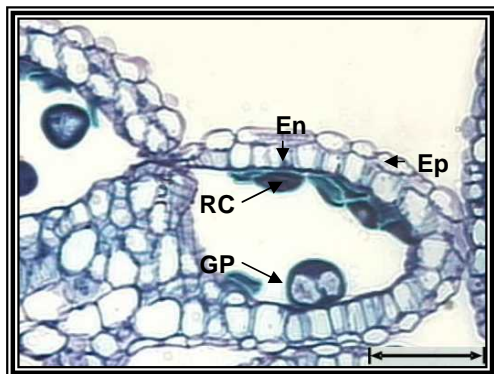
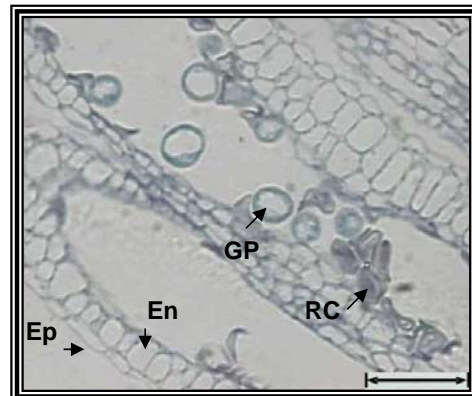
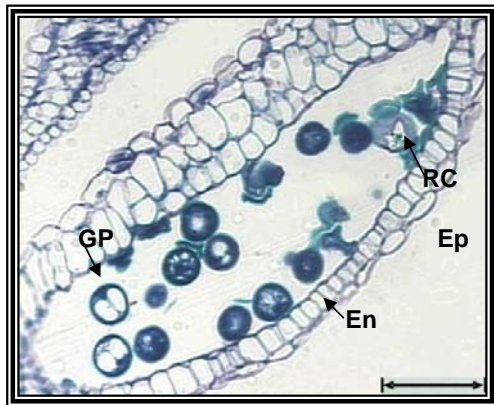
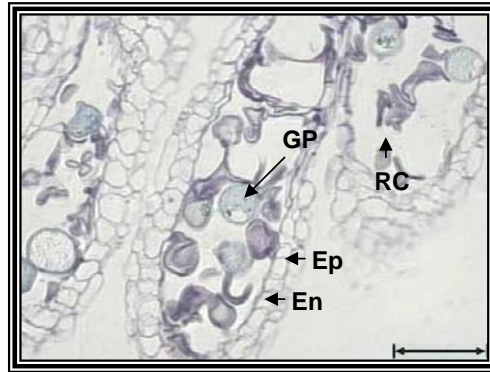
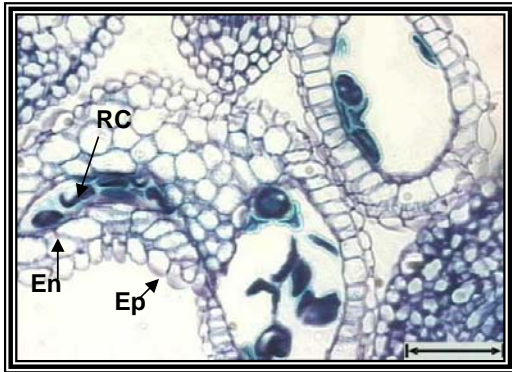


Figura 28 Análise anatômica das linhagens At2g42940-RNAi e Selvagem cultivadas sob as mesmas condições. Fase de maturação da antera. Seções transversais e/ou longitudinais das anteras At2g42940-RNAi com anatomia alterada. En – Endotécio, Ep – Epiderme, GP – Grão de pólen, RC – Restos celulares. Barra = 0,25 μ m.



DISCUSSÃO

Após o seqüenciamento do genoma da *A. thaliana*, o próximo desafio é entender a função e a interação de cada um dos genes que atuam durante o desenvolvimento da planta. A função de um determinado gene pode ser inferida por homologia a genes com funções conhecidas e caracterizada através de mutantes com perda de função, por mutagênese insercional. Entretanto, devido à falta de homologia com as seqüências já descritas, muitos genes codificam para proteínas cujas funções permanecem desconhecidas. Para entender a função destes genes são necessários experimentos mais detalhados em nível bioquímico e genético.

A identidade do estame é primeiramente estabelecida pelos genes MADS-box das classes B, C e E. Entretanto, muitos outros genes estão envolvidos na formação dos tecidos da antera. Acredita-se que os fatores transcricionais MADS-box possam ser responsáveis direta ou indiretamente pela ativação destes genes. Recentemente, foi mostrado que o gene *SPL/NZZ* é um dos alvos diretos do fator transcricional *AG* que pertence à família MADS-box (Ito *et al.*, 2004). Através dos experimentos de microarranjo, comparando o mutante homeótico *ap3-3* com o tipo selvagem, foi possível identificar genes específicos do estame (Alves-Ferreira *et al.*, 2002). Os genes *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940* encontram-se na lista dos genes identificados neste trabalho.

O gene *At1g27710* codifica uma proteína que não possui similaridade com qualquer outra proteína já caracterizada. O gene *At2g42940* possui similaridade com proteínas HMG pertencentes à família HMGA, porém a função da proteína codificada

por esse gene ainda é desconhecida. O gene *At1g12080* possui similaridade significativa com proteínas do tipo moesina. Esta família proteica é constituída por miosinas não convencionais que estão relacionadas com o fluxo citoplasmático envolvendo o movimento de organelas e o transporte de vesículas em mamíferos (Oliver *et al.*, 1999).

A estratégia de super-expressar ou silenciar genes tem sido utilizada rotineiramente na genética funcional de plantas, assim como em outros organismos modelo. Apesar de ser utilizado há muitos anos, só recentemente os mecanismos de como se processa o silenciamento gênico foram descobertos. Isso possibilitou o aprimoramento da estratégia para obtenção de plantas silenciadas por transgênese. Os vetores mais eficientes na indução do silenciamento gênico são os *ihpRNAs*. Em plantas, já foram descritas algumas construções com estes vetores utilizando fragmentos dos genes de interesse de tamanhos variados, 98 a 741 nucleotídeos, fornecendo 66% - 100% (em média 90%) de linhagens silenciadas. O fragmento utilizado como alvo para disparar o PTGS pode ser derivado da região codante, região 5' não traduzida ou 3' não traduzida do mRNA (Wesley *et al.*, 2001). Em mamíferos foram produzidos dsRNAs sintéticos com 21 - 25 nucleotídeos. Estes fragmentos foram suficientes para induzir o RNAi *in vitro* e *in vivo* em mamíferos (Elbashir *et al.*, 2001 a e b). Esse fato sugere que a região mínima com homologia entre o mRNA e a seqüência alvo capaz de disparar o PTGS possa ser de 21 - 25 nucleotídeos (Wang and Waterhouse, 2001; Wesley *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram utilizadas construções do tipo *ihpRNA* com o objetivo de induzir o PTGS para três genes de *A. thaliana*: *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940*. As seqüências nucleotídicas utilizadas foram provenientes das regiões codantes dos

mRNAs, os comprimentos das seqüências utilizadas foram 109, 180 e 150 nucleotídeos referentes aos mRNAs dos genes *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940*, respectivamente.

As observações morfológicas para as três construções utilizando o *ihpRNA* foram acompanhadas por três gerações. Ao passo que, a caracterização anatômica foi realizada apenas para as plantas na terceira geração. Recentemente, foi descrito que a transformação das plantas com *ihpRNA* fornece estabilidade do silenciamento sendo passada de geração a geração, por essa razão possibilitando o estudo contínuo do fenótipo (Stoutjesdijk *et al.*, 2002).

A principal característica do PTGS é conduzir a degradação específica do mRNA. Desta maneira, levando a redução nos níveis de mRNAs tanto do transgene introduzido como do gene endógeno da planta. A redução do nível do mRNA não é devida ao decréscimo da transcrição, mas sim da degradação do mRNA (revisado – Chicas and Macino, 2001).

A caracterização molecular das linhagens transformadas analisadas nesta dissertação foi realizada através de experimentos de *northern blot*. Na análise das linhagens referentes ao silenciamento dos genes *At1g12080* e *At1g27710* foi possível observar que todas as plantas apresentaram níveis inferiores dos mRNAs específicos quando comparado com tipo selvagem (Gráfico 5 e 6; Figura 21 e 22). Esta observação indica que a redução dos níveis de mRNA dos genes endógenos *At1g12080* e *At1g27710* é resultado do silenciamento gênico. Comparando as linhagens transgênicas silenciadas para o gene *At1g12080* foi possível observar que houve diferenças perceptíveis nos graus de silenciamento entre as diferentes linhagens. O mesmo foi observado para as linhagens silenciadas do gene

At1g27710. Estes resultados são compatíveis com os observados na literatura, como relatado para o gene *CHS* (*CHALCONE SYNTHASE*) de *A. thaliana* (Wesley *et al.*, 2001) e *Torenia hybrida* (Fukusaki *et al.*, 2004), onde é perceptível a diferença no nível de pigmentação entre as diferentes linhagens.

As linhagens transgênicas *At1g27710*-RNAi podem ser consideradas macho estéreis parciais. Estas linhagens apresentaram alterações anatômicas e fenotípicas quando comparadas com as linhagens tipo selvagem. Com relação às características anatômicas foi possível identificar anteras mal formadas estando completamente colapsadas ou apresentando, no interior do microsporângio, grãos de pólen juntamente com restos celulares. A alteração fenotípica observada está relacionada com a incapacidade do alongamento das síliquas, produzindo síliquas menores. O alongamento das síliquas é um indicativo do desenvolvimento normal da formação das sementes. Glover e colaboradores (1998) fizeram a distinção entre as plantas estéreis e parcialmente estéreis pelo comprimento das síliquas e pela produção de sementes. As plantas estéreis não produzem sementes e as síliquas não se desenvolvem. Nas plantas parcialmente estéreis o comprimento das síliquas e a produção de sementes são variáveis ao longo da inflorescência.

Os transcritos do gene *At1g27710* foram encontrados apenas nas células do tapete da antera, começando no estágio 6 e se prolongando até o estágio 7 do desenvolvimento da antera (Alves-Ferreira *et al.*, 2002). As células do tapete em *A. thaliana* são secretoras. O tapete é responsável por fornecer uma série de substâncias que além de serem importantes para o metabolismo do micrósporo é importante para formação do complexo da parede do pólen (Scott *et al.*, 2004 -

revisão). Já foi demonstrado que a degeneração pré-matura do tapete leva ao aborto dos micrósporos (Mariani *et al.*, 1990).

A redução do gene *At1g27710* nas plantas silenciadas pode estar levando a redução da fertilidade masculina através da inviabilidade dos grãos de pólen liberados na antese. Este fato possivelmente está correlacionado com a redução no tamanho das síliquas ao longo do eixo de inflorescência. Para confirmar esta hipótese é necessário realizar experimentos de germinação *in vitro* dos grãos de pólen e/ou marcação com o corante Alexander (Alexander, 1969) que permite a visualização diferencial de grãos de pólen viáveis e abortados.

A observação da redução na quantidade de grãos de pólen juntamente com restos celulares nas anteras das linhagens *At1g27710-RNAi* pode estar correlacionada com o aborto dos grãos de pólen e/ou degradação das células do tapete. As modificações moleculares nas células do tapete, devido a ausência do gene *At1g27710*, gera alterações no desenvolvimento da antera afetando o suprimento de nutrientes necessários para o correto desenvolvimento dos micrósporos. Resultados similares foram descritos para o gene *BnCBF-B* de *Brassica napus* (Lésque-Lemay *et al.*, 2003).

As linhagens transgênicas para super-expressão do cDNA At1g12080 não resultaram em nenhuma alteração fenotípica ou morfológica nas plantas. A análise molecular, através do *northern blot*, revelou a existência de uma única banda referente ao mRNA do gene no tipo selvagem compatível com o tamanho esperado. Entretanto, as linhagens transgênicas apresentaram duas bandas referentes aos mRNAs do gene *At1g12080*.

No momento da construção do vetor para super-expressão do cDNA At1g12080, apenas um mRNA estava predito. Este foi clonado a partir da síntese de cDNA de mRNA proveniente de flores. A seqüência de cDNA do gene *At1g12080* inserida no clone de entrada do sistema *GATEWAY™* foi analisada por seqüenciamento parcial. Posteriormente, o clone de expressão do sistema *GATEWAY™* foi analisado por padrão de restrição para a confirmação do inserto do cDNA do gene *At1g12080*. Em seguida, o clone de expressão foi transferido para o vetor binário de *A. tumefaciens*.

Atualmente, há dois cDNA correspondente ao gene *At1g12080* depositados no banco dados (<http://mips.gsf.de/>): (1) o cDNA de uma forma variante (forma variante 2), composto por três exons, porém entre o segundo e o terceiro exon há a presença um intron (Figura 29), e (2) o cDNA corresponde a uma forma diferencialmente processada (forma variante 1), sendo composto por três exons (Figura 29). Ambos mRNAs podem ser traduzidos normalmente podendo originar duas proteínas distintas uma possuindo 138 aminoácidos, referente ao mRNA de forma variante 2, e a outra possuindo 104 aminoácidos, referente ao mRNA diferencialmente processado (forma variante 1).

Na análise molecular foi observado que o mRNA referente a forma variante 1 do gene *At1g12080*, corresponde à banda de menor peso molecular, sendo a forma mais encontrada no tipo selvagem. O fato de não ter sido detectado o mRNA referente a forma variante 2 no tipo selvagem pode ser devido a baixa quantidade deste transcrito nas inflorescências, não sendo possível a detecção pelo *northern blot*.

Nas plantas transgênicas foram observados dois transcritos. A banda do mRNA de menor peso molecular possui, aproximadamente, 545 pb, sendo equivalente ao mRNA da forma variante 1 que possui 535 pb. A forma variante 2 possui 654 pb. Entretanto, a banda observada na análise molecular possui um tamanho maior do que o esperado sendo aproximadamente 1490 pb. Duas hipóteses podem ser formuladas: (1) Contaminação com DNA nas amostras das linhagens transgênicas. Porém, está hipótese não é consistente, uma vez que não foi observado no gel de agarose a presença da banda referente ao DNA genômico. Ainda que o DNA genômico tenha sido degradado seria improvável que apenas nas três linhagens transgênicas analisadas fosse encontrado uma banda equivalente a 1490 pb. (2) Recombinação ou rearranjo da construção 35S::At1g12080. A região referente ao cDNA inserida no vetor para a super-expressão poderia conter uma inserção de DNA genômico, ou talvez duas construções poderiam estar em tandem. Desta forma, o produto transcrito seria maior do que o esperado em comparação com os transcritos endógenos. Entretanto, esta hipótese também não parece plausível, pois seria improvável que o mesmo evento de recombinação ou rearranjo tenha ocorrido em três linhagens independentes de maneira similar gerando mRNAs de tamanhos equivalentes. Está idéia corrobora com o fato do vetor não favorecer

recombinação, pois nas outras construções analisadas não houve qualquer problema quanto ao tamanho do mRNA observado em comparação com o tamanho do mRNA esperado.

Os tamanhos dos transcritos foram inferidos a partir das bandas dos rRNAs, seria necessário utilizar marcadores de peso molecular para afirmar, com precisão, o tamanho do mRNA de maior peso molecular. Mediante estes fatos, não é possível afirmar qual o problema ocorrido nas linhagens transgênicas com a construção 35S::At1g12080.

Apesar da super-expressão deste mRNA aberrante nenhuma alteração foi observada nas plantas, este fato indica que a proteína gerada não interfere de forma significativa no desenvolvimento normal das plantas. Para saber se a proteína gerada a partir do mRNA da forma variante 1 causaria alguma alteração fenotípica teria que ser feita uma nova construção com este cDNA e o fenótipo avaliado. Por outro lado, a super-expressão do mRNA aberrante levou à repressão da expressão da forma variante 1 (Gráfico 4). Experimentos complementares precisam ser realizados para verificar qual é a razão desta observação. Porém, a ausência de efeitos fenotípicos observados nas plantas que super-expressam a forma aberrante do mRNA sugere que nas condições de crescimento testadas o nível de transcrito de cada uma das formas não interfere no desenvolvimento destas plantas.

Nas linhagens silenciadas para o gene *At1g12080* a única alteração fenotípica encontrada foi a redução do comprimento final das plantas (Gráfico 1). Aparentemente a ausência deste gene não influencia no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, nem na formação do pedicelo. O fato das plantas transgênicas apresentarem uma redução no comprimento final pode ser atribuído a duas causas:

(1) deficiência no alongamento celular levando a redução do comprimento das células formadoras do eixo de inflorescência, ou (2) deficiência na divisão celular gerando a redução da quantidade de células responsáveis pela formação do eixo de inflorescência. Para comprovar estas hipóteses seria necessário analisar o número ou tamanho das células das linhagens transgênicas e do tipo selvagem. Recentemente foi demonstrado que a interrupção do gene *MYA2* de *A. thaliana*, pertencente a classe das miosinas, prejudica o processo de desenvolvimento da planta (Holweg and Nick, 2004). Holweg e Nick relataram que as plantas mutantes, além de outros problemas, apresentaram pequeno porte. A medição das células epidermais do hipocótilo e do caule demonstraram que as células das plantas mutantes são menores do que no tipo selvagem, isto foi devido a deficiência no alongamento celular.

A proteína codificada pelo gene *At2g42940* faz parte de uma família relativamente abundante e comum de proteínas não histonas associadas à cromatina dos eucariotos, sendo denominadas de proteínas HMG (*high-mobility-group*) (Bustin *et al.*, 1990).

Baseadas nas características primárias as proteínas HMG de mamíferos foram divididas em três famílias distintas (Bustin *et al.*, 1990 - revisão). Recentemente, a nomenclatura das três famílias foi revisada (Bustin, 2001): (1) HMGA (HMG1/Y) que contem motivos A/T-hook de ligação ao DNA; (2) HMGB (HMG1/2) que contem domínios HMG-box; e (3) HMGN (HMG14/17) contendo domínios de ligação ao nucleossomo.

As proteínas HMGA pertencentes às plantas, como SB16A e PF1, de soja e arroz, respectivamente, possuem quatro cópias do motivo A/T-hook. A proteína PF1,

de aveia, possui três motivos A/T-hook (Grasser, 1995 - revisão). Entretanto, a proteína codificada pelo gene At2g42940 possui apenas dois motivos A/T-hook conservados. O motivo A/T-hook é uma curta seqüência de aminoácidos carregada positivamente possuindo a parte central invariante PRGRP (Grasser, 1995 - revisão). Além disso, as proteínas HMGA das plantas possuem um domínio N-terminal similar à região N-terminal do domínio globular da proteína histona H1 (Grasser, 1995 - revisão).

Estudos têm demonstrado que as proteínas HMGA interagem especificamente com regiões ricas em A/T que freqüentemente ocorrem nas regiões promotoras dos genes das plantas (Pedersen *et al.*, 1991; Nieto-Sotelo *e al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1997b; Webster *et al.*, 1997; Yamamoto and Minamikawa, 1997a; Martinez-Garcia and Quail, 1999; Zhao and Grafi, 2000; Zhang *et al.*, 2003a). As proteínas HMGA podem interagir com diferentes motivos A/T da dupla fita de DNA. Através da seleção randômica de oligonucleotídeos foi demonstrado que a proteína HMGA de ervilha liga-se a áreas do DNA ricas em A/T de 5 ou mais bases (Webster *et al.*, 2000). No mínimo 2 motivos A/T-hook são necessários para a ligação eficiente ao DNA (Nieto-Sotelo *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 1997; Martinez-Garcia and Quail, 1999; Zhang *et al.*, 2003a). Recentemente, um estudo detalhado na proteína HMGA de trigo demonstrou que os quatro motivos A/T-hook não contribuem igualmente com a ligação ao DNA (Zhang *et al.*, 2003a). As regiões que flanqueiam os motivos A/T-hook podem modular as propriedades de ligação ao DNA, e por este motivo podem ser responsáveis pelas diferentes ligações ao DNA de uma região individual do motivo A/T-hook (Zhang *et al.*, 2003a). Desta forma, os únicos dois motivos

conservados A/T-hook encontrados na proteína HMGA At2g42940 podem se ligar eficientemente ao DNA e desempenhar sua função.

Pelos nossos resultados foi possível observar que as plantas transgênicas super-expressando a proteína HGMA At2g42940 apresentaram uma maior quantidade de flores abertas e de botões florais fechados no ápice das inflorescências (Figura 19). Através da análise por *northern* também foi possível demonstrar que as inflorescências das plantas transgênicas apresentavam grande quantidade de transcritos (Gráfico 7). O ápice da inflorescência é constituído pelo meristema de inflorescência que é responsável, em última instância, por produzir os primórdios florais. O meristema de inflorescência é uma região que apresenta rápida divisão celular.

Ainda existem muito poucas informações sobre a expressão dos genes que codificam a proteína HMGA e quais seriam as prováveis funções desempenhadas por estas proteínas nas plantas. Em mamíferos já foi bem caracterizado que os genes HMGA possuem sua expressão induzida em células indiferenciadas, células proliferantes ou durante o desenvolvimento embrionário. Em células completamente diferenciadas ou células que não se dividem estes genes são expressos em baixos níveis (Reeves and Beckerbauer, 2001). Nas plantas tem sido relatada a expressão em vários tecidos distintos sugerindo que a proteína HMGA possua um papel regulatório ubíquo na expressão gênica (Gupta *et al.*, 1997a, b; Yamamoto and Minamikawa, 1997a, b; Zhang *et al.*, 2003b). Entretanto, estes estudos demonstraram que os níveis de expressão variam significativamente entre os diferentes tecidos. É provável que a expressão destes genes em plantas esteja correlacionada com a proliferação celular (Zhang *et al.*, 2003b; Gupta *et al.*, 1997b).

Foi demonstrada alta expressão da proteína HMG-I/Y de *A. thaliana* em siliquis e flores que correspondem a tecidos com rápida divisão celular (Gupta *et al.*, 1997b). Zhang e colaboradores (2003b) demonstraram a alta expressão da proteína HMGA de trigo na coifa da raiz, na bainha da folha e nas sementes em desenvolvimento onde a proliferação celular é alta. Entretanto, ainda não se sabe a estrita relação entre a expressão da proteína HMGA com a proliferação celular e o desenvolvimento. A super-expressão da proteína HMGA At2g42940 poderia modular a expressão de um grupo distinto de genes que estariam envolvidos com a proliferação celular e/ou transdução de sinal na especificação de uma maior quantidade de primórdio florais no meristema de inflorescência.

Nos eucariotos, geralmente vários reguladores transcricionais ligam-se a diferentes elementos da seqüência do DNA interagindo para formar complexas estruturas nucleoproteicas. Nestas estruturas nucleoproteicas múltiplos contatos proteína-proteína e proteína-DNA aumentam a especificidade e estabilidade dos complexos regulatórios. Durante a diferenciação dos tecidos, grupos específicos de genes podem ser ativados ou reprimidos. Isto é alcançado pela reunião de complexos nucleoproteicos tri-dimensional contendo vários fatores transcricionais ligados aos seus cognatos elementos promotores/enhancer, também conhecido como enhanceosomes (Tijan and Maniatis, 1994; Merika and Thanos, 2001). Por esta razão, um gene pode ser ativado por um enhanceosome apenas se todos os componentes do complexo final estiverem simultaneamente disponíveis. A correta reunião destes complexos multiproteicos de ligação ao DNA freqüentemente exigem a presença de fatores arquiteturais tais como as proteínas HMGA e HMGB que

podem modular a estrutura do DNA e/ou contribuir para interações proteicas dentro do complexo (revisado – Grasser, 2003).

No caso da indução do silenciamento do gene *At2g42940*, não foi possível demonstrar através da análise por *northern blot* que as plantas transformadas estavam devidamente silenciadas. Isto porque, não houve a detecção do mRNA do gene *At2g42940* no tipo selvagem. Possivelmente a quantidade do mRNA do gene *At2g42940* é muito baixa não podendo ser detectada por experimento de *northern blot*. As análises da expressão *in situ* demonstraram que os transcritos deste gene são expressos transitoriamente em um curto período de tempo nas células do tapete, especificamente no estágio 7 quando os micrósporos estão associados em tétrades. Após este estágio não há mais a detecção do transcrito (Alves-Ferreira *et al.*, 2002). Para confirmar o silenciamento do gene *At2g42940* seria necessário utilizar técnicas como o PCR em tempo real ou RT-PCR.

As plantas transgênicas para o silenciamento do gene *At2g42940* apresentaram alterações fenotípicas com alguns grupos de síliquas menores do que o tipo selvagem, indicando macho esterilidade parcial. As análises anatômicas revelaram a má formação das anteras maduras, que se mostraram colapsadas ou com restos celulares no interior do lóculo. Devido a esta proteína atuar como um possível regulador transcricional sua ausência poderia bloquear a expressão de genes que seriam necessários para a correta formação do tapete. A ausência da expressão no tapete e a conseqüente disfunção nesse tecido comprometeria o desenvolvimento dos grãos de pólen como já foi demonstrado para outros genes expressos no tapete (Lévesque-Lemay *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). A variabilidade no fenótipo poderia estar relacionada ao grau de

silenciamento obtido como já foi demonstrado em outras situações (Wesley et al., 2001; Fukusaki et al., 2004).

Figura 29 Região do DNA representando o gene *At1g12080*. As seqüências com letras maiúsculas em preto representam os exons. As seqüências com letras minúsculas e coloração cinza representam as regiões 5', regiões intrônicas e região 3'. A região sublinhada representa o intron que permanece no mRNA da forma variante 2.

```

1 aagcttctca aaaaacttct attgcatttc atttttttat ttatatgtaa aatataattt
61 aatttcctag ttgaaaattg ataaatctat tttttacaag taatggtaa gtggtgatgt
121 tctaaatcta tgtggcatga ggtgtaaaat tgtacattat ttttttatat aagcaaaaaa
181 ggttccttca tgtgcaatac tcatcatcat ggttccttat agaaattaat ttttttttta
241 atttatattt agtaaaacaa tttttttatt gtaaacatt tgcttctact ataaatcccc
301 ctctcttga tcaaatctct tcaactcatca aaacatcaca tacactattt ttctctctc
361 cttattgtct atatatTTTT cctcttttagc tttttcattt cgaaATGGCC ACCGTTGAGg
421 tattctctta attttgttgc tcgtcacatt ataaatctat atctataatt cattttcgtc
481 gttaatatta tccggaaatg attagttatc aaaatcttta caatatttat catgtatgat
541 tctatcaagt gagatggaac ggtatgcaat ttttccgttt aataatgtgt tttcgcttac
601 agTTGAACA AGTCACTCCA GTAGCAGTAG AGAACGTTGA GGTACCAACA AAGACAGTGG
661 AGGAGACAGT GGTGAGACA GAGgtgaccc aacagccgga agaatccgtc cccgcccgga
721 cagaacaaaa atccgaagca ccaattgtag aaacaaacga agaagtggtt gtggaagagg
781 cagagAAGAA AGATGAAGAA ACCGAGAAGA AACAGAGGA GAAAGACGAG AAGACAGAAG
841 TGATCACGGA AACTCCGTA GTTGGAGGAG AGGAGAAGAA AGCTGAGGAA GTGACCGAAA
901 CTCCGGCGGT TGTGGAGGAG GAGAAGAAGA CAGAGGTGGT TGAGGAGAAA CAGACTGAGG
961 TTGCGGCTGC TGAGGAAGTC GCCGTTGAGA AGGCCGAGGA GTAAagagga aggaagaagc
1021 tatatatgac ctttttttggc ctcatatcgt tttctgttta ttttatttta tcaacatttc
1081 ataagtattt tctatgtttg ttgggtttgt tatgatgaaa tcagatgttt ggatctttta
1141 atggttgcta cattgtttac atgcttggtc gtagcaacaa agtacaaaact taaaccgaga
1201 acatggaaga ttaaaaccgt ttatgtctac atgcaaaaaa ataaaaaatt acatcccttt
1261 ttctaaatat acaacataac attattcagt ttttcaaaaa aataagtaca gatgaaagtt
1321 ttcttaagag atactataag atcgtacatt tatttggaaac ttttcatatt aactgtaaac
1381 gttaacaata agacgagaga atctaataca tgaatataaa tattttgatc atttcatcaa
1441 agaggagtaa ttaagagaaa tttaaagagg tcaatccgtc aatgatgcaa tcttgagtgc
1501 aaaa

```

CONCLUSÕES FINAIS

Recentes evidências da formação de complexos multiproteicos dos quais as proteínas MADS-box fazem parte revelaram que essas proteínas podem atuar com grande flexibilidade na regulação de diversas funções, sendo importante nos mais variados processos relacionados ao desenvolvimento. O maior número de genes pertencente a esta família gênica pode ser encontrado em *A. thaliana*, pois com a conclusão do seqüenciamento de seu genoma foi possível a identificação de todos os prováveis genes.

Os genes MADS-box que foram melhor caracterizados são os envolvidos no desenvolvimento reprodutivo. Estes genes perfazem quase a totalidade dos envolvidos no modelo "ABCE" de identidade dos órgãos florais, que pode ser explicado pela ação combinada das quatro classes de genes. Desta maneira, determinando a identidade dos quatro órgãos florais. Além de atuar no desenvolvimento reprodutivo, já foram descritos genes MADS-box envolvidos no desenvolvimento vegetativo, como por exemplo, sendo expressos em raízes, folhas e embriões.

A identificação de genes ortólogos aos genes MADS-box em outras espécies de plantas ajudaria na compreensão da evolução das plantas, permitindo também entender como os mecanismos moleculares evoluíram no processo de diversificação observado em plantas.

Recentemente, foi realizado o projeto genoma de eucalipto (FORESTs), que teve por objetivo o seqüenciamento de cDNAs gerando ESTs que foram

depositados em um banco de dados. Este banco de dados estava disponível para os grupos interessados na identificação de genes. Nosso grupo, então, se propôs a identificar os genes MADS-box e inferir prováveis funções aos genes de eucaliptos.

O elevado número de leituras nas diversas bibliotecas dos diferentes tecidos, expostos a diversas condições, e os baixos níveis de redundância destas bibliotecas no projeto transcriptoma FORESTS contribuíram eficientemente na identificação e avaliação do padrão de expressão dos genes MADS-box *in silico*. Análises computacionais das ESTs dos genes MADS-box relacionados ao desenvolvimento reprodutivo e vegetativo revelaram alguns padrões de expressão interessantes. Estes padrões de expressão podem estar relacionados às funções desempenhadas pelos genes no controle da transcrição gênica durante o desenvolvimento da planta, na diferenciação dos tecidos e em condições de estresse.

Entre os 25 genes MADS-box identificados no banco de dados do FORESTS, 12 foram identificados como sendo expressos em botões florais, flores e frutos e 12 foram identificados como sendo expressos nos tecidos vegetativos, sendo que cinco foram expressos em madeira. A compreensão dos mecanismos moleculares desempenhados por proteínas MADS-box no crescimento, desenvolvimento e em condições de estresse pode fornecer importantes elementos no melhoramento do eucalipto para sua utilização na agroindústria. As análises genômicas realizadas no banco de dados do FORESTS, entretanto, precisam ser consideradas com cuidado. Estes estudos representam uma seleção preliminar dos genes contidos nas bibliotecas. Sugerimos as prováveis funções das proteínas MADS-box de eucaliptos com alusões a proteínas de outras espécies de plantas já caracterizadas. No entanto, se faz necessária a realização de

experimentos bioquímicos e moleculares para um maior detalhamento de cada um dos genes identificados.

Apesar do amplo conhecimento sobre as funções desempenhadas pelos genes MADS-box, ainda não está claro de que maneira estes fatores transcricionais participam do processo de formação dos tecidos florais. Uma das questões que permanecem sem resposta está relacionada ao desenvolvimento do estame. Ainda não se conhece os genes pertencentes às vias regulatórias da diferenciação dos tecidos do estame que são regulados pelo complexo transcricional *AP3/PI/AG/SEP3*. Este complexo é responsável em primeira instância por especificar a identidade do estame.

Recentemente, foi demonstrado que o fator transcricional MADS-box *AG* regula a expressão de *SPOROCYCLELESSNOZZLE*, um possível fator de transcrição expresso após a definição da identidade dos órgãos florais em *A. thaliana* (Ito *et al.*, 2004). Até o momento, este é o único artigo que demonstrou de forma inequívoca que um gene responsável pela identidade dos órgãos florais também atua na regulação da expressão de aspectos tardios do desenvolvimento dos órgãos florais. *SPL/NZZ* é um dos primeiros genes envolvidos no desenvolvimento das células arqueosporais (Yang *et al.*, 1999; Schiefthaler *et al.*, 1999). As células arqueosporais são as responsáveis pela formação dos tecidos formadores da antera.

Uma das maneiras de se identificar os possíveis genes alvos dos genes pertencentes a classe B (*AP3* e *PI*) é através da comparação entre os mutantes e o tipo selvagem utilizando a tecnologia microarranjo em conjunto com a coleta de estágios específicos de desenvolvimento. Com a utilização desta estratégia, Alves-Ferreira e colaboradores (2002) identificaram, em escala genômica, os genes que

são específica ou preferencialmente expressos em estames durante estágios iniciais de desenvolvimento. Genes expressos inicialmente no processo de desenvolvimento floral apresentam um maior potencial de serem alvos diretos de fatores transcricionais responsáveis pelo desenvolvimento floral. Apesar dessa ser apenas uma evidência circunstancial, a identificação desses genes pode revelar alvos mais prováveis da regulação direta por AP3-PI-AG-SEP3. Dentre os genes identificados que possivelmente seriam alvos do gene MADS-box AP3, encontram-se o *At1g12080*, *At1g27710* e *At1g42940*. Após as análises fenotípicas, anatômicas e moleculares realizadas para estes três genes foi possível concluir que:

(1) O silenciamento do gene *At1g27710* resultou em plantas macho estéreis parciais. Indicando que a redução na expressão do gene pode estar levando a redução da fertilidade masculina através da inviabilidade dos grãos de pólen. A redução da expressão do gene também pode gerar alterações no desenvolvimento do tapete. O mau funcionamento do tapete pode afetar o suprimento de nutrientes necessários para o correto desenvolvimento do micrósporo.

(2) A super-expressão do gene *At1g12080* não resultou em plantas com alterações morfológicas e fenotípicas. A análise molecular revelou a presença de uma banda de mRNA não esperada e a redução do nível do transcrito da forma variante 1. Entretanto, não houve qualquer interferência no desenvolvimento das plantas através da análise fenotípica realizada.

(3) O silenciamento do gene *At1g12080* resultou em plantas com redução do eixo de inflorescência da planta. Isso, talvez tenha sido devido a deficiência no alongamento celular ou na divisão celular das células do eixo da inflorescência. Experimentos adicionais precisam ser realizados para comprovar essa hipótese.

(4) A super-expressão da proteína HMGA At2g42940 resultou em uma maior quantidade de flores abertas e de botões florais fechados no ápice da inflorescência. Ao que indica, a super-expressão desta proteína poderia modular a expressão de um grupo distinto de genes envolvidos com a proliferação celular e/ou transdução de sinal na especificação de uma maior quantidade de primórdio florais.

(5)) Apesar de não ser possível a confirmação do silenciamento do gene *At2g42940*, as plantas foram analisadas anatomicamente e revelaram má formação da antera. Esse fato indica que essa proteína pode ser fundamental para o desenvolvimento do tapete, tecido onde o gene é expresso. Dados na literatura indicam que essa família de proteína está relacionada com controle transcricional (Grasser, 1995). Portanto a sua ausência poderia levar a um descontrole na expressão de genes necessários para a correta formação do tapete da antera. Desta forma, comprometendo o desenvolvimento dos grãos de pólen.

As análises realizadas nesta dissertação quanto as prováveis funções dos genes *At1g12080*, *At1g27710* e *At2g42940* foram preliminares. Experimentos complementares serão fundamentais não só em determinar o possível controle dos genes de identidade dos órgãos florais nos genes supracitados como também entender a função destas proteínas no desenvolvimento floral.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M.P.** (1969) Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Technol* 44: 117-122.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI BLAS: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burge, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. and Yanofsky, M.F.** (2000a) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24: 457-466.
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, Z., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C. and Ditta, G.S.** (2000b) An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 5328-5333.
- Alves-Ferreira, M.; Wellmer, F.; Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.** (2002) Identification of genes expressed in early stages of anther development of *Arabidopsis thaliana* using microarrays. XXXI Reunião Anual da SBBq, Caxambu, MG.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Becker, A., Kaufmann, K., Freialdenhonven, A., Vicent, C., Li, M.-A., Saedler, H. and Theißen, G.** (2002) A novel MADS-box gene subfamily with a sister-group relationship to class B floral homeotic genes. *Mol. Genet. Genomics* 266: 942-950.
- Becker, A. and Theißen, G.** (2003) The Major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol. Physiology. Evol.* 29: 464-489.
- Bhandari, N.N.** (1984) The microsporangium. In *Embryology of the Angiosperm* (ed. B.M. Johri) pp. 53-121. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Blázquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I. and Weigel, D.** (1997) *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3835-3844.

- Bowman, J.L., Smyth, D.R. and Meyerowitz, E.M.** (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20.
- Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, M.F. and Alvarez-Buylla, E.R.** (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214(3):365-72.
- Bustin, M.** (2001) Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci.* 26: 152-153.
- Bustin, M., Lehn, D.A. and Landsman, D.** (1990) Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochem. Biophys. Acta* 1049: 231-243.
- Canales, C., Bhatt, A.M., Scott, R. and Dickinson, H.** (2002) *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Current Virology* 12: 1718-1727.
- Carvalho, D. de.** (1988) Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura *in vitro* de segmentos nodais. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, Minas Gerais. Xiv + 79p.
- Chicas, A. and Macino, G.** (2001) Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO reports* 2 (11): 992-996.
- Church, G.M. and Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 81: 1991-1995.
- Coen, E.C., and Meyerowitz, E.M.** (1991) The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Cseke, L.J., Zheng, J., and Podila, G. K.** (2003) Characterization of PTM5 in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene* 318: 55-67.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. and Sommer H.** (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J.* 15 (16):4330-4343.
- Dawe, R.K. and Freeling, M.** (1992) The role of initial cells in maize anther morphogenesis. *Development* 116: 1077-1085.

- De Bodt, S., Raes, J., Florquin, K., Rombauts, S., Rouz, E. P., Theißen, G. and Van de Peer, Y.** (2003) Genome-wide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *J. Mol. Evol.* 56: 573-586.
- Decroocq, V. Zhu, X. KauVman M., Kyozyuka, J. Peacock, W.J., Dennis, E.S. and Llewellyn, D. J.** (1999) A TM3-like MADS-box gene from Eucalyptus expressed in both vegetative and reproductive tissues. *Gene* 228: 155-160.
- Doyle, J.J.** (1994) Evolution of a plant homeotic multigene family: towards connecting molecular systematics and molecular developmental genetics. *Syst. Biol.* 43: 307-328.
- Egea-Cortines, M., Saedler, M. and Sommer, H.** (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 18: 5370-5379.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D.** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95 (25):14863-14868.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T.** (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
- Fan, H.Y., Hu, Y., Tudor, M. and Ma H.** (1997) Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J.* 12 (5):999-1010.
- Ferrádiz, C., Liljegren, S.J. and Yanofsky, M.F.** (2000) Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* 289: 436-438.
- Ferrario, S., Immink, R.G.H. and Angenent, G.C.** (2004) Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 84-91.
- Feinbez, A.P. & Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.

- Flanagan, C. A., Hu, Y. and Ma, H.** (1996) Specific expression of the *AGL1* MADS-box gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. *Plant J.* 10: 343-353.
- Fukusaki, E., Kawasaki, K., Kajiyama, S. An, C., Suzuki, K., Tanaka, Y. and Kobayashi, A.** (2004) Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference. *Journal of Biotechnology* 111: 229-240.
- Garcia-Maroto F., Salamini F. and Rohde W.** (1993) Molecular cloning and expression patterns of three alleles of the Deficiens-homologous gene St-Deficiens from *Solanum tuberosum*. *Plant J.* 4(5):771-80.
- Garcia-Maroto, F., Ortega, N., Lozano, R. and Carmona, M.J.** (2000) Characterization of the potato MADS-box gene *STMADS16* and expression analysis in tobacco transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 42 (3): 499-513.
- Glover, J., Grelon, M., Craig, S., Chaudhury, A. and Dennis, E.** (1998) Cloning and characterization of *MS5* from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis. *The Plant Journal* 15 (3): 345-356.
- Goldberg, R.B., Beals, T. P., Sanders, P. M.** (1993) Anther development basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- Goto, K. and Meyerowitz, E.M.** (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* 8: 1548-1560.
- Grasser, K.D.** (1995) Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *The Plant Journal* 7 (2): 185-192.
- Grasser, K.D.** (2003) Chromatin-associated HMGA and HMGA proteins: versatile co-regulators of DNA-dependent process. *Plant Mol. Biol.* 53: 281-295.
- Graves, D.J.** (1999) Powerful tools for genetic analysis come of age. *Trends Biotechnol.* 17: 127-134.
- Grothge M. T.** (1992) Efeitos de várias fontes de nitrogênio na multiplicação "in vitro" de clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. T. MS. Piracicaba.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F. and Martienssen, R.** (1998) The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125: 1509-1517.

- Gupta, R., Webster, C.I. and Gray, J.C.** (1997a) The single-copy gene encoding high-mobility-group protein HMG-I/Y from pea contains a single intron and is expressed in all organs. *Plant Mol. Biol.* 35: 987-992.
- Gupta, R., Webster, C.I., Walker, A., and Gray, J.C.** (1997b) Chromosomal location and expression of the single-copy gene encoding high-group HMG-I/Y in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 34: 529-536.
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., Huijser, P.** (2000) Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 21: 351-360.
- Hayes, T.E., Sengupta, P. and Cochran, B.H.** (1988) The human c-fos serum response factor and the yeast factor GRM/PRTF have related DNA-binding specificities. *Genes Dev.* 2: 1713-1722.
- Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J. and Yanofsky, M.F.** (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3845-3853.
- Holweg, C. and Nick, P.** (2004) *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *PNAS* 101: 10488-10493.
- Honma, T. and Goto, K.** (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525-529.
- Huala, E. and Sussex, I.M.** (1993) Determination and cell interactions in reproductive meristems. *Plant Cell* 5: 1157-1165.
- Huang, H., Tudor, M., Weiss, C.A., Hu, Y. and Ma, H.** (1995) The *Arabidopsis* MADS-box gene *AGL3* is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 28: 549-567.
- Ito, T., Wellmer, F. Yu, H., Das, P., Ito, N., Alves-ferreira, M., Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (2004) The *Arabidopsis* homeotic selector protein *AGAMOUS* controls a gene essential for microsporogenesis. *Nature* 460: 356-360.
- Jack, T., Brockman, L.L. and Meyerowitz, E.M.** (1992) The homeotic gene *APELATA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68: 683-697.

- Kim, S.H., Mizuno, K. and Fujimura T.** (2002) Isolation of MADS-box genes from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) expressed specifically in vegetative tissues. *Plant Cell Physiol.* 43(3): 314-22.
- Köhler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Grisse, W. and Grossniklaus, U.** (2003) The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Dev.* 17: 1540-1553.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M. and Goldberg, R.B.** (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201-1224.
- Kramer, E.M., Dorit, R.L. and Irish, V.F.** (1998) Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics* 149: 765-783.
- Kramer, E.M. and Irish, V.F.** (2000) Evolution of the petal and stamen developmental programs: evidence from comparative studies of lower eudicots and basal angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 161: (6 Suppl.), S29-S40.
- Krizek B.A. and Meyerowitz, M.E.** (1996) The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 122: 11-22.
- Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. and Nei, N.** (2000) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0. Pennsylvania and Arizona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe, Arizona.
- Kyozuka, J., Harcourt, R., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (1997) Eucalyptus has functional equivalents of the *Arabidopsis* *AP1* gene. *Plant Mol Biol.* 35(5):573-84.
- Lévesque-Lemay, M., Albani, D., Aldecorn, D., Hammerlindl, J., Keler, W. and Robert, L.S.** (2003) Expression of CCAAT-binding factor antisense transcripts in reproductive tissues affects plant fertility. *Plant Cell Rep* 21: 804-808.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L. and Yanofsky, M.F.** (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Ma, H., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M.** (1991) *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* 5: 484-495.

- Mao, L., Begum, D., Chuang, H.W., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E. and Wing, R.A.** (2000) *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature*. 406: 910-913.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, M.F.** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360: 273-277.
- Mandel, M.A. and Yanofsky, M.F.** (1995) A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377: 273-524.
- Mariani, C., Debeuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B.** (1990) Induction of male-sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741.
- Martinez-Garcia, J.F. and Quail, P.H.** (1999) The HMG-I/Y protein PF1 stimulates binding of the transcriptional activator GT-2 to the *PHYA* gene promoter. *Plant J.* 18: 173-183.
- McComb J. A. & Bennett I. J.** (1986) Eucalyptus (Eucalyptus spp.) In: Bajaj, Y. P. S. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Tree I. Springer-Verlag. 340-362 p.
- Menzel, G., Apel, K. and Melzer, S.** (1996) Identification of two MADS box genes that are expressed in the apical meristem of the long-day plant *Sinapis alba* in transition to flowering. *Plant J.* 9(3): 399-408.
- Mephram & Lane** (1970) Observations on the fine structure and developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* 70: 1-20.
- Merika, M. and Thanos, D.** (2001) Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Cell. Biol.* 11: 205-208.
- Meyerowitz, E.M. and Somerville, C.R.** (1994) *Arabidopsis* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Michaels, S.D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Yanofsky, M. and Amasino, R.M.** (2003) *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *Plant J.* 33: 867-874.
- Misra, R.C.** (1962) Contribution to the embryology of *Arabidopsis thaliana* [Gay and Monn.] *Agra. Uni. J. Res. Sci.* 11: 191-199.

- Mizukami, Y. and Ma, H.** (1992) Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* 71: 119-131.
- Morelle, G.** (1988) A plasmid extraction procedure on miniprep scale. *Focus*: 11
- Murashige, T. & Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapide growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, A.J., Jenkins, G.I., Caboche, M. and Lepiniec, L.** (2002) The *TRANSPARENT TESTA16* locus encodes the *Arabidopsis* B SISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* 14: 2463–2479.
- Ng, M. and Yanofsky, M.** (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Ver. Gen.* 2: 186-195.
- Nieto-Sotelo, J., Ichida, A. and Quail, P. H.** (1994) PF1: na A-T hook containing DNA biding protein from rice that interacts with a functionally defined d(AT)-rich element in the oat phytochrome A3 gene promoter. *Plant Cell* 6: 287-301.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. and Treisman, R.** (1988) Isolation and properties of cDNA clones encodes SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum responsive element. *Cell* 55: 989-1003.
- Oliver, T.N., Berg, J.S. and Cheney, R.E.** (1999) Tails of unconventional myosins. *Cell. Mol. Life Sci.* 56: 243-257.
- Onouchi, H., Igeno, M.I., Perilleux, C., Graves, K. and Coupland, G.** (2000) Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell.* 12(6): 885-900.
- Owen, H.A. and Makaroff, C.A.** (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype Wassilewskja (Brassicaceae). *Protoplasma* 185: 7-21.
- Parenicová, L., Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. and Colombo, L.** (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: New openings to the MADS world. The *Plant Cell* 15: 1538-1551.

- Passamore, S., Maine, G.T., Elbe, R., Christ, C. and Tye, B-K.** (1988) Saccharomyces cerevisiae protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MATa cells. *J. Mol. Biol.* 204: 593-606.
- Pedersen, T.J., Arwood, L.J., Spiker, S., Gultinan, M.J. and Thompson, W.F.** (1991) High mobility group proteins bind to AT-rich tracts flanking plant genes. *Plant Mol. Biol.* 16: 95-104.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M.F.** (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.
- Pelaz, S.; Tapia-López, R., Alvarez-Buylla, E.R. and Yanofsky, M.F.** (2001) Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology* 11: 182-184.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegen, S.J., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M.F.** (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424: 85-88.
- Poething, S.** (1989) Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genetic.* 5: 273-277.
- Prakash, A.P. and Kumar, P.P.** (2002) *PkMADS1* is a novel MADS box gene regulating adventitious shoot induction and vegetative shoot development in *Paulownia kawakamii*. *Plant J.* 29(2):141-51.
- Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schidt, R.J. and Yanofsky, M.F.** (1995) Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* 140: 345-356.
- Ratcliffe, O.J., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E.S. and Bradley, D.J.** (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* 125: 1609-1615.
- Reeves, R. and Beckerbauer L.** (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1519: 13-29.
- Riechmann, J.L., Krizek, B.A. and Meyerowitz, E.M.** (1996) Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4793-4798.
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378: 1079-1101.

- Rounsley, S.D., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F.** (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 7: 1259-1269.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4 (4): 406-25.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. and Coupland, G.** (2000) Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613-1616.
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y-C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., Goldberg, R.B.** (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod.* 11: 297-322.
- Savidge, B., Rounsley, S. D. and Yanofsky, M. F.** (1995) Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* 7: 721-733.
- Schiefthaler, U., Balasubramanian, S., Sieber, P., Chevalier, D., Wisman, E. and Schneitz, K.** (1999) Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation in early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11664-11669.
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P.J., Hansen, R., Tetens, F., Lonning, W.E., Saedler, H. and Sommer, H.** (1992) Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* 11: 251-263.
- (Scion Corporation)** "The quantification of transcript levels was performed by measuring the band intensities by Scion Image program.
- Scott, R., Hodge, R., Paul, W. and Draper, J.** (1991) The molecular biology of anther differentiation. *Plant Sci.* 80: 167-191.
- Scott, R.J., Spielman, M. and Dickinson, H.G.** (2004) Stamen development. *The Plant Cell* 16: S46-S60.
- Shannon, S. and Meeks-Wagner, D.R.** (1993) Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 639-655.

- Shore, P. and Sharrocks, A.D.** (1995) The MADS-box family on transcriptional factors. *Eur. J. Biochem.* 229: 1-13.
- Sitnikova, T., Rzhetsky, A. and Nei M.** (1995) Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 12(2): 319-33.
- Skipper, M.** (2002) Genes from the APETALA3 and PISTILLATA lineages are expressed in developing vascular bundles of the tuberous rhizome, flowering stem and flower primordia of *Eranthis hyemalis*. *Annals of Botany* 89: 83-88.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. and Waterhouse, P.M.** (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 47: 319-320.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2: 755-797.
- Sommer, H., Beltrán, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lönning, W.-E., Saedler, H., Schwarz-Sommer, Z.** (1990) Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*. The protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 19: 605-613.
- Sorensen, A.M.-, Kröber, S., Unte, U.K., Huijser, P., Dekker, K. and Saedler, H. N.** (2003) The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. *The Plant Journal* 33: 413-423.
- Spurr, A.D.** (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electronic microscopy. *J. Ultrascrtruct Res.* 26: 31-43.
- Stevens, V.A. and Murray, B.G.** (1981) Studies on heteromorphic self-incompatibility systems: The cytochemistry and ultrstructure of the tapetum of *Primula obconica*. *J. Cell Sci.* 50: 419-431.
- Stoutjesdijk, P.A., Singh, S.P., Liu, Q.L., Hurlstone, C.J. Waterhouse, P.A. and Green, A.G.** (2002) hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* *Fad2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiology* 129: 1723-1731.
- Tandre K., Albert V.A., Sundas A. and Engstrom P.** (1995) Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Mol Biol.* 27(1): 69-78.
- Taylor, C.B.** (1997) Plant vegetative development: from seed and embryo to shoot and root. *Plant Cell:* 981-988.

- Tijan, R. and Maniatis, T.** (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.
- Theißen, G., Kim, J. and Saedler, H.** (1996) Classification of phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43: 484-516.
- Theißen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.-U. and Saedler, H.** (2000) A short history of MADS-genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 115-149.
- Theißen, G. and Saedler, H.** (2001) Floral quartets. *Nature* 409: 469-471.
- Theißen, G.** (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 75-85.
- von Goethe, J.W.** (1790) Versuch die metamorphose der pflanzen zu erklären. Gotha, Germany: C.W. Ettinger.
- Walden, A.R., Wang, D.Y. Walter, C. and Gardner, R. C.** (1998) A large family of TM3 MADS-box cDNAs in *Pinus radiata* includes two members with deletions of the conserved K domain. *Plant Sci.* 138: 167-176.
- Wang, M.B. and Waterhouse, P.M.** (2001) Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 146-150.
- Webster, C.I., Packman, L.C., Pwee, K.-H. and Gray, J.C.** (1997) High mobility group proteins HMG-1 and HMG-I/Y bind to a positive regulatory region of the pea plastocyanin gene. *Plant J.* 11: 403-715.
- Webster, C.I., Cooper, M.A., Packman, L.C., Williams, D.H. and Gray, J.C.** (2000) Kinetic analysis of high-mobility-group proteins HMG-1 and HMG-I/Y binding to cholesterol-tagged DNA on a supported lipid monolayer. *Nucl. Acids Res.* 28: 1618-1624.
- Weigel, D. Alvarez, J., Smyth, D.R. Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M.** (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69: 843-859.
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M. and Meyerowitz, E.M.** (2004) Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flower. *The Plant Cell* 16: 1314-1326.

- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. and Waterhouse, P.M.** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27 (6): 581-590.
- Wilson, Z.A., Morroll, S.M., Dawson, J., Swarup, R. and Tighe, P.J.** (2001) The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1 (MS1)* gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J.* 28: 27-39.
- Winter, K.U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. and Theissen, G.** (1999) MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (13):7342-7.
- Yamamoto, S. and Minamikawa, T.** (1997a) The high mobility group protein HMG-Y binds to promoter regions of seed storage protein genes from *Canavalia gladiata* D.C. *Plant Sci.* 124: 165-173.
- Yamamoto, S. and Minamikawa, T.** (1997b) Two genes for the high mobility group protein HMG-Y are present in the genome of *Canavalia gladiata*. *Plant Mol. Biol.* 33: 537-544.
- Yang, W.C., Ye, D., Xu, J. and Sundaresan, V.** (1999) The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Gene & Developmental* 13: 2108-2117.
- Yang, S.L., Xie, L.F., Mao, H.Z., Puah, C.S., Yang, W.C., Jiang, L., Sundaresan, V. and Ye, D.** (2003) *TAPETUM DETERMINANT 1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *The Plant Cell* 15: 2792-2804.
- Yanofsky, M.F., M.A., H., Bowman, J.L. Drews, G.N., Feldmann, K.A. and Meyerowitz, E.M.** (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-39.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F. and Meyerowitz, E.M. N** (2004) Repression of *AGAMOUS-LIKE 24* is a crucial step in promoting flower development. *Nat Genet.* 2004 36(2):157-61.
- Yu, H., Xu, Y., Tan, E.L., Kumar, P.P.** (2002) *AGAMOUS-LIKE 24*, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16336-16341.

- Zhang, H. and Forde, B.G.** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409.
- Zhang, H. and Forde, B.G.** (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51: 51–59.
- Zhang, W., Wu, Q., Pwee, K.-H., Jois, S.D.S. and Kini, R.M.** (2003a) Characterization of the interaction of wheat HMGA with linear and four-way junction DNA. *Biochemistry* 42: 6596-6607.
- Zhang, W., Wu, Q., Pwee, K.-H. and Kini, R.M.** (2003b) Interaction of wheat high-mobility-group proteins with four-way-junction DNA and characterization of the structure and expression of HMGA gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 409: 357-366.
- Zhao, D.Z., Wang, G.-F., Speal, B. and Ma, H.** (2002) The *EXCESS MICROSPOROCTE1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev.* 16: 2021-2031.
- Zhao, J. and Grafi, G.** (2000) The high mobility group I/Y protein is hypophosphorylated in endoreduplicating maize endosperm cells and is involved in alleviating histone H1-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 275: 27494-27499.