



**Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde – CCS
Instituto de Biologia - IB
Departamento de Genética
Curso de Pós-Graduação em Genética**

*Análise molecular e morfológica de um
mutante de Arabidopsis thaliana com o
desenvolvimento foliar e radicular alterados*

Aluna: Graça C. Gomes Rocha

Curso: Doutorado

Orientador: Dr. Márcio Alves Ferreira

Co-Orientadora: Dra. Márcia Pinheiro Margis

Rio de Janeiro, RJ

2005

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde – CCS
Instituto de Biologia - IB
Departamento de Genética
Curso de Pós-Graduação em Genética

*Análise molecular e morfológica de um mutante de
Arabidopsis thaliana com o desenvolvimento foliar e
radicular alterados*

Aluna: Graça C. Gomes Rocha
Curso: Doutorado
Orientador: Márcio Alves Ferreira
Co-Orientadora: Márcia Pinheiro Margis

Rio de Janeiro, RJ
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Graça Celeste Gomes

Análise molecular e morfológica de um mutante de *Arabidopsis thaliana* com o desenvolvimento foliar e radicular alterados.

Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biologia, Departamento de Genética, 2005.

Orientador: Márcio Alves-Ferreira

Co-orientador: Márcia Pinheiro-Margis

Tese: Doutor em Genética

1. *Arabidopsis thaliana*
2. Caracterização gênica
3. Caracterização molecular
4. Caracterização fenotípica
5. Função
6. Padrão de Expressão

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Márcio Alves-Ferreira e co-orientação da Prof.^a Márcia Pinheiro-Margis, com recursos do conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Márcio A. Ferreira pela oportunidade, orientação, confiança, apoio e paciência em todos os momentos.

À Prof.^a Márcia Pinheiro-Margis pela co-orientação e ajuda.

À Dra. Janice de Almeida-Engler pela colaboração para realização do experimento de hibridização *in situ*.

Ao Dr. Elliot Meyerowitz e ao Dr. Venugopala Reddy Conehal pela colaboração e fornecimento das linhagens transformadas com a construção *35S::GAL4-VP16 UAS::GFP*.

Ao Pablo e Mariana pela amizade, pelas conversas e pela ajuda incalculável em muitas etapas desta tese.

Ao Régis pela alegria e solicitude permanentes.

À Larissa, Claudia, e Lina pela ajuda, sempre que necessária.

À Bia, Isabel e Fátima pelo apoio nos momentos difíceis, e pelas conversas e risadas.

A todos os amigos do LGMV pelo convívio alegre e pacífico, e pela ajuda sempre que necessária.

Aos professores do LGMV pelo esforço para manter o bom funcionamento do laboratório.

Aos meus amigos queridos Samara, Val, Dan e João pela amizade sincera e pelo apoio em todas as minhas decisões, mesmo à distância.

À minha família, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio incessante e pelo amor dedicado.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a caracterização da linhagem mutante chamada *Aquitã* (*aqt*) em *Arabidopsis thaliana*. Foi inserido um T-DNA 200 pb abaixo do códon de início do gene hipotético *At1g55430*, resultando em uma mutação nula. O T-DNA apresenta a fusão UAS::GFP controlada pelo gene GAL4-VP16, o que permite a identificação direta de linhagens transgênicas primárias expressando GFP e o padrão espacial de expressão. A caracterização do perfil de expressão de *At1g55430* feita através de hibridização *in situ* e análise das linhagens transgênicas heterozigotas expressando GFP mostrou uma expressão transiente no meristema apical caulinar, nas estípulas, nas células do sistema vascular de folhas em desenvolvimento, inflorescências e raízes. Foi observada uma forte expressão restrita às células da epiderme da raiz, zonas de divisão e alongamento celular, pêlos radiculares, e meristema apical das raízes laterais. Também foi observada a expressão de *At1g55430* durante o desenvolvimento embrionário. Os sítios de expressão do *At1g55430* coincidem em grande parte com os sítios de síntese e com a rota de transporte de auxina, o que indica uma possível participação de *At1g55430* na via sinalização e/ou percepção da auxina em *A.thaliana*. Mutantes *aqt* apresentam má formação dos feixes vasculares em cotilédones e folhas; aumento no número de folhas; aumento na quantidade de feixes de xilema e floema em eixos de inflorescência; redução no tamanho global da planta; perda da dominância apical; aumento no comprimento e diâmetro da raiz principal e um número reduzido de raízes laterais. A raiz principal de mutantes *aqt* apresenta um aumento no número de camadas da periderme e do floema. As características fenotípicas observadas no mutante *aqt* também indicam que o gene *At1g55430* pode estar envolvido com as vias de sinalização e/ou percepção da auxina. A provável região promotora de *At1g55430* (1877 pb acima do ATG) foi fusionada aos genes repórter GFP e GUS (p430::GFP-GUS) e o padrão de expressão de GUS foi avaliado nas linhagens transgênicas. O padrão de expressão observado nas linhagens p430::GFP-GUS sobrepôs parcialmente o padrão de expressão observado por GFP e hibridização *in situ*. Portanto, a região de 1877 pb possivelmente não apresenta todos os elementos *cis* reguladores necessários para a expressão esperada de *At1g55430*. Também foram analisadas plantas transgênicas para super expressão e silenciamento deste gene. Resultados preliminares mostraram que a super expressão de *At1g55430* pode ser parcialmente letal e causa graves problemas no desenvolvimento das raízes. O gene *At1g55430* codifica uma proteína que possui de 2 a 8 domínios DC1 e que faz parte de uma pequena família gênica com 7 prováveis membros no genoma de *A.thaliana*. Pelo que sabemos apenas uma proteína com este domínio foi estudada, a ULI3. Resultados indicam que ULI3 está envolvido na transdução de sinal mediado por UV-B. Nossos resultados indicam fortemente a associação da proteína *At1g55430* com a percepção e/ou sinalização da auxina. A identificação e caracterização de *At1g55430*, uma nova proteína envolvida com a via de sinalização por auxina com características únicas, pode revelar aspectos relevantes da atividade da auxina e pode ajudar a elucidar o papel desta nova família de proteínas no desenvolvimento vegetal.

ABSTRACT

In the present work we report the characterization of a mutant insertion line called *Aquitã* (*aqt*) in *Arabidopsis thaliana*. The T-DNA insertion is placed 200bp downstream from the start codon of the hypothetical gene *At1g55430*, resulting in a null mutation. The T-DNA contains the fusion UAS::GFP controlled by GAL4-VP16 gene, which allows the direct identification of primary transgenic lines expressing GFP and the spatial expression pattern. The characterization of *At1g55430* expression patterns by in situ hybridization and by analysis of heterozygous transgenic lines expressing GFP showed a transient expression in the shoot apical meristem, stipules, vascular system cells of leaves in development, inflorescences and roots. It was observed a strong expression in the epidermal cells of roots, division and elongation cellular zones, root hairs, and apical meristem of lateral roots. It was also observed *At1g55430* expression in embryonic development. The expression sites of *At1g55430* mostly coincide with the synthesis sites and with the auxin transport route, indicating a possible participation of *At1g55430* in the auxin signalling and/or perception pathways in *A. thaliana*. The mutant *aqt* presents abnormal vascular strands in cotyledons and leaves; a higher number of leaves; increased number of xylem and phloem strands in inflorescence stems; reduction in the global size of the plant; loss of apical dominance; longer and thicker main roots and a reduced number of lateral roots. The main root of *aqt* mutants presents an increased number of periderm and phloem layers. The phenotypic characterization of *aqt* mutant also indicates that the *At1g55430* gene might be involved with auxin signaling and/or perception pathways. The putative promoter region of *At1g55430* (1877 pb upstream the ATG) was fused to GFP and GUS reporter genes (p430::GFP-GUS) and GUS expression patterns were evaluated in transgenic lines. The expression pattern observed in the p430::GFP-GUS lines partially overlaps of the expression pattern observed by GFP and in situ hybridization. Therefore, the 1877 pb upstream region possibly does not contain all cis regulators elements necessary for the expected expression of *At1g55430*. We also analyzed transgenic plants for over expression and silencing of this gene. Preliminary results showed that the over-expression of *At1g55430* may be partially lethal and causes severe problems to root development. The *At1g55430* gene encodes a protein containing two to eight DC1 domains and it is part of a small gene family in the *A. thaliana* genome with putative 7 members. By our knowledge, only one protein with these domain have been studied until now, ULI3. Published results indicate that ULI3 is involved in the UV-B mediated signal transduction. Our results strongly indicate the association of *At1g55430* protein to auxin perception and/or signaling. The identification and functional characterization of *At1g55430*, a new protein involved with auxin signalling pathway with unique characteristics, can reveal relevant aspects of auxin action and also help to elucidate the function of this new protein family in the plant development.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4-D	- ácido 2,4-diclorofenoxiacético
35S CaMV	- promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
A	- adenina
ABA	- ácido abscísico
<i>aqt</i>	- <i>Aquitã</i>
Arg	- arginina
Asn	- asparagina
ATP	- 5'-trifosfato de adenosina
Basta®	- glifosinato de amônio
BLAST	- do inglês " <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool"
BR	- brassinosteróide
BSA	- soro albumina bovina
°C	- grau Celsius
C	- citosina
CaMV	- vírus do mosaico da couve-flor (do inglês " <u>c</u> auliflower <u>m</u> osaic <u>v</u> irus")
cDNA	- DNA complementar
cm	- centímetro
CTAB	- brometo de cetiltrimetilamônio
Cys	- cisteína
DAG	- diacilglicerol
DNA	- ácido desoxiribonucléico
DNase	- desoxirribonuclease
dNTP	- deoxiribonucleotídeos trifosfato
ddNTP	- di-deoxiribonucleotídeos trifosfato
DO _{600nm}	- densidade ótica à 600 nm
DTT	- dithiothreitol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EMS	- etil metil sulfonato
G	- guanina
g	- grama (s)
<i>g</i>	- gravidade
GFP	- do inglês " <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein"
Glu	- ácido glutâmico (glutamato)
Gly	- glicina
GUS	- β-glucoronidase
IAA	- do inglês " <u>i</u> ndole-3- <u>a</u> cetic <u>a</u> cid"

IBA	- do inglês "indole <u>b</u> utyric <u>a</u> cid"
Ile	- isoleucina
kb	- quilobase (s)
KDa	- do inglês "kilo Dalton"
kV	- quilovolts
L	- litro (s)
Leu	- leucina
Lys	- lisina
M	- Molar (concentração)
MAC	- <u>m</u> eristema <u>a</u> pical <u>c</u> aulinar
MAR	- <u>m</u> eristema <u>a</u> pical <u>r</u> adicular
Met	- metionina
mg	- miligrama (s)
MilliQ	- água destilada deionizada e estéril por filtragem a 0,2 µm
mL	- mililitro (s)
mM	- milimolar
MOPS	- ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico
mRNA	- RNA mensageiro
MS	- meio de cultura definido por Murashige & Skoog (1962)
N	- Normal
N-term	- amino-terminal
NaCl	- cloreto de sódio
NCBI	- do inglês "National <u>C</u> enter for <u>B</u> io te chnology <u>I</u> nformation"
ng	- nanograma (s)
nm	- nanômetro (s)
NPA	- ácido 1-N-naftiltalâmico
<i>NPTII</i>	- gene da neomicina fosfotransferase
pb	- pares de bases
PCR	- reação de polimerização em cadeia
Pfam	- do inglês "Protein family"
Pro	- prolina
PVP	- polivinilpirrolidone
RNA	- ácido ribonucléico
RNase	- ribonuclease
RNAi	- RNA interferência
rpm	- rotações por minutos
rRNA	- RNA ribossomal
RT-PCR	- do inglês "reverse <u>t</u> ranscriptase <u>p</u> olimerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction")

SDS	- dodecil sulfato de sódio
Ser	- serina
T	- timina
T-DNA	- DNA de transferência
TAIL-PCR	- do inglês "Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction"
<i>Taq</i>	- DNA polymerase da bacteria <i>Thermus aquaticus</i>
Thr	- treonina
TIBA	- ácido 2,3,5-triodobenzoico
Tris	- tris (hidroximetil) aminometano
U	- unidade (s)
<i>UAS</i>	- do inglês "upstream activating sequence"
UV	- radiação ultra-violeta
v/v	- volume por volume
X-gluc	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucoronideo cicloexilamina
μF	- microFaraday
μg	- micrograma (s)
μL	- microlitro (s)
μM	- micro molar
μm	- micrômetro (s)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>Página</i>
Figura 1: Esquema do estabelecimento do plano corporal de <i>A. thaliana</i> durante o desenvolvimento embrionário	07
Figura 2: Esquema ilustrativo das prováveis funções dos genes <i>ACL1</i> , <i>AN</i> e <i>ROT3</i> durante a expansão das células das folhas de <i>A. thaliana</i>	12
Figura 3: Padrão dos tecidos observados na raiz de <i>Arabidopsis</i>	16
Figura 4: Esquema ilustrativo do modelo proposto para especificação de células epidérmicas em <i>Arabidopsis</i>	20
Figura 5: Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento durante a formação da raiz lateral em <i>Arabidopsis</i>	22
Figura 6: Formação do padrão vascular em folhas e a importância da canalização do fluxo de auxina	29
Figura 7: Padrão vascular do mutante <i>cov1</i> de <i>Arabidopsis</i>	33
Figura 8: Sistema 35S::GAL4-VP16 UAS::mGFP	36
Figura 9: Comparação entre o padrão vascular de folhas de plantas do tipo selvagem e mutante <i>aqt</i> de <i>A. thaliana</i>	38
Figura 10: Seqüência do gene <i>At1g55430</i>	41
Figura 11: Estrutura detalhada da proteína <i>At1g55430</i>	42
Figura 12: Alinhamento das proteínas da família gênica obtido pelo programa ClustalW	43
Figura 13: Representação esquemática da localização dos genes <i>At1g55380</i> , <i>At1g55390</i> , <i>At1g55410</i> , <i>At1g55420</i> , <i>At1g55430</i> , <i>At1g55440</i> e <i>At5g42280</i>	44
Figura 14: Análise do mutante <i>aqt</i> por microscopia de contraste interferencial e epifluorescente	47
Figura 15: Análise do mutante <i>aqt</i> por microscopia confocal	48
Figura 16: Níveis de expressão do mRNA <i>At1g55430</i> em raízes de <i>A. thaliana</i>	49
Figura 17: Análise de expressão do gene <i>At1g55430</i> usando RT-PCR e PCR em tempo real	50
Figura 18: Representação esquemática das construções usadas para estudos de bloqueio de expressão, superexpressão, e padrão de expressão do promotor do gene <i>At1g55430</i>	53

	<i>Página</i>
Figura 19: Autoradiografia do experimento de Southern blot de plantas tipo selvagem e mutante <i>aqt</i> e diagrama do sitio de inserção do T-DNA no gene <i>At1g55430</i>	76
Figura 20: Fenótipo da parte aérea de plantas <i>aqt</i> durante o desenvolvimento	80
Figura 21: Folhas de plantas <i>aqt</i> e tipo selvagem clareadas com lactofenol para melhor visualização do padrão vascular	82
Figura 22: Cotilédones de plântulas tipo selvagem e <i>aqt</i> com duas semanas, clareadas com lactofenol para melhor visualização do padrão vascular	83
Figura 23: Seções transversais de eixos da inflorescência de plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> coradas com azul do toluidina	87
Figura 24: Micrografias de raízes intactas de plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> em microscopia de contraste interferencial	89
Figura 25: Micrografias de raízes intactas de plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> em microscopia de contraste interferencial	91
Figura 26: Cortes transversais de raízes de plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> 14 dias após a germinação	93
Figura 27: Micrografias de seções transversais de raízes de plantas do tipo selvagem e <i>aqt</i> emblocadas em resina e coradas com azul de toluidina	94
Figura 28: Fenótipo de plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> crescidas em meio MS suplementado com auxina	96
Figura 29: Diagrama da organização da região do cromossomo 1 contendo o gene <i>At1g55430</i> e seus parálogos e padrão de expressão fornecido pela construção <i>p430::GUS</i>	99
Figura 30: Alinhamento da região mais divergente nas proteínas da família gênica obtido pelo programa ClustalW	101
Figura 31: Perfil eletroforético do produto de RT-PCR obtido com os iniciadores específicos para amplificar o gene <i>At1gg5430</i>	104
Figura 32: Análise por Northern blot do acúmulo de transcritos <i>At1g55430</i>	106
Figura 33: Fenótipo de plantas <i>35S::At1g55430</i> e <i>aqt</i> crescidas em placas por quatro semanas	108
Figura 34: Comparação entre a rota de transporte de auxina em raízes de <i>A. thaliana</i> e o perfil de expressão do gene <i>At1g55430</i>	138

	<i>Página</i>
Figura 35: Esquema da localização das proteínas <i>AXR3</i> e <i>SHY2</i> na raiz de <i>A. thaliana</i>	140
Figura 36: Comparação entre os locais de acúmulo de auxina e o padrão de expressão de <i>At1g55430</i> em embriões	148
Gráfico 1: Número de folhas observado em plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> com 45 dias após a germinação	78
Gráfico 2: Comprimento do eixo de inflorescência de plantas tipo selvagem e <i>aqt</i> crescidas por 45 dias em terra	79
Gráfico 3: Análise quantitativa da complexidade de venação em cotilédones de plântulas tipo selvagem e <i>aqt</i>	83
Tabela 1: Análise do tempo de emissão do eixo de inflorescência	79
Tabela 2: Análise da complexidade do padrão vascular de folhas: medida do número total de pontos de ramificação	84
Tabela 3: Comprimento de raízes de plantas <i>aqt</i> e tipo selvagem	88
Tabela 4: Análise fenotípica preliminar de plantas <i>35S::At1g55430</i>	107
Tabela 5: Análise fenotípica preliminar de plantas <i>RNAi::At1g55430</i>	109
Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene <i>At1g55430</i>	111

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
<i>Resumo</i>	<i>vi</i>
<i>Abstract</i>	<i>vii</i>
Lista de Abreviaturas	<i>viii</i>
Lista de Ilustrações	<i>xi</i>
	<i>Página</i>
INTRODUÇÃO	01
1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo no estudo do desenvolvimento.	01
2. Desenvolvimento embrionário	03
3. Desenvolvimento foliar	08
3.1. Análise genética do desenvolvimento da folha	09
4. Morfogênese de raiz	15
4.1. Desenvolvimento da raiz lateral	21
5. Desenvolvimento do sistema vascular	24
6. Indução e caracterização de novos genes	34
7. Identificação e caracterização parcial de um mutante no desenvolvimento foliar utilizando o sistema <i>35S::GAL4-VP16 UAS::GFP</i>	37
7.1. Perfil de expressão do <i>At1g55430</i>	45
8. Obtenção de construções para estudo do padrão de expressão e da função do gene <i>At1g55430</i>	51
OBJETIVOS	54
MATERIAL E MÉTODOS	56
1. Meios de cultura	56
2. Organismos e condições de cultivo	56
2.1. Linhagens bacterianas	56
2.2. Material vegetal	57
4. Métodos para análises de ácidos nucléicos	57
3.1. Extração e Purificação de DNA plasmidial	57
3.2. Eletroforese de ácidos nucléicos	58
3.3. Digestão com enzimas de restrição	59
3.4. Purificação de DNA a partir de gel de agarose	59
4. Métodos para cultivo e transformação de bactérias	60
4.1. Preparo de células competentes de <i>E.coli</i> , linhagem XL1, para eletrotransformação	60

4.2.	Preparo de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> para eletroporação	60
4.3.	Transformação de bactérias por eletroporação	61
4.4.	Preparação de células de <i>A. tumefaciens</i> competentes para transformação por choque-térmico	61
4.5.	Transformação de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico	62
5.	Métodos para cultivo e transformação de plantas	62
5.1.	Condições de cultivo	62
5.2.	Transformação genética de <i>A. thaliana</i> via floral dip	64
5.3.	Cruzamento manual	65
5.4.	Seleção <i>in vitro</i> de plantas transformadas	65
6.	Métodos para análise fenotípica das plantas transgênicas	66
6.1.	Análise fenotípica do sistema aéreo	66
6.2.	Análise fenotípica do sistema radicular	66
7.	Análise histológica das plantas	67
7.1.	Fixação de material para microscopia	67
8.	Métodos para análise molecular das plantas transformadas	68
8.1.	Análise do padrão de segregação do transgene	68
8.2.	Extração de DNA genômico de <i>A. thaliana</i>	68
8.3.	Extração de RNA de <i>Arabidopsis</i>	69
8.4.	Análise por <i>Southern blot</i>	69
8.5.	Análise por <i>Northern blot</i>	70
8.6.	Obtenção de sondas	70
8.7.	Preparo de sonda radioativa	71
8.8.	Hibridização	72
8.9.	RT-PCR	72
9.	Deteção histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase	73
10.	Ensaio de resposta à auxina	73
11.	Programas de computador utilizados	74
RESULTADOS		75
1.	Análise de segregação doT-DNA na linhagem mutante <i>aqt</i>	75
2.	Análise da integração do DNA pela técnica de <i>Southern Blot</i>	75
3.	Caracterização fenotípica do sistema aéreo das plantas mutantes <i>aqt</i>	77
4.	Caracterização do padrão vascular de folhas e cotilédones	81
4.1.	Padrão vascular de folhas	81
4.2.	Análise da complexidade do padrão vascular dos cotilédones	81
4.3.	Análise da complexidade vascular de folhas	84
5.	Análise histológica dos eixos de inflorescência de plantas <i>aqt</i>	85

6.	Caracterização fenotípica do sistema radicular das plantas <i>aqt</i>	88
6.1.	Morfologia e complexidade do sistema radicular	88
6.2.	Análise histológica das raízes de plantas <i>aqt</i>	92
7.	Análise de sensibilidade da planta <i>aqt</i> ao hormônio auxina	95
8.	Análise do padrão de expressão do gene <i>At1g55430</i> a partir da fusão da região regulatória 5' com o gene marcador <i>GUS</i>	97
9.	Efeito fenotípico do silenciamento e da super expressão do gene <i>At1g55430</i>	100
9.1.	Caracterização das plantas transgênicas através de análise de segregação.	102
9.2.	Análise molecular das plantas transgênicas	102
9.2.1.	Análise por RT-PCR	103
9.2.2.	Análise por <i>Northern blot</i>	105
9.3.	Caracterização fenotípica das plantas transgênicas	107
10.	Análise das seqüências promotoras dos genes	110
	DISCUSSÃO	117
1.	Análise do perfil de expressão do gene <i>At1g55430</i>	117
2.	Caracterização do sistema aéreo de plantas mutantes <i>aqt</i>	120
3.	Caracterização do sistema radicular das plantas mutantes <i>aqt</i>	133
4.	A importância do transporte polar de auxina durante a embriogênese	146
5.	Avaliação do efeito da super expressão e do bloqueio da expressão do gene <i>At1g55430</i> em <i>A. thaliana</i>	150
6.	Interação entre auxina e lipídios	151
7.	Possível função <i>versus</i> estrutura protéica de <i>At1g55430</i>	154
	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	157
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
	ANEXOS	180
1.	Artigo publicado durante o doutorado:	181
	<u>Rocha, G.C.G</u> ; Nicolich, R.; Romero, A.; Margis-Pinheiro, M.; Attias, M. e Alves-Ferreira, M. (2003). Effect of <i>Urtica dioica</i> agglutinin and <i>Arabidopsis thaliana</i> Chia4 chitinase on the protozoan <i>Phytomonas françai</i> . FEMS Microbiology Letters, 226 (1):1-7	
2.	Artigo aceito para publicação:	189
	<u>Rocha, G.C.G</u> ; Corrêa, R.L.; Borges, A.C.N.; Sá, C.B.P. e Alves-Ferreira, M. Identification and characterization of homeobox genes in eucalyptus. Genetics and Molecular Biology.	



INTRODUÇÃO

1. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo no estudo do desenvolvimento

Arabidopsis thaliana é uma dicotiledônea anual que pertence à família das Brassicaceae. É uma espécie aparentada da mostarda, encontrada principalmente em regiões de clima temperado (Meyerowitz e Somerville, 1994). Por apresentar uma série de vantagens para a pesquisa em biologia vegetal, a *A.thaliana* se tornou um modelo para o estudo. Além de ser de pequeno porte, fácil cultivo, produzir um grande número de descendentes, possuir um rápido ciclo de vida e um genoma relativamente pequeno, foi o primeiro vegetal a ter seu genoma totalmente seqüenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Além disso, a manutenção das linhagens é simples, já que a planta é autógama, e suas sementes permanecem viáveis durante vários anos.

Seu uso como modelo de estudo também é facilitado pela possibilidade de obtenção de mutantes através de métodos de mutagênese física (raios-X), química (metanosulfato de etilo – EMS) e insercional (T-DNA, transposons). Além disso, vários métodos para inserção de T-DNA mediados por *Agrobacterium tumefaciens* já foram bem estabelecidos (revisado por Walden, 2002 e Bent, 2000) possibilitando a obtenção de uma ampla coleção de mutantes, o que facilita a clonagem e a caracterização de muitos genes.

O genoma de *A.thaliana* apresenta 125 Mb divididos em cinco cromossomos. Contem 28.952 genes codificando proteínas identificadas em 11 mil famílias (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). A distância média entre os genes de *A.thaliana* é de 4,6 kb. O conhecimento da seqüência genômica vem facilitando a identificação e a determinação do papel de genes presentes no genoma de *A.thaliana*. Apesar de seu pequeno genoma, *A.thaliana* apresenta as características típicas de outras angiospermas no que se refere à morfologia, anatomia, crescimento, desenvolvimento e respostas ao

ambiente. Desta forma, os resultados das investigações em *A.thaliana* podem ser potencialmente aplicados a qualquer outra angiosperma.

Os processos de desenvolvimento em vegetais apresentam uma série de características únicas entre organismos multicelulares tais como: A produção de esporos por meiose e de gametas por mitose; os principais eventos de formação de órgãos ocorrem continuamente depois da embriogênese a partir de meristemas; e as células diferenciadas são totipotentes, permitindo a obtenção de uma planta madura e fértil a partir de qualquer parte de um indivíduo adulto. Estas características são em parte resultado da especialização ao hábito sésstil onde a plasticidade em resposta a variação ambiental é um pré-requisito à sobrevivência.

Dentre as áreas em que o estudo da *A.thaliana* tem contribuído de forma considerável para o entendimento dos processos de desenvolvimento e diferenciação celular em plantas estão a análise do desenvolvimento embrionário, foliar, floral, radicular, dos tricomas e do sistema vascular (Weijers e Jüngers, 2005; Fleming, 2005; Teale *et al.*, 2005; Szymanski *et al.*, 2000; Fukuda, 2004; Jack, 2001). A simplicidade estrutural do sistema radicular de *A.thaliana* faz deste um sistema ideal para a análise de processos envolvidos com o desenvolvimento. A identificação de genes que regulam os processos de crescimento radicular e formação de pêlos radiculares merece especial atenção, uma vez que as raízes estão envolvidas nos processos de fixação da planta, absorção de água com sais minerais, transporte e armazenamento de substâncias de reserva. As folhas, por sua vez, são órgãos com funções importantes para o desenvolvimento e sobrevivência de qualquer planta, e seus tecidos fotossintéticos necessitam ser bem providos por feixes vasculares. Apesar disto, os processos de regulação da morfogênese foliar, de formação dos feixes vasculares e da relação entre eles, ainda não estão totalmente elucidados (Tsukaya, 2003; Berleth *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2000; Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999).

Através da análise genética do desenvolvimento é possível responder a questões relacionadas com as diferenças entre indivíduos do tipo selvagem e mutante. O isolamento e a caracterização de mutantes apresentando anormalidades em genes

envolvidos no estabelecimento do padrão vascular, na regulação da morfogênese foliar, e no desenvolvimento de raízes, pode contribuir para o melhor entendimento destes mecanismos.

Assim, nas próximas seções serão apresentadas, de forma sucinta, algumas informações importantes a respeito dos principais processos do desenvolvimento em *A.thaliana*, bem como de alguns genes envolvidos nestes processos, que permitirá uma avaliação do estado atual do conhecimento nas áreas envolvidas no desenvolvimento desta tese.

2. Desenvolvimento embrionário

O plano básico de organização corporal do indivíduo adulto se manifesta no embrião, onde se distingue um padrão apical-basal, ao longo do eixo principal do embrião, e um padrão radial, que resulta na ordenação concêntrica dos tecidos primários: a epiderme na periferia e os tecidos centrais e condutores no centro (Laux e Jungers, 1997).

O desenvolvimento embrionário em *A.thaliana* é caracterizado por padrões definidos de divisões celulares, que levam a formação de embriões nos estágios globular, cordiforme, de torpedo e de maturação, sucessivamente.

A primeira divisão do zigoto é assimétrica, e resulta em duas células filhas de diferentes tamanhos e destinos (figura 1). A célula apical, menor, dará origem a maior parte do embrião, e a célula basal dará origem ao suspensor. Foi visto que a expressão do gene *GNOM* (*GN*) nesta fase é importante para o estabelecimento da polaridade apical-basal, uma vez que mutações neste gene levam a uma redução no alongamento do zigoto e a uma divisão quase simétrica (Mayer *et al.*, 1993). Nestes mutantes, contudo, a célula basal continua gerando um suspensor, ainda que de tamanho inferior ao normal, e a apical, um embrião no qual se observam divisões irregulares.

O eixo apical-basal do embrião é constituído por cinco elementos, que se manifestam progressivamente: o meristema apical caulinar, os cotilédones, o hipocótilo, a radícula e o meristema radicular. Em primeiro lugar, as divisões transversais que ocorrem no embrião com quatro células produzem duas camadas, a superior e a inferior, cada uma delas com quatro células (estágio octante – figura 1B). A camada superior dará origem ao domínio apical, que compreende o meristema apical e a maior parte dos cotilédones, e a camada inferior dará origem ao domínio central, ao qual pertencem a base dos cotilédones, o hipocótilo, a raiz e as células iniciais proximais do meristema radicular. O resto do meristema radicular, o centro quiescente e as células iniciais da coifa são derivados da hipófise, que tem sua origem na célula basal da primeira divisão zigótica (Scheres *et al.*, 1994). A existência destes domínios pode ser comprovada pela análise dos mutantes *monopteros* (*mp*) e *gurke* (*gk*). Mutações no gene *MP* resultam em plântulas com ausência de hipocótilo e raiz, e com defeitos na vascularização dos cotilédones (Berleth e Jürgens, 1993). Assim, o gene *MP* é necessário para formação da raiz primária embrionária, bem como para o desenvolvimento vascular. Por outro lado, mutantes *gurke* (*gk*) apresentam alterações específicas do domínio apical, tais como ausência de cotilédones e do meristema apical (Kajiwara *et al.*, 2004; Torres-Ruiz *et al.*, 1996). O fato da raiz, do meristema de raiz e do padrão radial serem normais neste mutante, indica que o gene *GK* atua especificamente na organização da região apical do embrião.

Os primeiros indícios da formação dos cotilédones são algumas divisões localizadas nos flancos do domínio apical do embrião no estágio globular tardio (Berleth e Chatfield, 2002). A separação do domínio apical em uma zona central, que formará o meristema apical, e uma zona circundante, que dará lugar aos cotilédones, pode ser visto no estágio globular tardio graças aos padrões de expressão complementares dos genes *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) e *AINTEGUMENTA* (*ANT*). A expressão destes genes é associada com o meristema caulinar e os primórdios de órgãos, respectivamente. Foi visto que o gene *STM* começa a ser expresso nas células que formaram o meristema apical da parte aérea, e continua ativo no meristema ao longo de todo o ciclo de vida da

planta, atuando na supressão da diferenciação das células do meristema apical do caule (MAC) (Long *et al.*, 1996; Lincoln *et al.*, 1994). Já o gene *ANT* é expresso nas regiões onde aparecem os cotilédones (Elliot *et al.*, 1996). Foi proposto que *ANT* atua regulando a proliferação celular e o crescimento do órgão pela manutenção da competência meristemática das células durante a organogênese (Mizukami *et al.*, 2000).

Durante o estágio cordiforme continuam ocorrendo divisões celulares, que levam a formação de projeções em duas regiões em cada lado do futuro ápice da parte aérea (figura 1 D). Mais tarde, durante o estágio de torpedo, estas projeções darão origem aos cotilédones e à simetria bilateral do embrião.

Os meristemas primários, aéreo e radicular, se estabelecem em pólos opostos do eixo apical-basal do embrião. O meristema caulinar começa a distinguir-se histologicamente dos tecidos circundantes que originarão os primórdios dos cotilédones no estado de torpedo (Barton e Poethig, 1993). Seu desenvolvimento pode ser perturbado por mutações em vários genes, entre eles o *WUSCHEL* (*WUS*), que codifica um fator transcricional tipo homeobox, que atua regulando o caráter indeterminado das células iniciais (Laux *et al.*, 1996). Plantas com a mutação *wus*, apesar de não apresentarem um meristema apical ou de suas células tronco serem consumidas após terem formado algumas folhas, apresentam cotilédones normais, o que indica a existência de controles genéticos independentes para o desenvolvimentos destes órgãos e do meristema caulinar.

O meristema de raiz consta de duas camadas de células iniciais que aparecem rodeando o centro quiescente (Dolan *et al.*, 1993). As camadas situadas acima e abaixo do centro quiescente se dividem contribuindo para formação dos tecidos da raiz e da coifa, respectivamente. Assim, o centro quiescente e as células iniciais da coifa derivam da hipófise, no domínio basal do embrião. Ao contrário, as células iniciais para o resto dos tecidos da raiz procedem da camada inferior do domínio central, que tem sua origem na célula apical do zigoto.

O outro eixo que aparece durante do desenvolvimento embrionário é o radial, que se manifesta na existência de camadas concêntricas de tecido. A primeira etapa da formação deste eixo é a divisão tangencial que ocorre no estágio globular de oito células, que separa a camada externa ou protoderme das células internas (figura 1 B e C). A protoderme dará lugar a epiderme através de divisões anticlinais (com o plano de divisão perpendicular a superfície), enquanto que as células internas darão origem ao tecido fundamental e aos elementos vasculares (Laux e Jürgens, 1997). São conhecidas várias mutações que alteram o padrão radial do embrião e afetam o domínio central. Estudos mostraram que mutações nos genes *SCARECROW* (*SCR*) e *SHORT ROOT* (*SHR*) levam a produção de raízes com uma única camada de tecido fundamental. Em mutantes *scr* as células pertencentes a esta camada apresentam uma identidade mista e demonstram características tanto de células endodérmicas, quanto de células corticais, indicando que o gene *SCR* é necessário para divisão da célula inicial (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Já em mutantes *shr* esta única camada de tecido fundamental apresenta características de células corticais e ausência de características endodérmicas, indicando que *SHR* é necessário para especificar a identidade da endoderme (Scheres *et al.*, 1995).

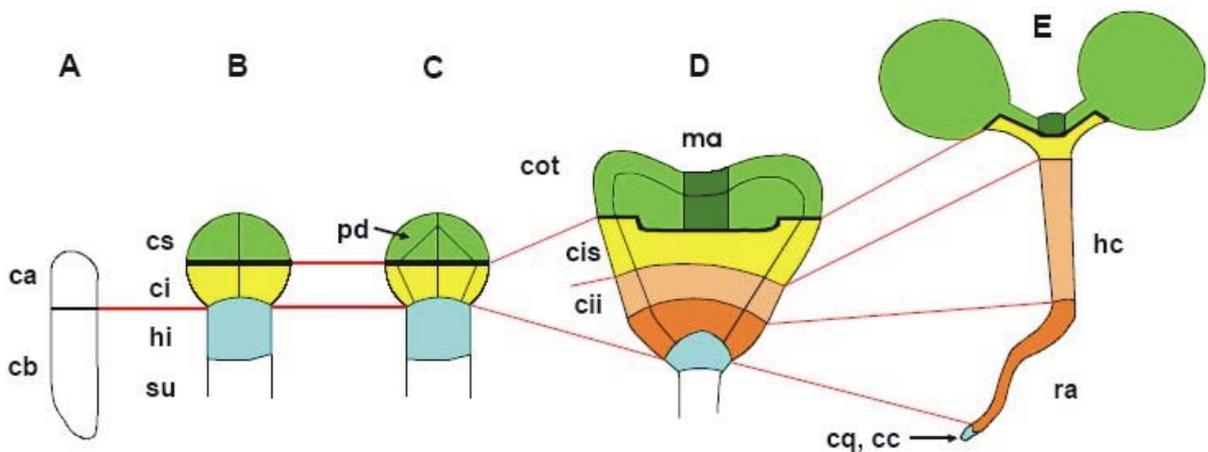


Figura 1: Esquema do estabelecimento do plano corporal de *A. thaliana* durante o desenvolvimento embrionário. (A) Embrião no estágio de duas células (ca: célula apical; cb: célula basal). (B-C) Embrião no estágio globular (cs: camada superior; ci: camada inferior; hi: hipófise; su: suspensor; pd: protoderme). (D) Embrião no estágio cordiforme (cot: cotilédones; ma: meristema apical; cis: camada interna superior; cii: camada interna inferior). (E) Plântula (hc: hipocótilo; ra: raiz; cc: coifa; cq: centro quiescente). As linhas vermelhas indicam as relações entre as linhagens celulares das regiões do embrião em desenvolvimento e da plântula. Os desenhos não estão em escala. Esquema retirado de Laux e Jurgens (1997).

3. Desenvolvimento foliar

As folhas possuem uma grande variação em sua forma, que é regulada tanto genética como ambientalmente. Ela pode ser definida como um órgão lateral determinado, i.e., de crescimento limitado, que se desenvolve a partir de um caule. Possui dorsoventralidade, não está acompanhado por nenhum outro órgão em sua face abaxial e apresenta habitualmente uma gema lateral na base de sua face adaxial (Tsukaya, 1995).

Os cotilédones, apesar de apresentarem as mesmas características, têm uma origem distinta. Eles são originados dos tecidos embrionários e não do meristema apical caulinar (MAC). Isto pode ser confirmado com os indivíduos mutantes *shoot meristemless* (*stm*) e *wuschel* (*wus*), que apresentam os cotilédones normais, apesar de não possuírem um MAC (Barton e Poethig, 1993; Laux *et al.*, 1996).

Todavia, folhas e cotilédones compartilham alguns sistemas reguladores básicos, como demonstra a existência de mutações que afetam igualmente folhas e cotilédones, como no mutante *angustifolia* (*an*), que faz com que ambos sejam mais estreitos que o habitual (Tsuge *et al.*, 1996; Tsukaya, 1995). Outras mutações, como *leafy cotyledons* (*lec*), provocam o aparecimento de traços foliares nos cotilédones, como a ausência de proteínas de reserva, a diferenciação de tricomas e a intolerância a dissecação (Tsukaya, 2000; Meinke, 1992).

Uma característica importante das folhas é sua simetria dorsoventral, ou seja, as faces adaxial e abaxial são morfológica e anatomicamente diferentes. A folha de *A. thaliana* é composta por uma epiderme uniestratificada nas faces adaxial e abaxial, e cinco camadas de tecido interno. Estas últimas são compostas por uma camada de parênquima paliçádico, situada abaixo da face adaxial da epiderme, que consta de células colunares, alinhadas com seu maior eixo orientado em ângulo reto com a epiderme. Entre elas e a face abaxial da epiderme se localizam cerca de quatro camadas de parênquima lacunoso (ou esponjoso), composto por células irregulares e pequenas, com

grandes espaços de ar entre elas. Os tecidos vasculares se situam dentro do mesófilo lacunoso (Telfer e Poethig, 1994).

3.1. Análise genética do desenvolvimento da folha

Os processos envolvidos no desenvolvimento foliar envolvem a iniciação do primórdio foliar e o estabelecimento da sua polaridade dorso-ventral (Dengler e Tsukaya, 2001). As folhas aparecem a intervalos regulares de tempo, em posições preditas e regularmente espaçadas, na periferia do MAC, gerando um padrão de órgãos laterais conhecido como filotaxia (Steeves e Sussex, 1989).

A primeira evidência morfológica da iniciação foliar é uma mudança na orientação das divisões celulares na protoderme e nas camadas internas do MAC (células fundadoras da folha) (Steeves e Sussex, 1989). À nível molecular, o primeiro sinal da iniciação foliar é a mudança nos níveis de atividade dos genes *KNOX* de classe 1 (Wyrykowska e Fleming, 2003; Kerstetter *et al.*, 1994), que são expressos em todo o meristema exceto no primórdio foliar. Os genes *KNOX* atuam mantendo a característica indeterminada das células do MAC (Byrne *et al.*, 2002; Vollbrecht *et al.*, 2000). Assim, a ausência de sua expressão nas células fundadoras do primórdio foliar é necessária para uma iniciação adequada da folha (Byrne *et al.*, 2002; Vollbrecht *et al.*, 2000). Ao contrário, a expressão ectópica destes genes leva ao surgimento de características indeterminada em folhas, tais como o surgimento de meristemas ectópicos e mudanças drásticas na forma das folhas (Sentoku *et al.*, 2000; Chuck *et al.*, 1996).

A filotaxia ou padrão de iniciação foliar é outra das características mais estudadas no desenvolvimento da folha. Entre os padrões típicos de filotaxia conhecido estão: o dístico (ou alterno), com uma única folha em cada nó, dispostas em duas fileiras opostas; o helicoidal (em espiral) com uma folha em cada nó e as folhas formando um padrão helicoidal em torno do caule; o verticilado, com três ou mais folhas em cada nó; e o decussado, no qual se inicia um par de folhas simultaneamente e com um ângulo reto com relação ao par anterior (Raven *et al.*, 1999). Foram propostos vários modelos para

explicar como se determinam os sítios de iniciação das folhas (Fleming, 2005; Benková *et al.*, 2003; Tsukaya, 2003; Reinhardt, 2003; Dengler e Tsukaya, 2001; Pozzi *et al.*, 2001; Smith e Hake, 1992). As mutações *clavata1 (clv1)*, *fasciata1 (fas1)* e *fasciata2 (fas2)* em *A.thaliana* causam uma filotaxia irregular, além da fasciação e bifurcação do caule (Leyser e Furner, 1992). Também nestes casos se constata um aumento do tamanho do meristema apical.

Vários genes envolvidos no processo de desenvolvimento foliar já foram identificados. Foi visto que genes das famílias *YABBY (YAB)* e *KANADI (KAN)*, que são expressos nas regiões abaxiais das folhas, estão envolvidos na regulação da identidade abaxial do primórdio foliar (Kerstetter *et al.*, 2001; Siegfried *et al.*, 1999). Além disto, foi proposto que a expressão dos genes *PHANTASTICA (PHAN)* e *PHABULOSA (PHV)* é necessária para a especificação da identidade adaxial (dorsal) e que, provavelmente, a diferenciação do limbo tem como pré-requisito a justaposição de células com características dorsais e ventrais (McConnell e Barton, 1998; Waites e Hudson, 1995).

Após sua iniciação, o primórdio foliar se expande lateralmente para formar o limbo, que se inicia a partir de um grupo de células meristemáticas localizadas nas margens do primórdio (Poethig e Sussex, 1985). A expansão e o aumento no comprimento da folha ocorrem principalmente pela divisão e crescimento celular através do limbo.

Na natureza existe uma grande diversidade na forma das folhas, devida fundamentalmente a variações no grau de expansão dentro do plano do limbo (Tsuge *et al.*, 1996; Dolan e Poethig, 1991). Além disso, dentro da mesma planta podem aparecer folhas com diferentes formas (heteroblastia), o que parece estar relacionado com mudanças no MAC e com influencias hormonais. Durante o desenvolvimento da folha se constata, além da expansão celular, um aumento no número de suas células, tanto na direção longitudinal quanto na transversal, porém não na espessura do órgão. Por outro lado, a expansão celular é observada nas três direções (Fleming, 2003).

Os fenótipos das mutações em *ANGUSTIFOLIA (AN)* e *ROTUNDIFOLIA (ROT)* evidenciam a relação destes genes com os processos de expansão celular (figura 2) (Tsuge *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998, 1999). O mutante *angustifolia (an)* apresenta folhas e cotilédones estreitos, porém com um comprimento normal (Tsuge *et al.*, 1996). Este mutante também apresenta um número total de células nas folhas semelhante ao encontrado no tipo selvagem, porém elas se alongam menos que o normal na direção transversal do órgão e mais que o normal na direção dorsoventral (Tsuge *et al.*, 1996). Assim, o gene *AN* parece atuar na regulação do alongamento polar das células da folha, especificamente na largura da folha (figura 2). Já as mutações *rotundifolia (rot)* causam um encurtamento da folha, fazendo com que a planta apresente pecíolo, folhas e órgãos florais mais curtos que os do tipo selvagem (Tsuge *et al.*, 1996). O mutante *rot* também apresenta os primórdios foliares semelhantes aos do tipo selvagem. O fenótipo destes mutantes é devido a uma redução no tamanho das células na direção longitudinal, e não a redução no número de células (figura 2). Estudos mostram que indivíduos duplo mutantes *an rot* apresentam os efeitos fenotípicos de ambas as mutações de forma aditiva, apresentando folhas curtas, estreitas e espessas, o que indica que estes genes atuam de forma independente (Tsuge *et al.*, 1996). Já os mutantes *acaulis1 (acl1)* apresentam folhas vegetativas pequenas, retorcidas e que tendem a se curvar para baixo, devido aparentemente a uma interrupção na expansão celular em todas as direções, que ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento foliar (figura 2). No entanto, o número de camadas celulares é aumentado (Tsukaya *et al.*, 1993).

Foi visto também que a expressão de genes *KNOX* na margem da folha parece conferir um potencial organogenético prolongado a esta região. Desta forma, o padrão de expressão espacial e temporal dos genes *KNOX* está relacionado com as diferentes formas apresentadas pelas folhas (Tsiantis e Hay, 2003; Fleming, 2003).

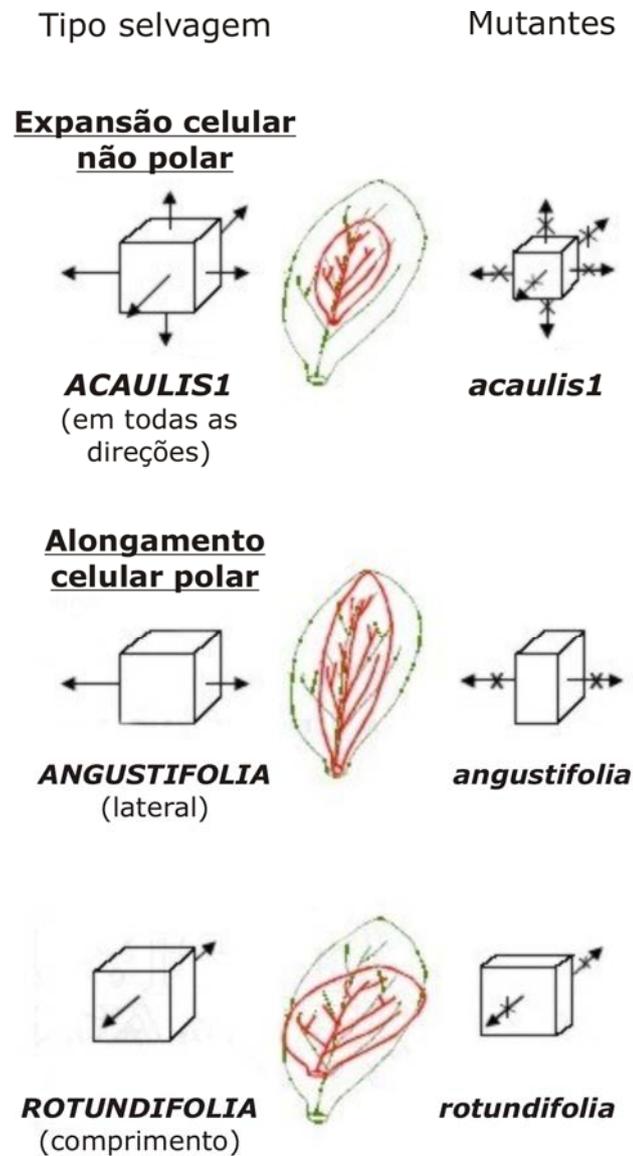


Figura 2: Esquema ilustrativo das prováveis funções dos genes *ACL1*, *AN* e *ROT3* durante a expansão das células das folhas de *A.thaliana*. Cada cubo representa uma célula, e as setas que partem de suas faces indicam as direções onde a expansão celular ocorre (\rightarrow) ou é inibida (\rightarrow com X). Os esquemas em cor verde representam as folhas tipo selvagem, e os em vermelho representam as folhas mutantes. Baseado em Tsuge *et al.*, 1996.

A forma da folha e o padrão vascular se desenvolveram de maneira coordenada durante a história evolucionária das plantas terrestres. A gênese da forma da folha e dos feixes vasculares principais são temporalmente coordenados enquanto os feixes vasculares secundários são formados durante a fase de expansão da folha (para detalhes ver item 5).

Estudos mostram o envolvimento direto dos genes da família HD-ZIP de classe III e dos genes *KANADI* na regulação da formação dos feixes vasculares, no estabelecimento do meristema apical e na formação de um padrão próprio dos órgãos laterais em *A. thaliana* (Hawker e Bowman, 2004; Emery *et al.*, 2003).

Foram identificados no genoma de *A. thaliana* cinco genes pertencentes à família HD-ZIP III: *PHABULOSA/ATHB-14* (*PHB/ATHB-14*), *PHAVOLUTA/ATHB-9* (*PHV/ATHB-9*), *REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS1* (*REV/IFL1-1*), *ATHB-8* e *CORONA/ATHB-15*. A expressão dos genes *PHB/ATHB-14*, *PHV/ATHB-9* e *REV/IFL1-1* é observada nas regiões vascular e adaxial de órgãos laterais (McConnell *et al.*, 2001), enquanto que a expressão de *ATHB-8* e *CORONA/ATHB-15* é observada apenas nas células do procâmbio e xilema (Ohashi-Ito e Fukuda, 2003; Baima *et al.*, 1995, 2001).

As mutações *rev/ifl1* de perda de função resultam em defeitos no desenvolvimento foliar e na especificação das células do eixo, na redução do transporte de auxina e na redução do número de células de xilema secundário e em particular na quantidade de células de fibras interfasciculares (Otsuga *et al.*, 2001; Zhong e Ye, 1999; Zhong *et al.*, 1997). Mutação de ganho de função no gene *REV/IFL1* (*rev-10d*) resulta em plantas apresentando perda das características abaxiais em folhas e radialização nos pacotes vasculares no eixo, i.e., xilema localizado ao redor do floema (Zhong e Ye, 2004; Emery *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 1999).

Análises de expressão e fenotípica mostraram que *ATHB-8* e *CORONA/ATHB-15* estão envolvidos na diferenciação do sistema vascular (Baima *et al.*, 1995, 2001; Kim *et al.*, 2005). Estudos indicam que *ATHB-8* provavelmente atua como um regulador positivo de genes responsáveis pela diferenciação de células do procâmbio e xilema, uma vez que sua super expressão leva a um aumento na quantidade do xilema durante o

desenvolvimento vascular primário e secundário (Baima *et al.*, 2001). Foi observado que a redução na expressão de *CORONA/ATHB-15* leva a um aumento na formação de feixes de xilema e tecido interfascicular em eixos, o que indica sua provável atuação como regulador negativo da formação do xilema (Kim *et al.*, 2005). Além disto, foi visto que estas plantas também apresentam um fenótipo anão, com eixo de inflorescência com tamanho reduzido, folhas da roseta pequenas e com lâminas curvadas para baixo (Kim *et al.*, 2005).

Estes dados em conjunto indicam a atuação dos genes *HD-ZIP III* no estabelecimento de um MA funcional, na polaridade nos órgãos laterais e no estabelecimento da polaridade no tecido vascular dentro do eixo.

Os genes *KANADI* (*KAN1*, *KAN2* e *KAN3*), que codificam fatores transcricionais, contendo o domínio GARP, agem de forma antagônica aos genes *HD-ZIP III*. Eles são expressos no floema e em regiões abaxiais de órgãos laterais jovens em desenvolvimento (Eshed *et al.*, 2004; Emery *et al.*, 2003; Kerstetter *et al.*, 2001), em um padrão complementar ao dos genes *HD-ZIP III*. O fenótipo de plantas triplo mutantes *kan1-2 kan2-1 kan3-1* é semelhante ao de plantas mutantes *rev-10d*, no qual o sistema vascular do eixo é radializado, e similar ao mutante *phb* nos órgãos laterais adaxializados (Eshed *et al.*, 2004; Emery *et al.*, 2003). A expressão de genes *KANADI* no MAC causa completa abolição da atividade meristemática e a expressão uniforme de genes *KANADI* nos órgãos laterais em desenvolvimento causa completa abaxialização desses órgãos (Emery *et al.*, 2003; Eshed *et al.*, 2001; Kerstetter *et al.*, 2001).

A natureza complementar do fenótipo e da expressão de genes *HD-ZIP III* e *KANADI* conduziu ao modelo onde a justaposição de funções dessas duas famílias gênicas é necessária para o estabelecimento do padrão de formação de órgãos laterais e vascularização na porção aérea da planta (Emery *et al.*, 2003; Eshed *et al.*, 2001). Também foi visto que as famílias gênicas *KANADI* e *HD-ZIP III* são expressas em padrões complementares no desenvolvimento de raízes laterais e têm papel funcional na formação de raízes laterais (Hawker e Bowman, 2004).

A análise do padrão do sistema vascular e da forma da folha em mutantes indica que mecanismos comuns regulam ambos os aspectos do desenvolvimento da folha, onde o transporte polar da auxina parece possuir papel central (Deyholos *et al.*, 2000; Berleth *et al.*, 2000; Sachs, 1981, 1991). (ver item 5).

4. Morfogênese de raiz

A raiz é um órgão de sustentação das plantas terrestres adaptado à obtenção de água e nutrientes do ambiente. Seus tecidos e tipos celulares surgem de um meristema apical com uma estrutura relativamente simples. As linhagens celulares presentes na maioria das raízes podem ser facilmente identificáveis, uma vez que elas se estruturam em colunas de células alinhadas com o eixo principal do órgão, como resultado das contínuas divisões anticlinais na região meristemática (Schiefelbein *et al.*, 1997).

Uma das características básicas das raízes é seu padrão radial, constituído por anéis ou camadas concêntricas de tecidos de três tipos fundamentais: a epiderme, o córtex e o tecido vascular. Em um corte transversal da raiz madura de *A. thaliana* se observa, de dentro para fora: o cilindro vascular (protoxilema e protofloema), o periciclo, a endoderme, o córtex e a epiderme (figura 3).

Ao longo de seu eixo apical-basal se distinguem quatro regiões. Na região subapical se localiza a zona meristemática, composta por células pequenas e arredondadas, onde ocorrem os processos de divisão celular. No centro desta região aparece o centro quiescente, composto pelas células iniciais e centrais, que se comporta como um promeristema (Scheres *et al.*, 1994; Dolan *et al.*, 1993). A próxima zona é a de alongamento (ou expansão celular), na qual não se observa divisão celular, mas o alongamento das células ao longo do eixo apical-basal. A seguir, a zona de especialização (ou diferenciação), na qual células epidérmicas específicas (tricoblastos) se diferenciam formando pêlos radiculares. Por último, existe uma zona de formação de raízes laterais,

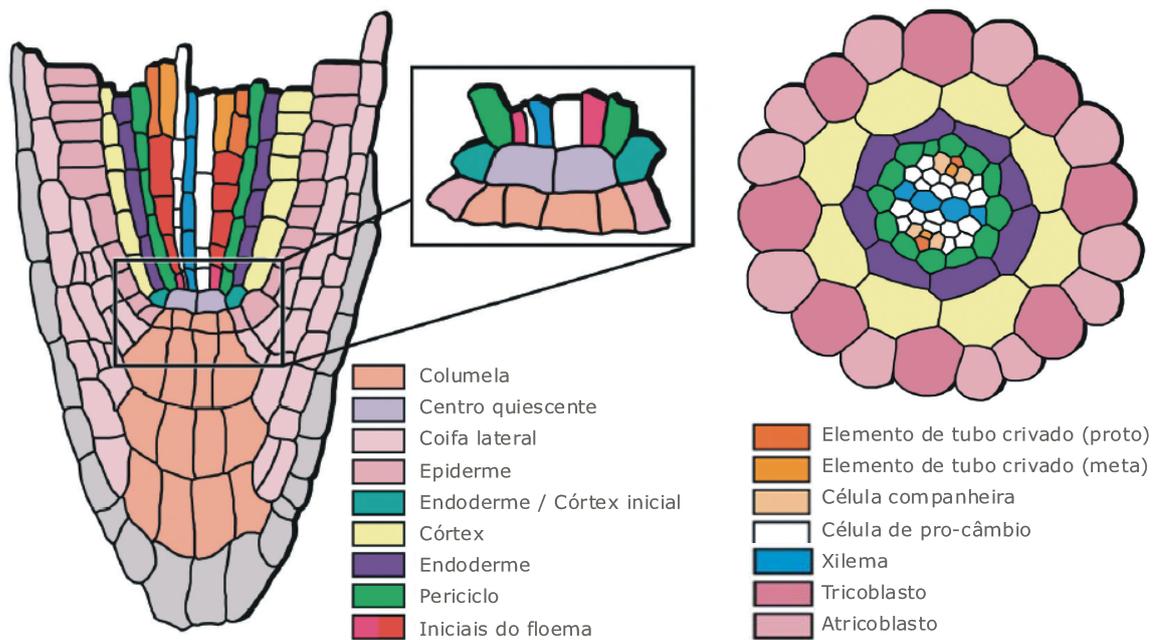


Figura 3: Padrão dos tecidos observados na raiz de *A. thaliana*. Esquema de um corte longitudinal mostrando o padrão apical-basal e de um corte transversal mostrando o padrão radial. Esquema baseado em Dolan *et al.*, 1993.

na qual são gerados novos meristemas (Dolan *et al.*, 1993). A fácil visualização destas estruturas pela transparência dos tecidos faz das raízes de *A.thaliana* um sistema adequado ao estudo experimental da organogênese vegetal (Schiefelbein *et al.*, 1997).

Em *A.thaliana*, como na maioria das espécies vegetais, existem dois tipos de células epidérmicas na raiz, as que apresentam um pêlo epidérmico (tricoblastos) e as que não os possuem (atricoblastos). Sua diferenciação é dependente de sua posição, já que os tricoblastos se formam na fenda entre duas células corticais subjacentes, enquanto que os atricoblastos se formam sobre uma célula cortical (figura 3) (Dolan *et al.*, 1994; Galway *et al.*, 1994). O desenvolvimento dos pêlos radiculares se inicia com a formação de uma protuberância na extremidade distal da célula. Esta é uma forma extrema de crescimento polarizado na qual ocorre extensão celular apenas em uma região muito pequena, pela fusão de vesículas, que contem material de parede celular, com a membrana protoplasmática (Grebe, 2004).

Vários mutantes apresentando alterações neste padrão foram identificados. Os mutantes *glabra2 (gl2)*, *glabra3 (gl3)*, *transparent testa glabra (ttg)* e *werewolf (wer)* apresentam pêlos radiculares em praticamente todas as células epidérmicas, indicando que os genes *GL2*, *GL3*, *TTG* e *WER* provavelmente atuam reprimindo a formação dos pêlos radiculares (Lee e Schiefelbein, 1999; Di Cristina *et al.*, 1996; Masucci *et al.*, 1996; Galway *et al.*, 1994). O mutante *caprice (cpc)* apresenta um fenótipo inverso, produzindo um número reduzido de pêlos radiculares, o que indica que *CPC* provavelmente atua estimulando a formação de pêlos radiculares (Wada *et al.*, 1997).

Estes quatro genes foram clonados e codificam fatores de transcrição. O gene *GL2* codifica uma proteína pertencente a família homeobox e sua expressão é observada preferencialmente nos atricoblastos até a zona de alongamento da raiz (Masucci *et al.*, 1996). O gene *TTG* codifica uma proteína que apresenta quatro repetições de ligação a proteína WD40, e que pode interagir com *GLABRA3 (GL3)*, uma proteína básica helix-volta-helix (bHLH), indicando que *TTG* provavelmente atua na interação proteína-proteína para especificar a diferenciação de células epidérmicas da raiz (Payne *et al.*, 2000; Galway *et al.*, 1994).

WER codifica um fator de transcrição do tipo MYB, também capaz de interagir com proteínas bHLH, que é preferencialmente expresso nos atricoblastos em desenvolvimento e regula positivamente a expressão de *GL2* e *CPC* (Lee e Schiefelbein, 2002). A proteína *CPC* por sua vez, é expressa preferencialmente nos atricoblastos em desenvolvimento, e passa para os tricoblastos, onde reprime a transcrição de *WER* e *GL2* (Lee e Schiefelbein, 2002; Wada *et al.*, 2002). *CPC* apresenta um domínio de ligação a DNA do tipo MYB, porém não apresentam o domínio de ativação transcricional presente nestes fatores de transcrição (Wada *et al.*, 1997). Assim, é possível que *CPC* possa inibir a transcrição de *GL2* ou *WER* se ligando a região promotora destes genes e bloqueando sua ativação (Wada *et al.*, 2002).

Foi visto ainda que as proteínas bHLH *GL3* e ENHANCER OF *GLABRA3* (*EGL3*) promovem a diferenciação dos atricoblastos pela ativação de *GL2* e que são necessárias para a expressão apropriada de *CPC* (Bernhardt *et al.*, 2003). Com base nestes dados foi sugerido um modelo simplificado para o controle do destino das células epidérmicas em *A. thaliana* (figura 4) (Bernhardt *et al.*, 2003).

Os genes *GL3* e *EGL3* são expressos nas células da epiderme da raiz. Estas proteínas interagem com TTG, a qual é pelo menos parcialmente necessária para sua ativação. Nas células posicionadas diretamente sobre a célula cortical (atricoblasto) a interação do complexo formado por *GL3*-*EGL3*-TTG com a proteína *WER* ativa *GL2* e *CPC*. A proteína *GL2* então inibe a formação do pêlo radicular, enquanto *CPC* passa para a célula epidérmica adjacente, onde compete com *WER* pela ligação ao complexo *GL3*-*EGL3*-TTG, resultando em um complexo incapaz de ativar *GL2*, e conseqüentemente na diferenciação de células capazes de formar pêlos radiculares (figura 4) (Bernhardt *et al.*, 2003). Porém, ainda não é conhecido como ocorre o acúmulo de concentrações diferenciais de *WER* e *CPC* dentro destas células.

A formação de pêlos radiculares também pode ser influenciada pela atividade dos fito-hormônios etileno e auxina. Foi visto que os alelos mutantes do gene *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1* (*CTR1*), cujo produto é uma quinase do tipo Raf que regula negativamente a transdução do sinal do etileno (Kieber *et al.*, 1993), causam a formação

de pêlos radiculares em células em que estes normalmente não aparecem (Dolan *et al.*, 1994). Também foi observado que os tricoblastos são mais sensíveis aos efeitos do etileno que os atricoblastos (Cao *et al.*, 1999). Por sua vez, o fenótipo das mutações *dwarf (dwf)*, *auxin resistant1 (axr1)* e *auxin resistant2 (axr2)*, que determinam a ausência de pêlos radiculares, indica claramente a implicação das auxinas na regulação da formação dos pêlos radiculares (Wilson *et al.*, 1990; Mirza *et al.*, 1984).

Foram isolados outros mutantes morfológicos com anormalidades nas raízes causadas pela expansão excessiva de um tecido particular, ou na forma dos pêlos radiculares (Schiefelbein *et al.*, 1993; Schiefelbein e Somerville, 1990). Por exemplo, os mutantes *cobra (cob)* e *root epidermal blebbing (reb)* manifestam uma expansão anormal das células da epiderme; o mutante *sabre (sab)* apresenta um aumento no tamanho das células do córtex da raiz; o mutante *pom-pom (pom1)* apresenta a epiderme e o córtex aumentados, e o mutante *lion's tail/korrigan (lit/kor)* apresenta o engrossamento do estelo (Hauser *et al.*, 1995; Aeschbacher *et al.*, 1995; Benfey e Schiefelbein, 1994; Benfey *et al.*, 1993; Baskin *et al.*, 1992). Os mutantes *root hair defective 6 (rhd6)*, *tiny root hair1 (trh1)* e *deformed root hairs 1 (der1)* são três mutantes que freqüentemente mostram posicionamento do pêlo radicular longe da extremidade distal da célula (Ringli *et al.*, 2002; Rigas *et al.*, 2001; Masucci e Schiefelbein, 1994).

A análise comparativa destes mutantes indica que a morfogênese radicular não está, provavelmente, governada por um mecanismo único, mas que obedece a controles independentes para definir a orientação e a expansão dos diferentes tecidos que compõem a raiz (Schiefelbein *et al.*, 1997).

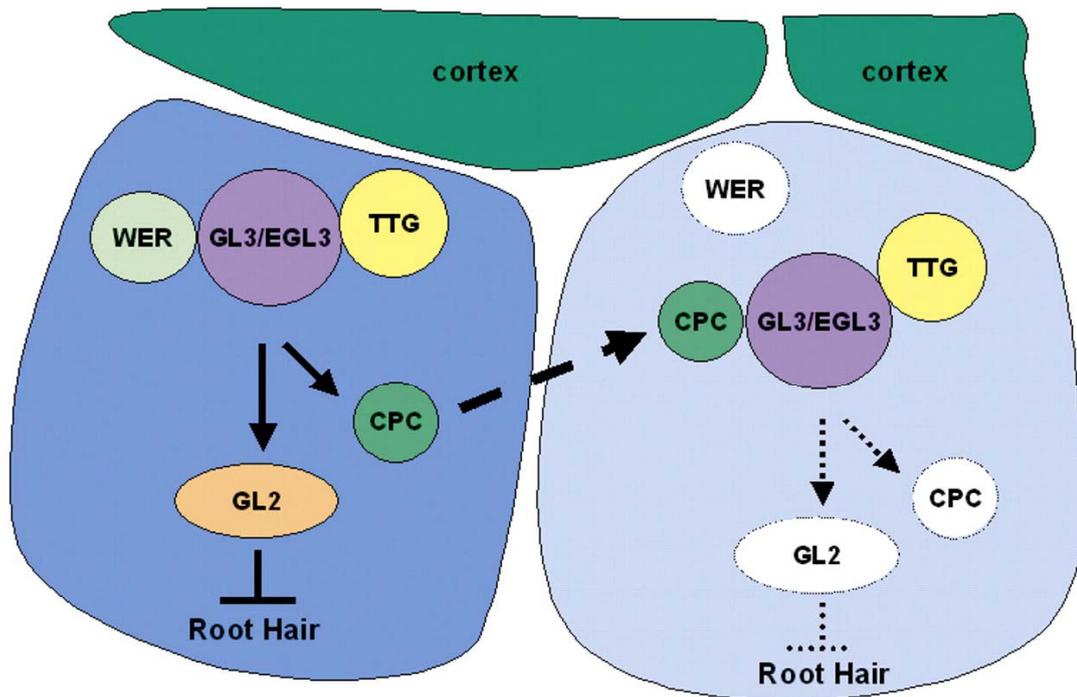


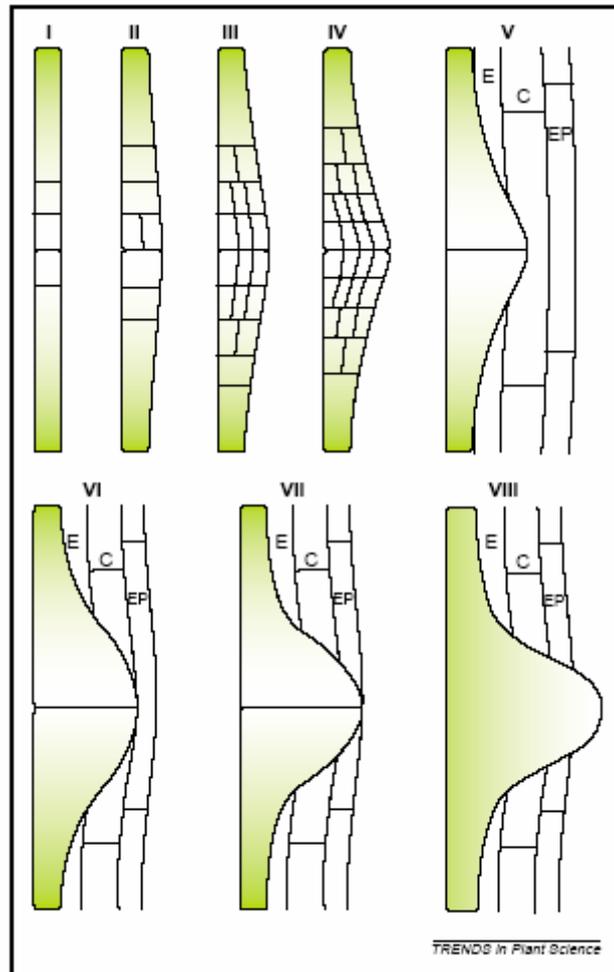
Figura 4: Esquema ilustrativo do modelo proposto para especificação de células epidérmicas em *A. thaliana*. Nas células posicionadas sobre as células corticais um nível alto de WER, direta ou indiretamente induzido pelas células do córtex, possibilita a formação do complexo WER-GL3-EGL3-TTG e promove a transcrição de GL2 e CPC. CPC passa para célula adjacente, posicionada sobre duas células corticais, onde um nível relativamente alto de CPC forma um complexo CPC-GL3-EGL3-TTG inativo. Esquema retirado de Bernhardt *et al.*, 2003.

4.1. Desenvolvimento da raiz lateral

Ao contrário dos meristemas primários de raiz e caule, que são estabelecidos na embriogênese, as raízes laterais são formadas “de novo” a partir de divisões celulares iniciadas no periciclo da raiz primária.

Em *A.thaliana*, o evento inicial de formação da raiz lateral é uma divisão assimétrica anticlinal de seis a onze células fundadoras no periciclo adjacente ao pólo do xilema para formar pequenas células (estágio I; estágios definidos por Laskowski *et al.*, 1995; Malamy e Benfey, 1997). As células fundadoras centrais então sofrem divisões periclinais, aumentando o número de camadas celulares (estágio II). Subsequentemente, divisões periclinais e anticlinais aumentam o tamanho e a dimensão do primórdio (estágio III e IV). Imediatamente antes da emergência, o primórdio adquire similaridade morfológica com o meristema apical de raiz (MAR), com camadas que correspondem a coifa, a epiderme, ao córtex, e a endoderme rodeando as células do estelo central (estágio VI e VII) (figura 5). As células presentes em raízes pós-emergentes continuam a se expandir, porém uma divisão celular ativa no ápice indica a presença de um MAR funcional. Neste estágio ele já apresenta todos os tipos de tecidos e a maioria dos padrões de expressão gênica observados na raiz primária (revisado em Teale *et al.*, 2005 e Casimiro *et al.*, 2003; Casson e Lindsey, 2003).

Experimentos mostram que raízes laterais contendo apenas de três a cinco camadas celulares, quando excisadas e transferidas para um ambiente livre de hormônio, apresentam a capacidade de desenvolver um meristema apical funcional (estágio III; Laskowski *et al.*, 1995). Além disso, a análise de linhagens transgênicas com a expressão de β -glucuronidase (GUS) controlada por promotores específicos para as camadas da endoderme, da epiderme, e do córtex, mostrou a expressão de GUS nos estágios V, VI, e VII, respectivamente, o que indica que o padrão radial nas raízes laterais é estabelecido antes da formação do meristema (Malamy e Benfey, 1997).



Casimiro *et al.*, 2003

Figura 5: Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento durante a formação da raiz lateral em *A.thaliana*. O esquema mostra os estágios específicos do desenvolvimento do primórdio da raiz lateral. No estágio I são representadas as células fundadoras do periciclo centrais, flanqueadas por células alongadas. No estágio II, as células fundadoras centrais sofrem divisões assimétricas transversais, formando uma camada interna e uma camada externa. No estágio III, as células da camada externa sofrem divisões periclinais para criar um primórdio de raiz lateral com três camadas. No estágio IV, o primórdio de raiz lateral forma quatro camadas devido a divisões periclinais na camada interna. A partir do estágio V, o primórdio da raiz lateral começa a emergir através do córtex da raiz principal, finalmente emergindo no estágio VIII. E, endoderme. C, córtex. EP, epiderme. Esquema retirado de Casimiro *et al.*, 2003.

Acredita-se também que as auxinas são os principais hormônios que induzem ou regulam a iniciação e o desenvolvimento das raízes laterais (Benková *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003; Bhalerao *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 1998; Celenza *et al.*, 1995).

Evidências indicam que o transporte polar de auxina é necessário para a distribuição da auxina para o sítio de iniciação da raiz lateral, onde ela atua regulando a divisão inicial das células do periciclo, o estabelecimento do primórdio da raiz lateral e a ativação dos meristemas das raízes laterais (Casimiro *et al.*, 2003; Bhalerao *et al.*, 2002). Na etapa seguinte do desenvolvimento, o meristema da raiz lateral começa a produzir sua própria auxina, tornando-se independente da auxina vinda do ápice (Bhalerao *et al.*, 2002).

Foi visto ainda que plantas tratadas com auxinas e mutantes com concentrações internas de auxinas aumentadas tais como o *superroot*, apresentam uma super produção de raízes laterais (Boerjan *et al.*, 1995). Já plantas tratadas com inibidores do transporte de auxina e mutantes resistentes ou insensíveis à auxina, apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de raízes laterais (Dubrovsky, 2002). Também foi observado que genes que atuam provavelmente na importação e exportação de auxina são necessários para formação de raízes laterais. Por exemplo, quando o gene *AUX1* (envolvido com a importação de auxina) está mutado ocorre uma redução significativa no número de raízes laterais (Hobbie e Estelle, 1995). A maior parte das mutações associadas com o desenvolvimento de raiz lateral ocorre em genes que codificam componentes das vias de transporte de hormônio e transdução de sinal.

Além da auxina, o hormônio ácido abscísico (ABA) também é um importante regulador do desenvolvimento das raízes laterais. Foi observado que ABA atua como um inibidor do desenvolvimento da raiz lateral, imediatamente após o aparecimento do primórdio de raiz lateral, e que ele atua por uma via que é independente da auxina (De Smet *et al.*, 2003).

5. Desenvolvimento do sistema vascular

O sistema vascular consiste de uma elaborada rede de tecidos condutores que interconectam todo o corpo do vegetal e atuam no transporte de água, minerais, componentes orgânicos e moléculas sinalizadoras por todo o vegetal. Ele é produzido continuamente nas zonas meristemáticas, bem como a partir de células do câmbio em tecidos maduros.

Dentro do sistema vascular podem ser identificados três diferentes tecidos: o xilema, o floema e os tecidos meristemáticos (procâmbio e câmbio vascular) (revisado em Scarpella e Mejer, 2004). O xilema é o tecido responsável pelo transporte de água e sais minerais a partir do sistema radicular até as partes aéreas da planta e é composto pelos elementos traqueais (elementos de vaso e traqueídes), pelas células parenquimáticas do xilema e pelas fibras de xilema. O floema é o tecido responsável pela translocação dos produtos da fotossíntese das folhas maduras para as áreas de crescimento e armazenagem do vegetal, e é composto pelos elementos de tubo crivado, pelas células companheiras, pelas células parenquimáticas do floema e pelas fibras do floema. As células do procâmbio são células tronco derivadas do meristema apical e que dão origem as células precursoras dos diferentes tipos celulares presentes no xilema e no floema. O câmbio é formado por células de parênquima, e dois tipos podem ser identificados: o câmbio primário ou fascicular, o qual fica localizado entre o floema e o xilema primários; e o câmbio secundário ou interfascicular, que pode ser encontrado nos eixos, entre os pacotes vasculares. Após a divisão das células do câmbio primário, as células filhas se diferenciam em tecido de xilema ou floema, dependendo de qual lado da zona cambial elas estão localizadas.

Os feixes de xilema e floema podem ser organizados em padrões distintos. Em eixos podem ser observados os padrões anfigasal (xilema rodeando o floema) e anficribal (floema rodeando o xilema). Em folhas existem os padrões colateral (floema externo) ou bicolateral (floema interno e externo) (revisado em Ye, 2002). Já a morfologia vascular observada em raízes apresenta uma simetria central.

Apesar das diferenças entre as estruturas vasculares dos órgãos, o sistema vascular é uma unidade axial. Durante o início do estágio cordiforme o tecido provascular é formado dentro da área que fará parte do hipocótilo superior (epicótilo). O tecido vascular presente no epicótilo se alonga tanto na direção da parte aérea quanto da raiz, de forma que estas duas regiões são efetivamente unidas, e permitindo a formação de um sistema vascular contínuo.

Durante a formação do primeiro pacote vascular, divisões de células do procâmbio ao longo da raiz e do hipocótilo estabelecem os pólos primários do xilema e do floema. Após a germinação, durante o desenvolvimento secundário, o câmbio vascular se divide ativamente dando início a uma nova fase de proliferação celular.

Enquanto isto novo tecido vascular é adicionado aos meristemas de raiz e da parte aérea. A diferença fundamental entre a formação da raiz e da parte aérea é o estabelecimento dos órgãos laterais. Durante o desenvolvimento da parte aérea, novas folhas e seus tecidos vasculares conectantes são desenvolvidos a partir do meristema. No entanto, a formação da raiz lateral é um processo separado; elas são formadas a partir da atividade das células do periciclo, e a ligação do tecido vascular lateral ao tecido vascular primário é um processo independente.

Assim, o desenvolvimento vascular inclui a formação de um padrão longitudinal de feixes vasculares primários, a formação do padrão radial do xilema e floema dentro de feixes vasculares, a diferenciação de tipos celulares especializados a partir de precursores de xilema e floema e a proliferação e diferenciação celular dentro do câmbio vascular.

Estudos indicam que o desenvolvimento do sistema vascular é influenciado pelo transporte e pela sinalização via auxina (revisado por Fukuda, 2004; Ye, 2002; Aloni *et al.*, 2003; Sachs, 1991). Já foi visto que este hormônio vegetal participa da regulação de muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, entre eles a formação da parte aérea (Fleming, 2005), formação de raízes primárias e laterais (Teale *et al.*, 2005; Ljung *et al.*, 2005), e o desenvolvimento embrionário (Weijers e Jürgens, 2005).

A auxina é produzida principalmente na parte aérea e transportada para os locais onde estão ocorrendo os processos de crescimento e diferenciação. Desta forma, o transporte da auxina ocorre em direção à base nos caules e folhas (basípeto) e na direção do ápice nas raízes (acrópeto), por um mecanismo dependente de energia. Além disso, o gradiente de auxina causado pelo transporte basípeto influencia a diferenciação dos tecidos vasculares nos ramos em alongamento. Isto pode ser confirmado pela observação de que a interrupção do transporte polar de auxina por inibidores específicos causa a formação de agregados locais de células vasculares e a descontinuidade de feixes vasculares em folhas jovens (Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999).

O transporte da auxina pode ocorrer de uma forma polar (célula-a-célula) ou não-polar (via floema). O transporte polar é facilitado por proteínas mediadoras do efluxo e influxo da auxina, pertencentes às famílias PIN e AUX, respectivamente (Grebe, 2004; Casimiro *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2002; Friml e Palme, 2002; Gälweiler *et al.*, 1998). Assim, a entrada da auxina na célula pode ocorrer por difusão ou pela atividade das proteínas AUX, e a saída se dá pela atividade das proteínas PIN, localizadas nas extremidades das células (Reinhardt *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 1998). No transporte não-polar a auxina, juntamente com os outros componentes da seiva do floema, pode se mover a partir do seu local de síntese para os sítios ativos, em velocidades muito maiores do que as observadas no transporte polar. Apesar de ser um processo passivo, foi observada a necessidade da permease AUX1 para o movimento acrópeto da auxina do floema para o ápice radicular (Marchant *et al.*, 2002; Swarup *et al.*, 2001).

Estudos mostraram que as concentrações de auxina podem regular o padrão de formação dentro do feixe vascular, onde baixas concentrações de auxina induzem apenas a formação do floema e altas concentrações induzem a formação de floema e xilema (Aloni, 1980), indicando que a diferenciação do floema é sensível a menores concentrações de auxina, comparado com o xilema. Assim, a formação de xilema sempre acontece na presença de floema (Aloni, 1987).

Foi visto ainda que a aplicação de auxina pode induzir a formação de novos feixes vasculares a partir dos sítios de aplicação, em direção ao pólo basal da planta (Sachs,

1981, 1991). Esta diferenciação ocorre de forma organizada e é restrita a uma fileira estreita de células e não ao redor da fonte de auxina. Este efeito polar da aplicação de auxina poderia ser devido à integração da auxina aplicada ao fluxo apical-basal já estabelecido. Já a restrição da diferenciação vascular a uma zona estreita poderia ser devida à drenagem eficiente da auxina por feixes provasculares incipientes, prevenindo assim o seu acúmulo e a exposição das demais células à auxina. Como base nestes dados foi formulada a hipótese da canalização do fluxo de auxina (Sachs, 1981, 1991, 2000).

Esta hipótese sugere que o fluxo de auxina, que começa inicialmente por difusão, induz a formação de um sistema celular de transporte. Neste sistema as células conduzindo auxina se diferenciam em células vasculares para aumentar a condutibilidade da auxina, i.e., células com níveis elevados de auxina são induzidas a absorver mais auxina dos tecidos adjacentes, e a transporta para baixo de uma forma mais eficaz que as suas células vizinhas (figura 6 A e D).

Esta hipótese é apoiada pela análise do desenvolvimento vascular em plantas onde o transporte de auxina é prejudicado. Foi visto que a proteína PIN-FORMED1 (*PIN1*), que atua na exportação da auxina, localiza-se especificamente na extremidade basal da membrana plasmática das células condutoras, contribuindo para o transporte basal da auxina, que é absorvida continuamente pela extremidade apical da célula (Blakeslee *et al.*, 2004; Gälweiler *et al.*, 1998). Quando o gene *PIN1* é mutado ocorre uma diminuição do transporte de auxina nos caules, o que leva a ocorrência de defeitos no sistema vascular (revisado em Fukuda, 2004; Gälweiler *et al.*, 1998; Bennet *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1991).

Vários mutantes, além do *pin1*, com a vascularização alterada foram identificados em *A.thaliana*. Por exemplo, o mutante *lopped (lop1)* apresenta defeitos vasculares e diminuição do transporte de auxina em seus caules (Carland e McHale, 1996), semelhante ao mutante *pin1*. Já os mutantes *monopteros (mp)*, *auxin resistant 6 (axr6)*, e *bodenlos (bdl)* apresentam percepção à auxina prejudicada, e sistema vascular

geralmente reduzido (revisado em Berleth *et al.*, 2000; Hobbie *et al.*, 2000; Hamann *et al.*, 1999; Przemecck *et al.*, 1996; Berleth e Jürgens, 1993).

Estudos mostraram que o padrão de distribuição de feixes vasculares em folhas de *A. thaliana* pode ser alterado através do uso de inibidores químicos do transporte de auxina, tais como o NPA (ácido 1-N-naftilalâmico) e o TIBA (ácido 2,3,5-triidobenzoico), que bloqueiam a exportação da auxina (Mattsson *et al.*, 1999, 2003; Sieburth, 1999). O padrão dos feixes vasculares de plantas do tipo selvagem normalmente é caracterizado por feixes vasculares de diferentes tamanhos, onde um feixe principal se ramifica lateralmente, originando feixes secundários que, por sua vez, se ramificam para formar feixes terciários e assim por diante (Nelson e Dengler, 1997). Quando o transporte de auxina foi inibido houve aumento dos feixes vasculares na margem das folhas, associado a um número aumentado de feixes vasculares secundários. Além disso, foi relatado que os feixes vasculares formados eram mal alinhados (figura 6 B, C, E e F).

Estas observações confirmam que o transporte polar de auxina pode atuar orientando e restringindo a diferenciação celular a zonas estreitas, possivelmente mediando drenagem eficiente de auxina. Estes resultados sugeriram ainda que as fontes principais de auxina estavam situadas próximas às margens da folha, e que a formação dos feixes vasculares na folha era depende de um sinal indutivo, provavelmente auxina, da margem da folha (Berleth *et al.*, 2000; Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999), o que foi confirmado em trabalhos posteriores (Aloni *et al.*, 2003; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002).

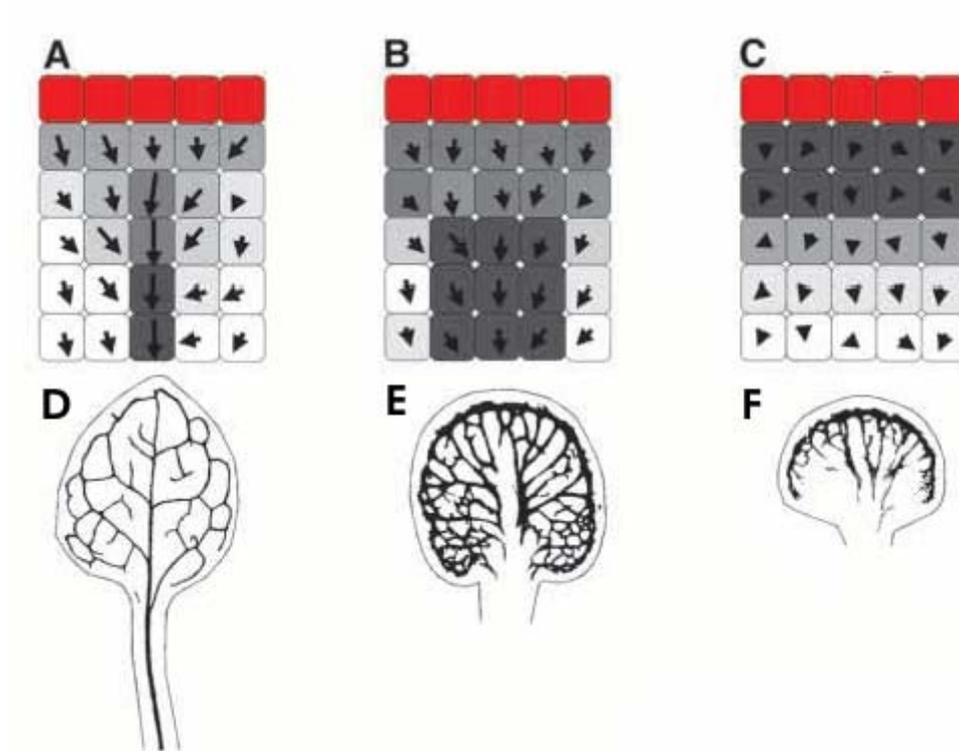


Figura 6: Formação do padrão vascular em folhas e a importância da canalização do fluxo de auxina. (A) As células produtoras de auxina (vermelho) são encontradas próximas à margem da folha e as células vizinhas, na segunda fileira, transportam auxina para baixo. As células com alto nível de auxina são induzidas a acumular mais auxina, e a transporta para baixo de forma mais eficiente (coluna central de células). (B) Uma inibição fraca do transporte polar de auxina leva a uma canalização menos eficiente, resultando em amplos feixes condutores de auxina. (C) Uma inibição forte do transporte polar de auxina resulta no acúmulo de auxina nas células adjacentes as células produtoras de auxina e na diferenciação destas células em células vasculares. (D) Esquema do padrão vascular normal observado em folhas de *A.thaliana*. (E) Folha de *A.thaliana* tratadas com baixa concentração de um inibidor de transporte polar de auxina desenvolvem feixes vasculares mais grossos e bem desenvolvidos na margem da folha, em comparação com os encontrados na base e centro da folha. (F) Folha de *A.thaliana* tratada com uma alta concentração do inibidor do transporte polar de auxina apresentam uma diferenciação vascular restrita quase completamente à margem da folha. Figura retirada de Mattsson *et al.*, 1999.

Esta hipótese da canalização do fluxo de auxina controlando o padrão vascular é aceitável em locais onde os feixes vasculares se desenvolvem de uma forma progressiva, como é o caso dos feixes principais nas folhas. Porém, nos espaços intersticiais entre os feixes principais de uma folha em expansão, as redes de feixes vasculares secundários parecem frequentemente serem formadas simultaneamente. Foi sugerido então que, nestes casos, os padrões vasculares poderiam ser controlados por um mecanismo tipo "difusão e reação" (Meinhardt e Gierer, 2000; Koch e Meinhardt, 1994).

O mecanismo de difusão e reação seria baseado na presença de um ativador de diferenciação vascular auto-catalítico, de curto alcance, e de um inibidor do mesmo processo, de longo alcance (liberado pelas células ativadas). Assim, a combinação entre a ativação celular de alcance limitado e a inibição de longo alcance resultaria na diferenciação randômica de algumas células em um campo inicialmente homogêneo (Meinhardt e Gierer, 2000). Foi observado que estudos de modelagem matemática usando modelos de reação e difusão podem recriar padrões reticulados semelhantes àqueles encontrados nos sistemas vasculares de folhas (Nelson e Dengler, 1997). Apesar de moléculas candidatas a ativador e inibidor, que poderiam atuar mediando este processo, ainda não terem sido identificadas em plantas, o transporte de auxina poderia ser responsável por ambas as funções. O acúmulo de auxina em células com níveis elevados de auxina conduziria a ativação auto-catalítica de alcance limitado, enquanto que a depleção de auxina de tecidos circunvizinhos resultaria na inibição de longo alcance da diferenciação vascular.

Assim, dependendo das condições, mecanismos de canalização e de reação e difusão poderiam ser processos complementares. Dois fatos dão sustentação a esta hipótese. Primeiro, a observação de que mutantes com defeitos no transporte ou resposta a auxina exibem os feixes vasculares com padrões aberrantes (Scarpella *et al.*, 2003; Hobbie *et al.*, 2000; Mattsson *et al.*, 1999; Przemeck *et al.*, 1996). Segundo, a observação de que o gene repórter da auxina (DR5-GUS) é expresso em feixes vasculares de todas as ordens, inicialmente no feixe principal, e depois nos feixes secundários (Mattsson *et al.*, 2003).

No entanto, o processo de formação do sistema vascular em plantas ainda não está totalmente elucidado. Apesar da importância da auxina e dos genes que interagem com ela neste processo, uma série de outros fatores, cuja relação com auxina não foi evidenciada, também parecem dar uma contribuição importante para o desenvolvimento vascular.

A análise do mutante *continuous vascular ring (cov1)* de *A.thaliana* mostrou que ele apresenta um grande aumento no desenvolvimento do tecido vascular na região interfascicular de seu eixo de inflorescência. Este aumento leva a formação de uma grande faixa contínua que geralmente se estende por toda a circunferência do eixo (figura 7) (Parker *et al.*, 2003). No entanto, o padrão vascular nas folhas permanece normal. A análise direta das concentrações de auxina, bem como da interação do mutante *cov1* com um mutante de sinalização de auxina conhecido, indica que *cov1* afeta o padrão vascular por um mecanismo que é independente da auxina (Parker *et al.*, 2003). O fenótipo mutante observado é assim devido a um defeito no padrão vascular primário, e não a super proliferação de feixes vasculares secundários.

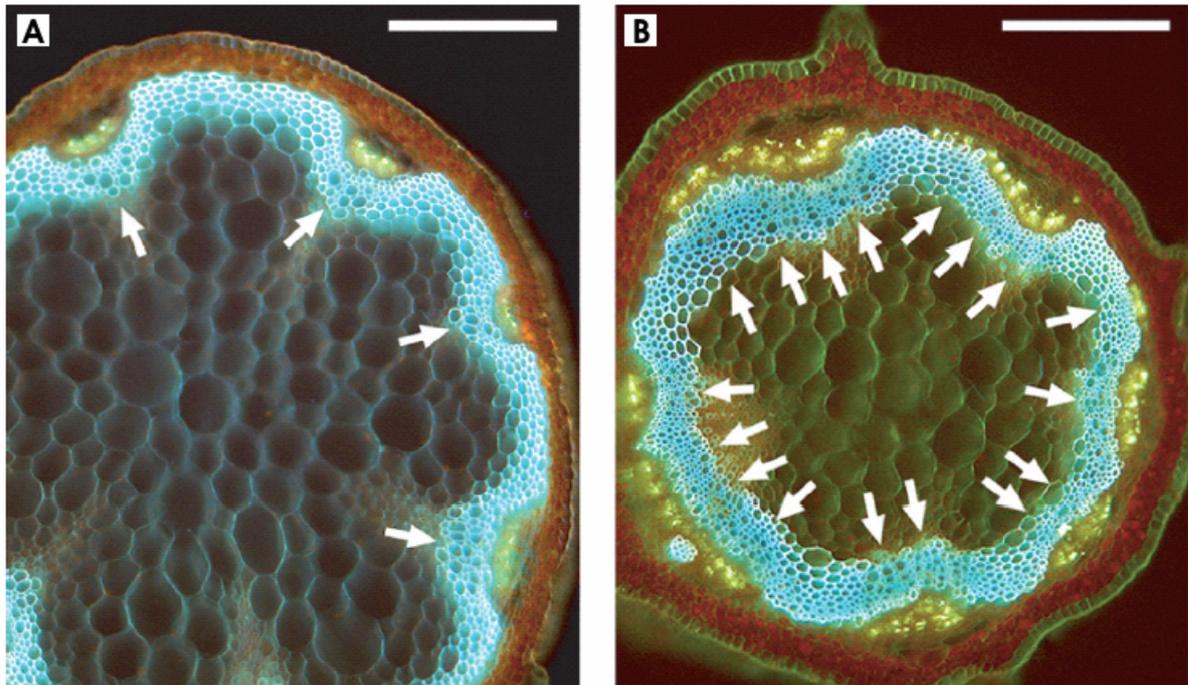
Acredita-se que a proteína COV1 esteja envolvida na manutenção ou iniciação de um padrão ordenado de feixes vasculares dentro do eixo (Parker *et al.*, 2003). Como COV1 é uma proteína integral de membrana, ela poderia estar envolvida na geração, transporte ou percepção de uma molécula sinal que regula negativamente a diferenciação do tecido vascular no eixo, como proposto pela teoria da difusão e reação (Parker *et al.*, 2003).

A análise de um outro mutante, o *cotyledon vascular pattern 1 (cvp1)*, indica que esteróis também são necessários para a correta formação do padrão vascular, através de um mecanismo de sinalização tipo difusão e reação (Carland *et al.*, 2002). Mutações no gene *CVP1*, que codifica a enzima *sterol metiltransferase 2 (SMT2)* da via biossintética dos esteróis, resultam em plantas com feixes vasculares fragmentados, com células mal alinhadas e pouco alongadas (Carland *et al.*, 2002). Estes mutantes apresentam diminuição nos níveis de esteróis, porém os níveis de auxina, bem como seu transporte e percepção, são normais.

Isto indica que os esteróis, além de sua função estrutural na membrana celular, poderiam atuar como um sinal específico para a formação de um padrão vascular correto. Alternativamente, a presença de esteróis na membrana poderia ser uma exigência estrutural para a montagem e/ou atividade de proteínas de membrana envolvidas na formação do padrão vascular (Carland *et al.*, 2002).

Além disto, já foi comentada a atuação combinada dos genes das famílias *HD-ZIP III* e *KANADI* como reguladores da formação dos feixes vasculares (item 3). Estudos mostraram que a correta expressão dos genes destas famílias é necessária para o estabelecimento do padrão de vascularização na porção aérea das plantas (Hawker e Bowman, 2004; Emery *et al.*, 2003; Eshed *et al.*, 2001).

Cabe destacar a atuação dos genes *ATHB-8* e *CORONA/ATHB-15* na diferenciação das células do procâmbio e do xilema, onde eles são expressos (Kim *et al.*, 2005; Ohashi-Ito e Fukuda, 2003; Baima *et al.*, 1995, 2001). Foi proposto que *ATHB-8* atuaria como um regulador positivo do desenvolvimento vascular, uma vez que a sua super expressão leva a um aumento na quantidade do xilema durante o desenvolvimento vascular primário e secundário (Baima *et al.*, 2001). De forma oposta, o gene *CORONA/ATHB-15* atuaria como um regulador negativo da formação do xilema, uma vez que foi observado um aumento na formação dos feixes de xilema e do tecido interfascicular em mutantes com redução de sua expressão (Kim *et al.*, 2005). Porém, estes genes não afetam o padrão radial, nem a polaridade dos pacotes vasculares. Alterações no padrão radial dos feixes vasculares de eixos de inflorescência foram observadas em mutante *REV/IFL1* de ganho de função e triplo mutantes *kanadi* (*kan1 kan2 kan3*), que apresentam pacotes vasculares radializados, com xilema localizado ao redor do floema (Zhong e Ye, 2004; Emery *et al.* 2003; Zhong *et al.*, 1999) (ver item 3.1, pág. 13).



Reinhardt, 2003

Figura 7: Padrão vascular do mutante *cov1* de *A.thaliana*. Corte do eixo de inflorescência de uma planta tipo selvagem (A) de um mutante *cov1* (B) com feixes de floema altamente expandidos. A fluorescência azul indica o xilema e as fibras interfasciculares, e a fluorescência amarela indica os feixes de floema (setas). Barra: 250 μ m. Figura retirada de Reinhardt, 2003.

6. Indução e caracterização de novos genes

A indução de mutações em *A. thaliana* é uma das estratégias usadas para facilitar a clonagem e a caracterização de diversos genes. Como *A. thaliana* é uma planta autógama, e a fecundação cruzada ocorre em uma frequência quase nula em condições de laboratório, uma lesão recessiva aparecerá em homozigose em 25% dos descendentes da primeira geração filial produzida por qualquer flor desenvolvida a partir de uma célula geneticamente mutada.

Entre os procedimentos usados para a indução de mutações estão: a exposição à raios X, que podem produzir quebras, deleções ou reorganizações cromossômicas; a exposição a agentes mutagênicos químicos, como o EMS (Etil Metil Sulfonato), que é um agente alquilante e causa mutações pontuais e pequenas deleções com uma eficácia elevada; e a utilização de métodos insercionais, como a biobalística e a transferência mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, onde ocorre a integração de um DNA exógeno no genoma vegetal (métodos revisados por Bent, 2000; Hays, 2002).

Atualmente, um dos métodos mais utilizados para indução de mutações em *A. thaliana* é a integração aleatória de um T-DNA (*DNA transfer*) em seu genoma, mediada por *A. tumefaciens* (Walden, 2002). O T-DNA é delimitado por 25 pares de bases diretamente repetidas em cada extremidade, que definem a porção do plasmídeo que será transferida. Entre estas seqüências são inseridos marcadores seletivos, de resistência a antibióticos ou herbicidas, que permitem a seleção de plantas transformadas.

Apesar de eficiente em muitas situações, a estratégia clássica para a caracterização de novos genes depende da identificação de mutações que resultem na produção de um fenótipo específico. Isto dificulta a identificação de genes que fazem parte de famílias gênicas, uma vez que a redundância funcional pode levar a ausência de um fenótipo visível. Daí a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias, como aquelas onde os T-DNAs são associados a genes marcadores como os da β -glucuronidase e da *GFP* (green fluorescent protein).

A utilização de sistemas como estes permite a caracterização de seqüências regulatórias e de novos genes (Parinov e Sundaresan, 2000). Um sistema utilizando como marcador o ativador transcricional de levedura *GAL4* associado a um gene repórter foi desenvolvido para *Drosophila melanogaster* (Brand e Perrimon, 1993) e adaptado para *A. thaliana* por Jim Haseloff (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff>).

Nesse sistema, é feita a transformação de uma população de *A. thaliana* via *A. tumefaciens* com um T-DNA contendo a cópia de um gene quimérico de levedura (*GAL4-VP16*) sob controle do promotor mínimo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35S CaMV), fusionado ao gene *GFP* modificado (*mGFP*), controlado por uma seqüência *UAS* (upstream activating sequences) [construção 35S::*GAL4-VP16* *UAS*::*mGFP*]. Se esta construção é inserida próxima a elementos ativadores pode ocorrer a expressão de *GAL4-VP16* (um ativador transcricional). A proteína *GAL4-VP16*, por sua vez, ativará a transcrição do promotor contendo a seqüência *UAS*, levando à expressão da proteína *GFP*. Assim, as células expressando *GAL4* ficam marcadas com uma fluorescência verde, o que permite uma detecção direta de transformantes primários expressando *GAL4*, em padrões temporais e espaciais distintos. Desta forma, esta estratégia possibilita a identificação de elementos reguladores presentes próximos aos sítios de inserção do T-DNA (figura 8).

Quando o T-DNA é inserido na região codificante de um gene, este geralmente tem sua expressão interrompida, o que pode gerar um fenótipo. Se a linhagem homocigota contendo a construção 35S::*GAL4-VP16* *UAS*::*mGFP* for transformada com uma construção contendo o gene alvo fusionado a seqüência *UAS* (construção *UAS:GeneX*), haverá o re-estabelecimento da expressão do gene alvo (gene X) nas células expressando *GFP*. A reversão do fenótipo através deste procedimento se constitui em uma forma de confirmação de que o fenótipo observado é realmente decorrente da falta de expressão de determinado gene.

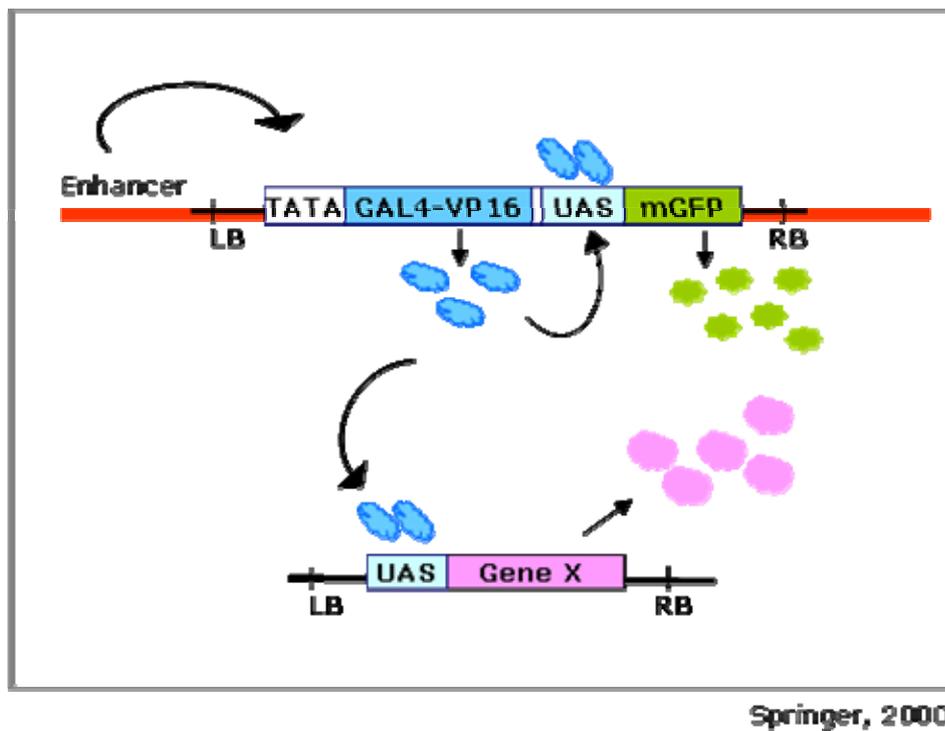


Figura 8: Sistema 35S::GAL4-VP16 UAS::mGFP. A construção 35S::GAL4-VP16 UAS::mGFP é inserida aleatoriamente no genoma de *A.thaliana* via transformação mediada por *A. tumefaciens*. A inserção da construção nas proximidades de elementos ativadores leva a expressão de *GAL4-VP16* que, por sua vez, leva a expressão da proteína GFP se ligando a seqüência UAS. Assim padrões de expressão do gene *GAL4-VP16* são imediatamente e diretamente detectáveis, uma vez que cada célula que expressa *GAL4* fica marcada por fluorescência verde. O gene presente na região onde o T-DNA foi inserido geralmente tem sua expressão interrompida. Para reverter esta situação a linhagem homozigota contendo a construção 35S::GAL4-VP16 UAS::mGFP pode ser transformada com uma construção contendo o gene alvo fusionado a seqüência UAS (construção UAS::Gene X), re-estabelecendo a expressão do gene alvo nas células expressando *GAL4-VP16*. LB, borda esquerda do T-DNA, RB, borda direita do T-DNA. Redesenhado de Springer, 2000.

7. Identificação e caracterização parcial de um mutante no desenvolvimento foliar utilizando o sistema 35S::*GAL4-VP16 UAS::GFP*

Em um trabalho inicial, realizado pelo Dr. Márcio Alves Ferreira em colaboração com o Dr. Elliot Meyerowitz, uma população de *A.thaliana*, ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*), foi transformada com a construção 35S::*GAL4-VP16 UAS::GFP*, pelo método “floral dip” (Clough e Bent, 1998). As plantas T1 foram analisadas em microscópio estereoscópio equipado com fluorescência, para a identificação de indivíduos que apresentavam fluorescência no meristema apical. Foram obtidas inicialmente várias linhagens distintas que apresentavam essa característica. A etapa seguinte consistiu na identificação das linhagens que apresentavam alguma anormalidade no desenvolvimento.

Foram avaliadas cerca de 5.000 plantas e dentre as linhagens identificadas que apresentavam expressão da *GFP* no meristema apical, a linhagem nomeada 24A foi a que apresentou um fenótipo mutante mais interessante. As plantas desta linhagem apresentavam, além de uma baixa estatura, alterações na morfologia das folhas e redução no tamanho das silíquas. As folhas destas plantas eram mais longas e apresentavam as bordas fletidas para baixo, resultando na formação de uma folha côncava. A análise do padrão de formação dos feixes vasculares nas folhas destas plantas através de clareamento demonstrou a existência de uma variação estrutural, com a presença de uma nervura paralela à margem da folha, originando-se a partir do pecíolo (figura 9). Devido à redução global observada no tamanho destas plantas mutantes quando comparadas a plantas do tipo selvagem, essa linhagem foi renomeada *AQUITÃ* (*aq̄t*), uma palavra de origem indígena (Tupi-guarani) que significa pequeno, curto.

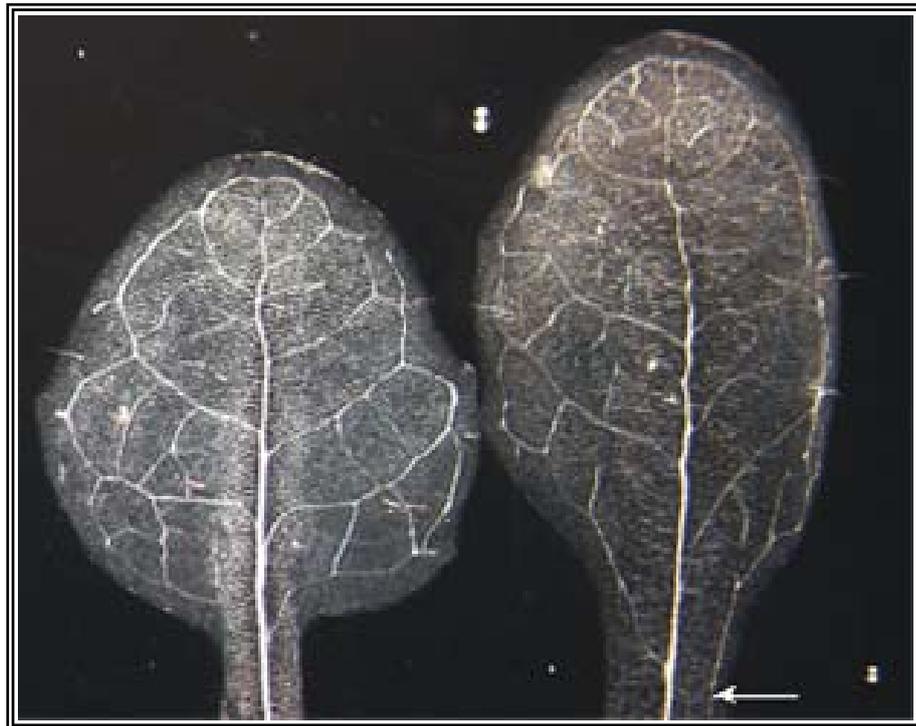


Figura 9: Comparação entre o padrão vascular de folhas de plantas do tipo selvagem e mutante *aq1* de *A.thaliana*. Padrão de vascularização de folhas de plantas selvagens (esquerda) e *aq1* (direita) após clareamento, mostrando a presença de uma nervura paralela à margem da folha (→) na planta mutante.

Para uma melhor caracterização do mutante, o gene nele interrompido foi identificado pela metodologia de TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995). O gene identificado como interrompido foi anotado no genoma de *A. thaliana* como *At1g55430*. O inserto de T-DNA está localizado a 200 pb abaixo códon de iniciação do gene e interrompe a seqüência aberta de leitura deste gene que não possui íntrons na anotação (figura 10). Esse resultado foi comprovado utilizando-se iniciadores específicos do gene em conjunto com iniciadores específicos do T-DNA.

A anotação nos bancos de dados TAIRS e MIPS qualifica esse gene como codificando para uma proteína hipotética, apresentando 657 aminoácidos, peso molecular de 75088 Da, ponto isoelétrico de 6.0 e conteúdo CG 43.2%.

Uma análise mais detalhada da seqüência da proteína codificada por este gene revela que ele possui três possíveis domínios funcionais: um domínio "DAG-PE-bind", um domínio "DC1"; e um domínio "PHD-finger" (figura 11). O domínio DAG-PE-bind apresenta uma região rica em cisteína com cerca de 50 resíduos de aminoácidos e está relacionado com a interação com diacilglicerol (DAG) e ésteres de forbol (análogos do DAG). Este domínio apresenta seis cisteínas e duas histidinas conservadas que provavelmente atuam na ligação a dois íons zinco. Proteínas com esse domínio estão geralmente envolvidas com processos de transmissão de sinais intracelulares, como por exemplo serina/treonina quinases e componente da família raf/mil (Slater *et al.*; 1999). O domínio "DC1" é um pequeno domínio rico em cisteínas e histidinas, apresenta o padrão de conservação semelhante ao encontrado no domínio "DAG-PE-bind" e provavelmente também se liga a dois íons zinco. A função das proteínas com este domínio ainda não está bem esclarecida, porém este domínio poderia também mediar a ligação com moléculas tipo diacilglicerol. O domínio "PHD-finger" é um motivo de aproximadamente 50 aminoácidos encontrado principalmente em proteínas envolvidas na regulação da transcrição de eucariotos, mediada por cromatina. Sua seqüência característica é um motivo de ligação a zinco Cys(4)-HisCys(3) conservado. A função deste domínio ainda não é conhecida, mas foi postulado que pode funcionar como um domínio para interações proteína-proteína (Schindler *et al.*, 1993), como um redox

sensor sensível para sinais ambientais (Klinge *et al.*, 1996), ou uma seqüência requerida para ligação DNA específica pela proteína (Schindler *et al.*, 1993). Entre as proteínas que possuem esse domínio podem ser citados os membros do grupo de proteínas trithorax e polcomb, além de membros da família *Zmhox1* de milho e das proteínas *PRHA* e *PFRP* de *A. thaliana* e salsa, respectivamente. Destas, as regiões que apresentam uma homologia mais significativa correspondem a dois domínios DC1, no entanto ainda não podemos descartar a importância dos demais domínios (figura 11).

Foram identificados no genoma de *A. thaliana* seis genes que codificam proteínas com alta similaridade com a *At1g55430* (E-value = 0), indicando a existência de uma família gênica (figura 12). Seis genes desta família estão localizados no cromossoma 1, sendo que quatro deles (*At1g55410*, *At1g55420*, *At1g55430* e *At1g55440*) estão localizados espacialmente muito próximos, em organização em repetição no BAC T5A14. Os outros dois genes (*At1g55380* e *At1g55390*) estão localizados no BAC T18I3. O sétimo gene (*At5g42280*) está localizado no cromossoma 5 e foi identificado no BAC K5J14 (figura 13).

A análise da estrutura gênica desta família mostrou que dos sete genes identificados, apenas dois (*At5g42280* e *At1g55410*) apresentam íntrons, os demais são constituídos apenas por um éxon. Através de experimentos de microarranjo foi observada a expressão de genes pertencentes a esta família em células de raízes de *A. thaliana* (*At1g55390* – Koo e Ohlrogge, 2002), no ápice de raízes de *A. thaliana* durante o estudo do controle da regulação transcricional em resposta a estímulos mecânicos e gravitrópicos (*At1g55410*, *At1g55430*, *At5g42280* - Kimbrough *et al.*, 2004), e em células do tapete de anteras de *A. thaliana* (*At5g42280* – resultados não publicados, Alves-Ferreira, M. e Meyerowitz, E.)

At1g55430

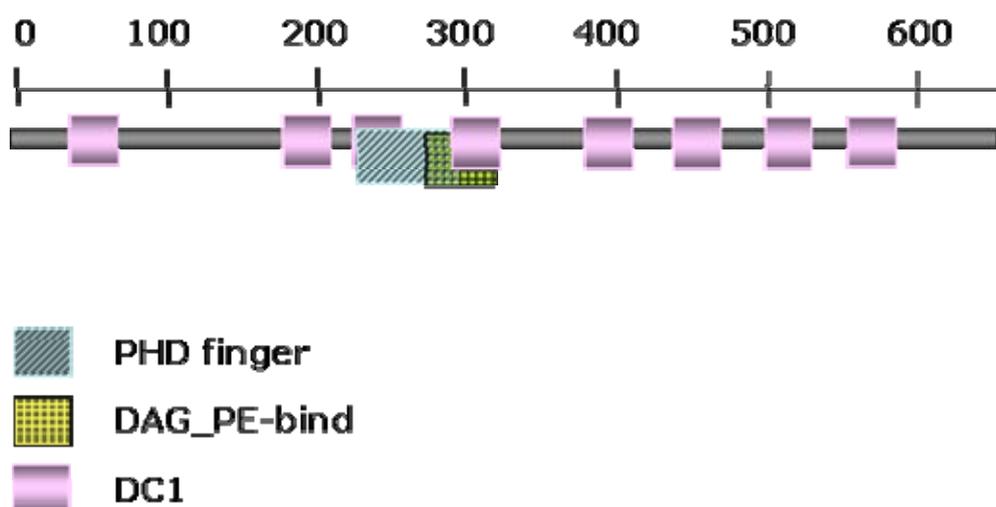
(Cromossomo 1 / BAC clone T5A14 / sequence database
accession [EMBL:AC005223](#))

```

aggattcata atcgtgctta ggttatggct ggctcgaagc ctgaactagt tttttattca ctacagctgg
actaagggtca tcatctccat tgggtgagata tttcaaaagt ttctaaaaaa aaaaaaatga tattttatta
tgatttagct tctgtccaat tataaacaca catatacaca tagtctctca atcattactc taaagttttt
ctgcagaaaa actattctca atctctcttc tatctctcac ctactttatt attattttat attttttagt
taatgagaaa ctatatgaga gactactgat agagatgcta agagagatag atagagagag agaacaagag
acttgaatag ttgactttat acattggaac tggctcttaa ctctgggcag atgttataaa aggacatatt
tgggagcaga cagatgtatg agctaaaacc tgatttttac tatctgattt gcttctcttt tcattccaaa
gaaacccgat ATGGAACCAC ACCCTCTTTA TTTTGTGCCA CCTCCTTATT TAACTAGAAC TAAACCTCCA
TGTCGTCTGT CCGATCCGGC TCAGCCCCAC AAGCTTTGCC GACGGCGACA ACCAACTCAT CCTCCACTTT
CTATCTGCTT TACGTGCAAA GGCAAACACT TGAAGCGCAG TAAGTATTAT TACTAATGTG CTACTTGCAA
TTTGGAAATTT CACAGAGGCT GTCACGTCTT TCTGCCGGAG ATCAGAAGCG CTTTTCATCC CTCTCACCCC
CTCACCTTCA CCGCCTTAGA TCCTGAATTT AATGCTTCTA TCATACACCA AAATTTGGAGG GACAGCTCCG
CTTCAGAGGA ATCTTCGGAA GAGTTGATAA ACGAAGTTGT TGAATATGAT CATGAAGACG CTGGTGATGA
TGCTGTTGCT AATGAAGACG ATGATGAAGA TGCTGTTCTT AATGATGACG ATAATGGCGG TGGCGGTGGC
GATATTTATG CTGTCGCTTA TAATGATGGT GCCTCTTGT CCTATGGAAA TCACCTGAAA TGCAAATGTT
GTGCTTCTCC TTTAGAAAAG CTATATTATC ATTGTTCTAC CTGCAAGTTC AATCTTAACT TGACTTGCTC
GATGAGACCA CCACCTACCA CTATCTCACA CTTGAAATTT CATGAGCACA CCCTCACCTT CTTCTTGTG
CGAATCACTT GGCCATGCGA TGTTTGTGGC TTTCTTCTAA ACAAAGACAC CGACGATCTC GTTTACGCTT
GTCTACCTTG CAGCCTTATG GTCCACAGAT CATGTATCTA TCTACCTCGT GTCATTAAGA TCACCCGACA
CCCACATCGT CTCTCTCTCA CTTCTCCCT TCAACCTGGT GATTTCTCTT GTGGACTTTG TCGCCATACT
GTTGACGTTA ACTGCGGGCA ATACTCTTGT GATAAGGGAT GCCAATATGC TATCCATTTCG AAATGTGCAA
CATGGAGAGA CGTGTGGGAT GGAATAGATC TTGATGGAGT GCCTGAAGAA CCCGAGGAGT ATATCGAACC
GCCATTCTG AAGATTGATG AGGACACAAT TCAACATTTT AGTCATCATG AGCATTATAT GAAGCTCCAT
GTAAAGAAAA CCATTACCGA GAAAGACAAG TTTTGTGAGG CATGCACCTT TCCAGTAATG ATCTCTCAGA
GATTTTATGG ATGTATGGAG TGTGATTTTG TACTCGACGA AGCATGTGCT TCTTTCCTC GCAAATATA
CAACCCACTA CATAACACC CACTTACCTT CCACGTCGTC CCTACTATTG ACACCTACAC GGACCCGAAT
ATGCCTATTA CCAAAGTCAT ATTCAATTGT ATAGTTGCC TCCGATATGG TTGTGGTTTC CACTACAGAT
GCCATGAAAA AGGTGTGAA GAATTTCTAC TAGACGTCAG GTGCGCTTCC CTCCAGATC CTCTAATCA
TGTTTGTGAT GCACATGATC TCTTCTTCAA CTTTACCGGA GGTATTTGCA TGGGGTGTGG TACTAGTGAG
TGTTTATCCT TTTTCTCGA ATGCATTAAT TGCAAATCCT TTTTGGGTAT TAAATGTGCT ACTTTGCCTT
CTGAGGCACA CTACAGACAC GATAGGCATC CACTCACTCT TTGCTACCGT GACTATATGA CAAGTCATCA
TTGGTGTGAG ATATGTGAAT CAAAATTATC TACATATTAT TGGTTTTATA CATGTGACTC TTGTAAAATC
ACTCTCCATG TCACCTGTTT ACTGGGGAAA GATATCTACG TGAAGCCCCA CTACACCTTC GTTTCAGATT
CAAGTCATGA TGATCAATTT GAAATTGCTC GCAATGAAGG TAACTCTCGG CAGCTTTGCT CTAATTGCAA
TTTGCCTTGT GCACAAACAT TGGTATTCAA GAGGAGAGGT GAATACGAAA GTTTTTGTAC TCTTACTTGT
TTGGGAGATT CTTTGGACTC ATAAacttac aagcctgaa gacagagaaa caacgtctga gtctgaatct
gcatgatcca ctgaaaaagc ctttcaattt cgtgtaattt tatacttga gagttaaadc tatgaaacat
atctgtact tatgttatag ttttttttag ttttaataaa tcttccagaa ataagatggc atcattcagc
cttgtatttg atgaaatcaa aatagatact caaacatttt aaccatttta tatgcaataa tagaatcga
gatttagaat tctgtttgtt tattgttggg aaagagtcta tttgataata cttgaaatgac tacgtgaact
tcttatatgg taatttaata cgtataaaaa ttgttaactg gccatttcac acaaatttaa tcgttgatca
ggccaaaatc catacagatg tatctaacga taacggccgt taactagttt ccgttacttt tcaatacaac
gtcattttac tataatcgaa acagggaaat gtgc

```

Figura 10: Seqüência do gene *At1g55430*. O sitio de inserção do T-DNA foi identificado através da técnica de TAIL-PCR. Uma busca no BLAST (NCBI, BLAST network server) permitiu localizar seqüências homólogas as seqüências que flanqueiam o T-DNA. A procura no banco de dados mostrou que o sitio de inserção do T-DNA está localizado 200 pb abaixo do códon de iniciação do gene hipotético *At1g55430*. A seta marca a posição do sitio de inserção do T-DNA.



Estrutura proteica detalhada				
Domínio		Sequência	Score	E-value
DC1	1/8	47-75	-6.4	81
DC1	2/8	179-207	21.8	0.016
DC1	3/8	234-266	25.2	0.0016
PHD	1/1	235-300	4.0	0.04
DAG_PE-bind	1/1	279-322	-12.3	5.3
DC1	4/8	292-323	40.1	4.9e-08
DC1	5/8	380-410	22.5	0.01
DC1	6/8	448-479	24.3	0.0028
DC1	7/8	501-530	1.1	11
DC1	8/8	557-587	41.9	1.5e-08

Figura 11: Estrutura detalhada da proteína At1g55430. Informações obtidas no banco de dados do genoma de *Arabidopsis thaliana* (MATDB - http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search_gene?code=At1g55430).

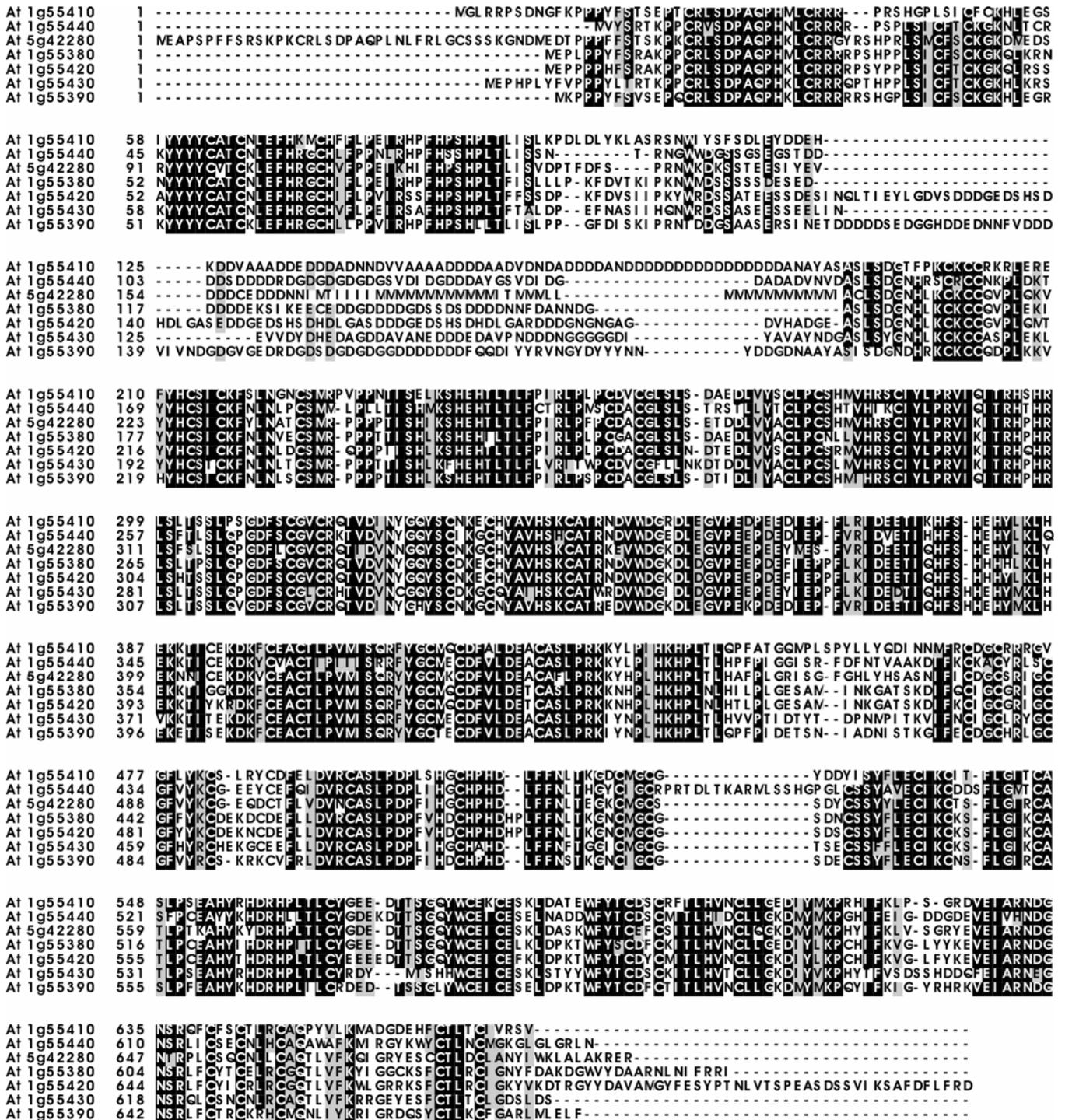


Figura 12: Alinhamento das seqüências completas de aminoácidos das proteínas da família gênica obtido pelo programa ClustalW. Alinhamento obtido pelo programa ClustalW, das seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas pertencentes à família gênica: *At1g55380*, *At1g55390*, *At1g55410*, *At1g55420*, *At1g55430*, *At1g55440*, *At5g42280*. As caixas pretas indicam resíduos idênticos, as caixas cinza representam substituições conservadas e os traços dos hachos indicam os intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento.

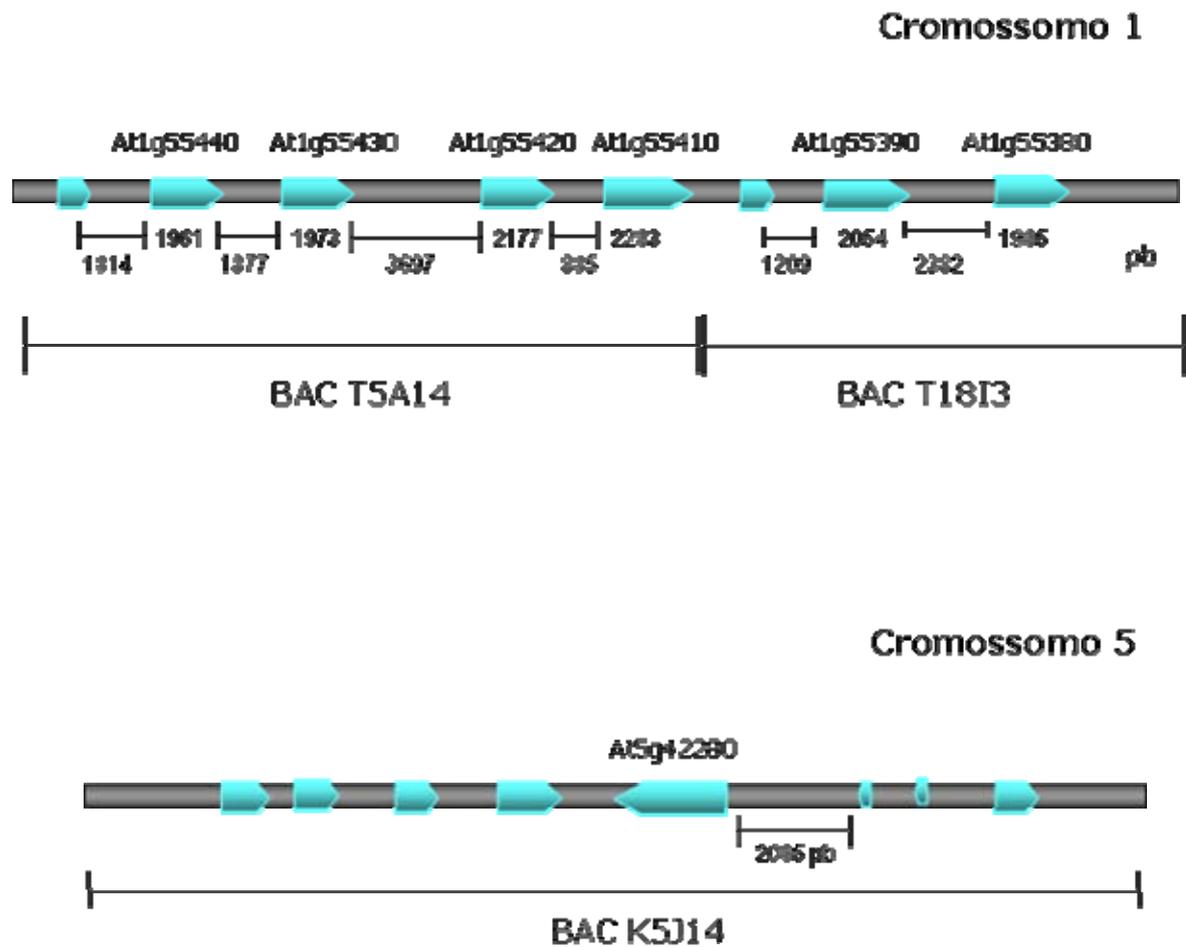


Figura 13: Representação esquemática da localização dos genes *At1g55380*, *At1g55390*, *At1g55410*, *At1g55420*, *At1g55430*, *At1g55440* e *At5g42280*. Informações obtidas no banco de dados *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR).

7.1. Perfil de expressão do *At1g55430*

A próxima etapa foi a caracterização inicial do perfil de expressão de *GFP* na linhagem *aqt*. Como o inserto está localizado a 200 pb depois do sítio de iniciação, existe uma alta probabilidade do perfil de expressão da proteína *GFP* observado nestas plantas heterozigotas corresponder à expressão real do gene *At1g55430*. A análise da expressão foi realizada inicialmente com microscopia de fluorescência (figura 14) e uma análise mais detalhada foi realizada com microscopia confocal (figura 15).

A análise por microscopia de fluorescência durante o desenvolvimento embrionário revelou a expressão de *GFP* na porção apical de embriões no estágio globular, nas extremidades que darão origem aos cotilédones nos embriões no estágio cordiforme, e restrita aos meristemas caulinares e radiculares em embriões no estágio de torpedo (figura 14 A-H). Durante o desenvolvimento pós-embrionário foi observada a expressão de *GFP* na camada L1 do MAC, na epiderme e no sistema vascular de folhas em desenvolvimento, e no sistema vascular de inflorescências (figura 14 I-Q).

A observação por microscopia confocal indica uma expressão transiente no MAC, nas estípulas e no sistema vascular de inflorescências. Foi observada ainda uma forte expressão restrita as células da epiderme, nas zonas de divisão e alongamento celular nas raízes principais e laterais, nos meristemas das raízes laterais, no sistema vascular das raízes em desenvolvimento e nos pêlos radiculares (figura 15).

Uma análise mais detalhada do padrão de expressão do gene *At1g55430* está sendo feita através de um experimento de hibridização *in situ*, que está sendo realizado em colaboração com a Dra. Janice de Almeida-Engler, do UMR-Interactions Plantes-Microorganismes et Sante Vegetale - INRA/CNRS/UNSA.

Dados preliminares confirmaram a expressão do gene *At1g55430* no meristema apical radicular (MAR), na zona de alongamento das raízes, bem como nos tricoblastos, e nas raízes mais jovens (figura 16). Também foi observada a expressão do gene nos primórdios foliares e na base dos tricomas de folhas adultas, uma fraca expressão no

MAC, no hipocótilo de plântulas cinco e oito dias após a germinação e no tecido vascular do hipocótilo (dados não mostrados).

De maneira a caracterizar melhor a expressão deste gene foram desenhados iniciadores específicos para o mRNA e análises por RT-PCR assim com PCR em tempo real foram realizadas. Essas análises demonstraram que este gene é predominantemente expresso em raízes de plantas do tipo selvagem, mas foi possível também observar baixa expressão em flores e silíquas (figura 17).

O fenótipo apresentado pelo mutante *aqt*, associado ao seu padrão de expressão, indica que o gene *At1g55430* pode estar envolvido nos processos de diferenciação do tecido vascular em folhas, inflorescências e raízes, bem como no desenvolvimento do sistema radicular de plantas de *A.thaliana*. Assim, análises mais detalhadas deste mutante são necessárias para a compreensão de sua importância durante o desenvolvimento vegetal.

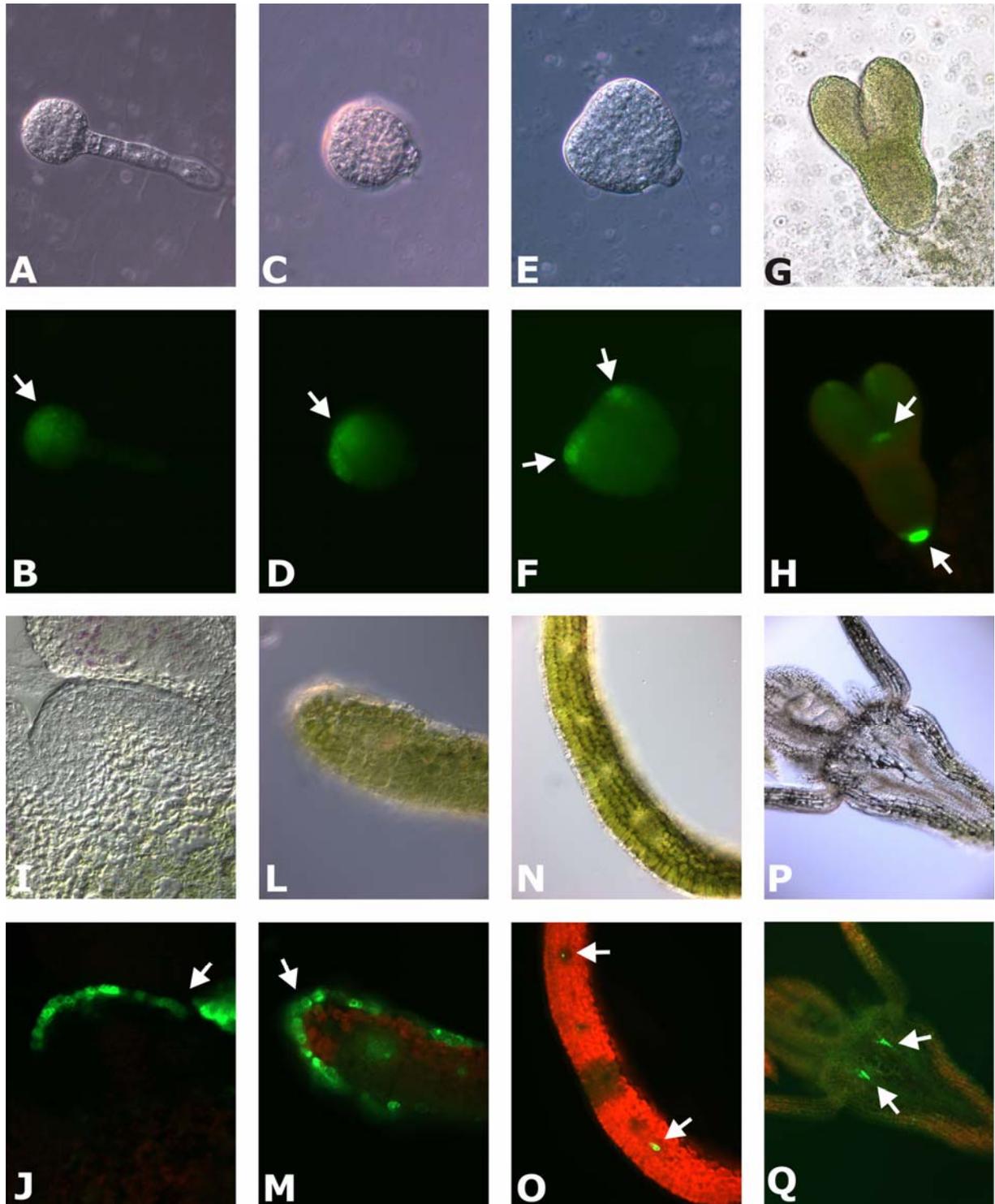


Figura 14: Análise do mutante *aqt* por microscopia de contraste interferencial e epifluorescente. Imagens de epifluorescência mostrando expressão de *GFP* na região apical de embriões globulares (B, D), nas extremidades apicais de embriões no início do estágio cordiforme (F), nos MAC e MAR do embrião no estágio torpedo (H), na camada L1 do meristema apical (J), na epiderme das folhas (M), nos feixes vasculares de folhas (O) e inflorescência (Q). Para facilitar a visualização imagens de microscopia de contraste interferencial das mesmas regiões são mostradas em A, C, E, G, I, L, N e P, respectivamente.

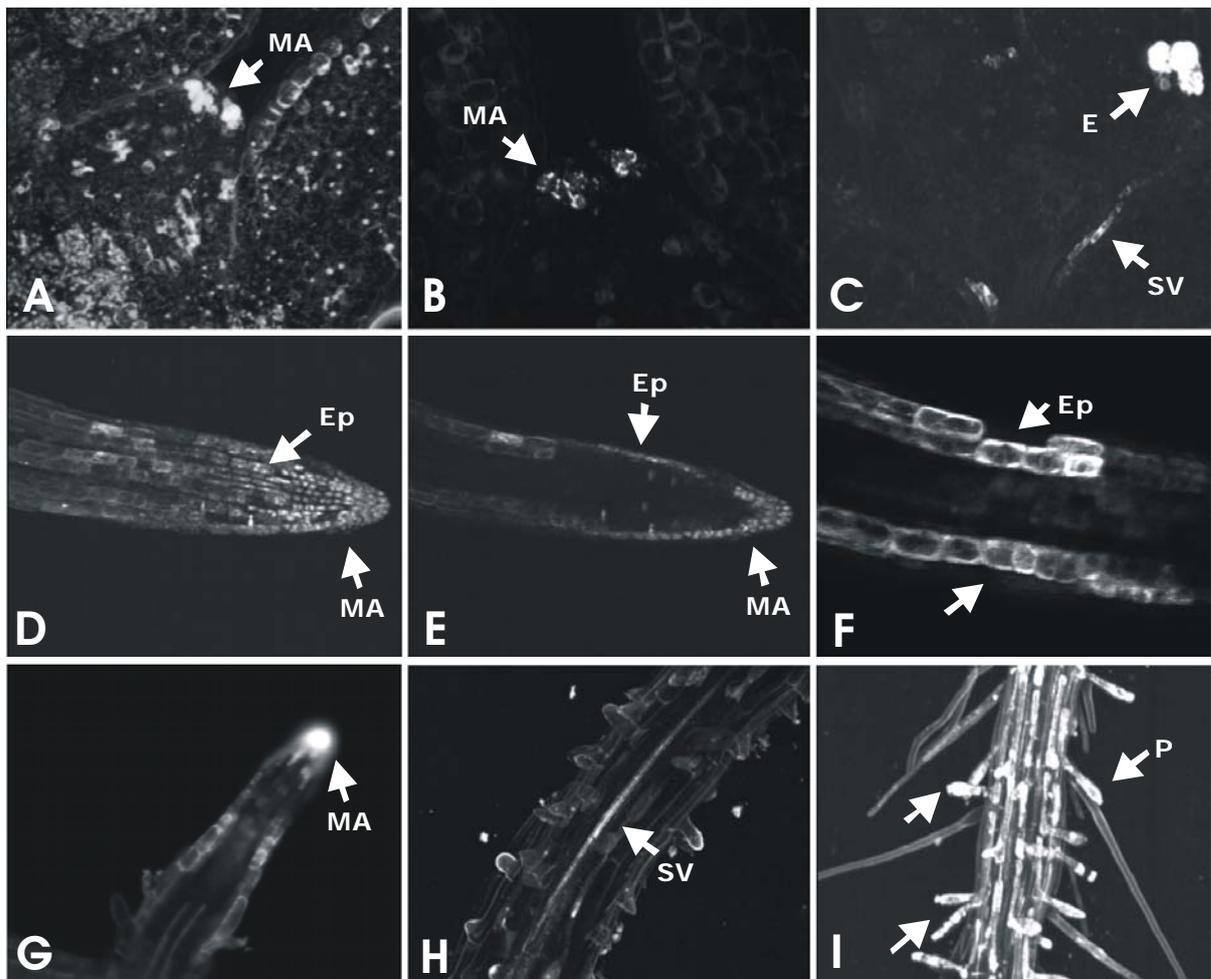


Figura 15: Análise do mutante *aqt* por microscopia confocal. Imagens de microscopia confocal de plântulas *aqt* mostrando GFP acumulada no meristema apical (A-B), nas estípulas e no sistema vascular de inflorescências (C), na epiderme da raiz principal (D-F), no meristema da raiz lateral (G), no sistema vascular da raiz (H) e nos pêlos radiculares (I). MA, meristema apical. SV, sistema vascular. E, estípula. Ep, epiderme. P, pêlos radiculares.

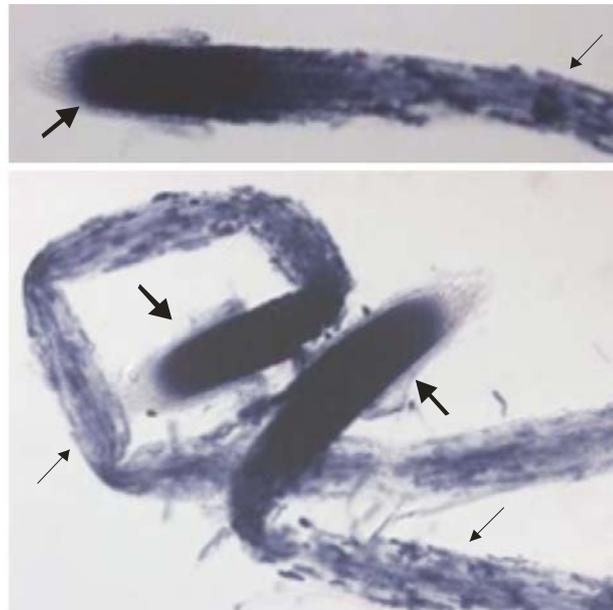


Figura 16: Níveis de expressão do mRNA *At1g55430* em raízes de *A. thaliana*. Imagens da hibridização *in situ* com sonda de mRNA complementar a região 5' não traduzida do gene *At1g55430*, mostrando forte expressão no meristema apical e nas células da epiderme (tricoblastos) de raízes laterais.

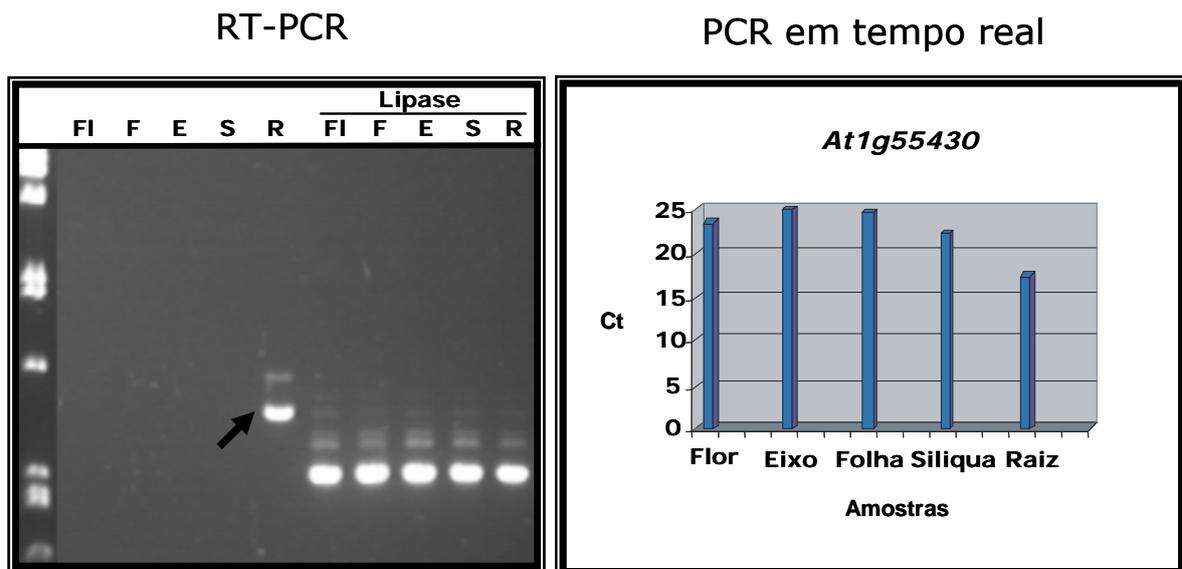


Figura 17: Análise de expressão do gene *At1g55430* usando RT-PCR e PCR em tempo real. RNA foi extraído de flores (FI), folhas (F), eixo de inflorescência (E), silíquas (S) e raízes (R) de plantas selvagens. (A) Análise por RT-PCR do nível de transcritos *At1g55430*, mostrando maior expressão do transcrito nas raízes. (B) PCR em tempo real semi-quantitativo foi usado para confirmar os níveis de expressão do gene *At1g55430* nos diferentes órgãos da planta. Este método permite a quantificação do número de cópias obtidas através da monitorização da fluorescência a cada ciclo. Quando o número inicial de cópias do DNA molde é alto, é necessário um menor número de ciclos de amplificação para que se alcance a fase linear logarítmica, que é usada como limiar para quantificação. Já se o número inicial de DNA molde é baixo são necessários mais ciclos para que se alcance o mesmo limiar. O resultado mostrado no gráfico confirma o padrão de expressão obtido por RT-PCR, com maior nível de expressão na raiz. Um baixo nível de expressão foi também detectado nas silíquas. (Ct) Limiar de intensidade de fluorescência em números de ciclos.

8. Obtenção de construções para estudo do padrão de expressão e da função do gene *At1g55430*.

Foram utilizados vetores do sistema de clonagem GATEWAY™ (Invitrogen) para as construções usadas nesta tese e estas foram obtidas previamente pelo Prof. Márcio Alves-Ferreira. O fragmento de DNA contendo o cDNA completo para o gene *At1g55430* foi obtido por RT-PCR e clonado no vetor pGEM-T. O fragmento foi seqüenciado e avaliado quanto a presença de possíveis mutações. Para as construções subseqüentes, reações de PCR foram utilizadas para amplificação de regiões definidas e para inserção das seqüências de recombinação sítio específica do sistema GATEWAY™. Uma vez obtidas, estas seqüências de interesse foram clonadas no vetor pDONR221, através de recombinação sítio específica. A seguir, os clones obtidos foram utilizados para recombinação com os vetores apropriados, gerando construções que foram utilizadas para transformação de *A. thaliana* via "floral dip" (Clough e Bent, 1998).

Para o estudo da função do gene *At1g55430* foram escolhidas as estratégias de inibição da expressão e super expressão do gene *At1g55430* em plantas transgênicas. Visando o silenciamento gênico pós-transcricional, a seqüência do gene *At1g55430*, compreendida entre as posições 315 e 471 pb, foi introduzida no vetor de pK7GHWIWG2, nas posições sense e antisense, sob controle do promotor 35S CaMV (figura 18 A - Construção RNAi::At1g55430) (Karimi *et al.*, 2002). Essa região foi escolhida por apresentar o menor grau de similaridade entre os componentes da família, não apresentando mais que 22 nucleotídeos idênticos em série para qualquer membro da família. Para o experimento de superexpressão a seqüência codificante do gene *At1g55430* foi introduzida no vetor pK2GW7, onde se encontra sob o controle do promotor constitutivo 35S CaMV (figura 18 B - Construção 35S::At1g55430) (Karimi *et al.*, 2002). Estes dois vetores apresentam ainda o gene *NPTII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, utilizado para seleção em plantas.

Para análise do padrão de expressão do gene *At1g55430* a estratégia escolhida foi a fusão da região regulatória 5' deste gene aos genes marcadores *GFP* e *GUS*, presentes

no vetor pBGWFS7, que apresenta, além dos genes marcadores citados, o gene de resistência *bar*, que confere resistência ao herbicida Basta® (glifosinato de amônio), utilizado para seleção em plantas. A região de 1877 pares de bases compreendida entre os genes *At1g55540* e *At1g55430* foi considerada inicialmente com a provável região regulatória do gene (figura 18 C - Construção p430::GFP-GUS).

As sementes produzidas pelas plantas transformadas com estas construções, após secas, foram coletadas e usadas para as análises descritas nesta tese.

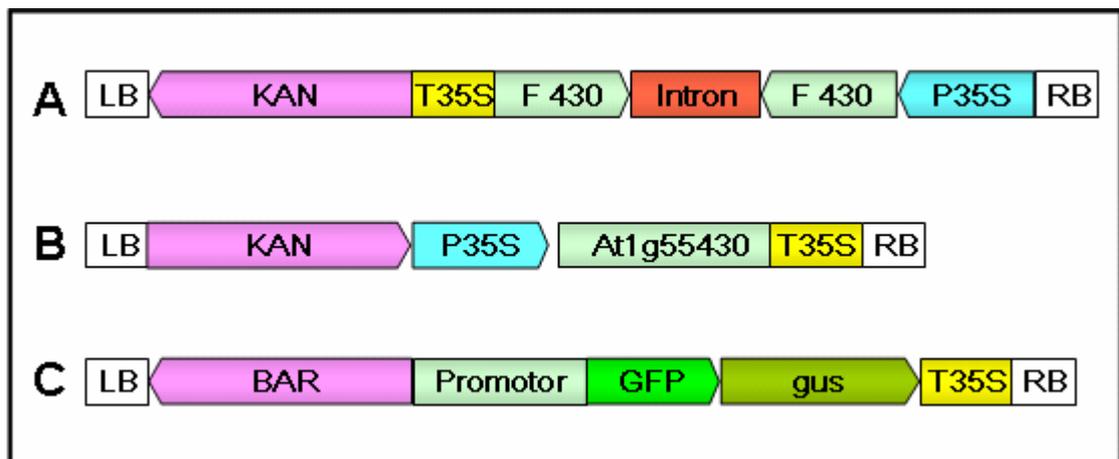


Figura 18: Representação esquemática das construções usadas para estudos de bloqueio de expressão (A), super expressão (B), e padrão de expressão do promotor (C) do gene *At1g55430*. RB, borda direita do T-DNA. LB, borda esquerda do T-DNA. P35S, promotor 35S CaMV. T35S, terminador 35S CaMV. F 430 - fragmento do gene *At1g55430* entre as bases 315 e 471. BAR, gene que confere resistência ao herbicida basta. KAN, gene *NPTII* que confere resistência ao antibiótico canamicina. *GFP* - gene da proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*. *gus* - gene da β -glucoronidase.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo o estudo da função do gene *At1g55430* através da análise do mutante obtido por inserção de T-DNA, da caracterização do padrão de expressão da região 5' regulatória deste gene, assim como da caracterização fenotípica dos mutantes de ganho de função e nocaute obtidos através de genética reversa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização molecular e fenotípica do mutante *aqt* obtido pela inserção de um T-DNA no gene *At1g55430*:
 - Análise do número de cópias do T-DNA presentes no mutante *aqt* através de análise de segregação e *Southern blot*;
 - Caracterização fenotípica da parte aérea e radicular das plantas mutantes *aqt* através de microscopia de contraste interferencial e de campo claro em material fresco e embocado em resina;
 - Análise estatística das características observadas no mutante *aqt* que diferiram das observadas em plantas tipo selvagem.
2. Caracterização do padrão de expressão da região 5' regulatória do gene *At1g55430*:
 - Obtenção de plantas transgênicas contendo o inserto como a região regulatória 5' de 1877 pb acima do ATG do gene *At1g55430*;
 - Seleção de plantas homozigotas, com uma cópia do inserto de T-DNA, através de análise de segregação em meio seletivo;
 - Análise do padrão espacial de expressão de *GUS* em diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento das plantas contendo o inserto.

3. Caracterização molecular e fenotípica das plantas transgênicas obtidas por genética reversa para ganho de função e silenciamento do gene *At1g55430*
- Seleção de plantas homozigotas com uma cópia do inserto de T-DNA para as construções *35S::At1g55430* e *RNAi::At1g55430* através de análise de segregação em meio seletivo;
 - Caracterização da expressão do gene *At1g55430* nas linhagens selecionadas para ganho de função e silenciamento;
 - Caracterização fenotípica preliminar da parte aérea e radicular das linhagens transgênicas tanto para ganho de função como para o silenciamento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Meios de cultura

Os meios de cultura de bactérias utilizados foram o meio LB líquido (Luria Bertani) que contém 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedo e 5 g de cloreto de sódio por litro, pH 7,2; o meio LB sólido, cuja composição é a mesma, acrescida de 8 g/L; e o YEB líquido que contém 1 g de extrato de levedo, 5 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 5 g de sacarose e 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro, pH 7,0; o meio YEB sólido cuja composição é a mesma, acrescida de 15 g/L de agar. Todos os meios foram esterilizados em autoclave (1 atmosfera de pressão 120°C por 15 minutos).

O meio de cultura utilizado para crescimento *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* foi o meio MS líquido (Murashige e Skoog, 1962) contendo sais do MS 1x acrescido de 0,3% de sacarose; e o meio MS sólido cuja composição é a mesma, acrescida de 0,8% de agar. Todos os meios foram esterilizados em autoclave (1 atmosfera de pressão 120°C por 15 minutos).

2. Organismos e condições de cultivo

2.1. Linhagens bacterianas

Para os experimentos de transformação foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* da cepa XL1-Blue (Stratagene), resistente à tetraciclina, e que apresenta o seguinte genótipo: recA1 , endA1 , gyrA96 (NaI^r), thi , hsdR17 ($r_k^- m_k^+$), supE44 , relA1 , lac [F' proA^+B^+ , lacI^q , $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$, $::\text{Tn10}(\text{Tet}^r)$]. Estas bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e o respectivo antibiótico de seleção à uma temperatura constante de 37 °C por um período de 16 horas. As culturas líquidas de bactérias foram crescidas em meio LB líquido, sob agitação de 280 rpm e temperatura de 37 °C, por um período de 1-16 horas, dependendo do experimento.

Nos experimentos de transformação de *A. thaliana* foi utilizada cepa C58CI (pMP90) de *Agrobacterium tumefaciens*, resistente a rifampicina e a gentamicina, contendo o plasmídeo Ti desarmado (sem os genes indutores de tumor) (Koncz e Schell, 1986). As agrobactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio YEB sólido e o respectivo antibiótico de seleção à uma temperatura constante de 28 °C por um período de 48 horas. As culturas líquidas de bactérias foram crescidas em meio YEB líquido, sob agitação de 280 rpm e temperatura de 28 °C, por um período de 24-48 horas, dependendo do experimento.

2.2. Material vegetal

Foram utilizadas plantas de *A. thaliana* do ecotipo Landsberg *erecta* (Ler). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, à temperatura de 22 ± 2°C. As sementes foram conservadas secas a 4 °C.

3. Métodos para análises de ácidos nucléicos

3.1. Extração e Purificação de DNA plasmidial

A extração e purificação dos plasmídeos foram feitas através do método de lise alcalina por minipreparação de DNA plasmidial – MINIPREP (Morelle, 1988). Uma colônia retirada da placa foi inoculada em 3 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após crescimento por 16 horas, sob agitação, à 37 °C, uma alíquota de 2 mL da cultura foi centrifugada por 1 minuto à 8000 rpm. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de solução de lise (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM; Lisozima 4 mg/mL e 400 ng/mL RNAase). Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 400 µL de solução alcalina fresca (0,2 N NaOH; SDS 1%) e o tubo de microcentrífuga foi invertido 6 vezes. A solução foi incubada no gelo por 5 minutos, 300

μL de acetato de amônio 7,5 M, pH 7,8, foram adicionados e a solução foi homogeneizada por inversão. A solução foi mantida em gelo por 10 minutos e em seguida centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubo novo de microcentrífuga. Após adição de 0,6 volume de isopropanol, o material foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Após uma nova centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% gelado (v/v) e centrifugado por 5 minutos. O sedimento seco foi solubilizado em 20 μL de água Milli Q[®] e incubado por 5 minutos à 65 °C. O material obtido foi guardado a -20 °C.

3.2. Eletroforese de ácidos nucléicos

As análises dos produtos das PCR (reação de polimerização em cadeia) e das reações de digestão foram feitas por eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose na concentração de 0,8% a 1%. O tampão utilizado foi o TAE (Tris-Acetato-EDTA - Sambrook *et al.*, 1989) na concentração de 0,5x e 1x (solução estoque 50x concentrada: 242,20g/L Tris, 37,20g/L EDTA, 136,05 g/L acetato de sódio). Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do fago Lambda (*Pharmacia*) digerido com a enzima de restrição *Pst*I. 1/10 do volume de cada amostra consistiu de tampão de amostra (0,025% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol FF e 30% de glicerol em água). Foi aplicada ao gel uma voltagem constante de 100 volts ou 75 volts. Os géis foram corados com uma solução de brometo de etídeo (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e os fragmentos foram visualizados em transiluminador com luz ultravioleta. As fotos foram feitas no aparelho Eagle Eye da Stratagene.

3.3. Digestão com enzimas de restrição

As reações de digestão de foram feitas através do uso de enzimas de restrição comerciais (GIBCO-BRL, PHARMACIA). Foram usadas 1-2 unidades das enzimas apropriadas por μg de DNA e os tampões de reação indicados pelos fabricantes. Todas as reações de digestão foram incubadas nas condições indicadas pelos fabricantes, sendo a seguir analisadas através de eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

3.4. Purificação de DNA a partir de gel de agarose

Fragmentos de DNA foram separados e isolados a partir de gel de agarose. Ao final da corrida, as bandas de interesse visualizadas foram excisadas e purificadas utilizando o Kit "CONCERT™ Gel Extraction Systems" da Gibco BRL Products, seguindo-se as condições recomendadas pelo fabricante. Foram adicionados 30 μL de tampão de solubilização (L1 - perclorato de sódio, acetato de sódio e TBE) para cada 10 mg de gel. A solução foi incubada a 50 °C por 15 minutos, invertendo o tubo a cada 3 minutos para uma melhor dissolução da agarose. A solução foi transferida para a coluna e centrifugada por 1 minuto a 12.000g. Foram adicionados mais 500 μL de tampão de solubilização (L1), a solução foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada por 1 minuto a 12.000g. Após adição de 700 μL de tampão de lavagem (L2 - cloreto de sódio, EDTA, Tris-HCl), foi feita uma nova incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 12.000g. Para remover todo o tampão a solução foi centrifugada por 1 minuto. O filtro foi transferido para um tubo de microcentrífuga novo e 35 μL de água Milli Q foram adicionados. Após incubação por 1-5 minutos à temperatura ambiente, foi realizada nova centrifugação por 2 minutos à 12.000g (para eluir o DNA). Esta solução foi guardada a - 20 °C.

4. Métodos para cultivo e transformação de bactérias

4.1. Preparo de células competentes de *E.coli*, linhagem XL1, para eletrotransformação

O preparo de células competentes foi feito seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) e iniciou com o crescimento de uma colônia de bactérias *E.coli*, da linhagem XL1, em 10 mL de meio de cultura LB (Luria Bertani). Esta suspensão foi mantida sob agitação por 16 horas à 37 °C. A seguir 10 mL da cultura fresca crescida por 16 horas foram inoculados em 1 litro de meio LB, que foi incubado à 37 °C, sob agitação de 300 rpm, até que a cultura alcançasse uma DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8. A cultura foi incubada em gelo por 30 minutos e centrifugada a 4000g por 15 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em um volume de 1 litro de água estéril gelada e a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições citadas acima. Foi feito novo descarte do sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão em um volume de 500 mL de água estéril gelada. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 20 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Foi feita nova centrifugação e o sedimento foi finalmente ressuspensão em 2 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Estas bactérias foram distribuídas em alíquotas de 40 μ L e mantidas a - 80 °C até o momento de seu uso.

4.2. Preparo de células competentes de *A.tumefaciens* para eletroporação

O preparo de células de *A.tumefaciens*, linhagem C58C1 (pMP90), competentes para eletroporação se iniciou com o crescimento de uma colônia em 5 mL de meio de cultura YEB, acrescido de Rifampicina (100 μ g/mL) e Gentamicina (40 μ g/mL). Esta suspensão foi mantida sob agitação por 16 horas à 28 °C, sob agitação de 300 rpm. A seguir a cultura fresca foi inoculada em 400 mL de meio YEB, e incubada nas condições acima, até que a cultura alcançasse uma DO_{600nm} igual 0,5. A cultura foi centrifugada a

6000g por 10 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em um volume de 10 mL de água MilliQ® estéril e a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de glicerol 10% estéril e gelado. A suspensão foi centrifugada novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em um volume de 2 mL de glicerol 10% estéril. Estas bactérias foram distribuídas em alíquotas de 40 µL e mantidas a - 80 °C até o momento de seu uso.

4.3. Transformação de bactérias por eletroporação

As construções de interesse foram introduzidas em células competentes, de *E.coli* ou *A.tumefaciens*, pelo método de eletroporação. O método foi realizado no gelo e consistiu das seguintes etapas: foram adicionados 2 µL do DNA (~20 ng) à 40 µL de suspensão de células competentes. Após 1 minutos, esta suspensão bacteriana foi transferida para cubetas de 0,1 cm de eletrodo da BIO-RAD, sendo em seguida submetidas à um pulso elétrico de 3 segundos no aparelho de eletroporação ("Gene Pulser Apparatus BIORAD"), regulado para 25 µF, 200 ohms e 1,80 kV. Imediatamente após o pulso elétrico foi acrescentado 1 mL de meio LB líquido à cubeta. A suspensão foi então transferida para tubo de crescimento e incubada, sob agitação de 300 rpm, à 37 °C por 1 hora. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em meio LB ou YEB sólido contendo os respectivos antibióticos de seleção. As placas contendo bactérias *E.coli* XL1 foram incubadas em estufa à 37 °C por 16 horas e as placas contendo *A.tumefaciens* foram incubadas em estufa à 28 °C por 48 horas.

4.4. Preparação de células de *A. tumefaciens* competentes para transformação por choque-térmico

O preparo de células competentes se iniciou com o crescimento de uma colônia de bactérias *A.tumefaciens*, da linhagem C58C1 (pMP90), em 5 mL de meio de cultura YEB,

acrescido de Rifampicina (100 µg/mL) e Gentamicina (40 µg/mL). Esta suspensão foi mantida sob agitação por 16 horas à 28 °C, sob agitação de 300 rpm. A seguir 0,5 mL da cultura fresca foi inoculada em 100 mL de meio YEB acrescido dos antibióticos, e incubada nas condições acima, até que a cultura alcançasse uma DO_{600nm} entre 0,5. A cultura foi centrifugada a 4000g por 15 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de meio YEB. Estas bactérias foram distribuídas em alíquotas de 200 µL e mantidas a - 80 °C até o momento de seu uso.

4.5. Transformação de *A.tumefaciens* por choque térmico

Foram adicionados 1 µg de DNA a suspensão de agrobactéria competente. Em seguida, as células eram colocadas em nitrogênio líquido por 5 minutos e transferidas imediatamente para um banho-maria a 37 °C, onde permaneciam por 25 minutos. Após esta etapa, as células foram transferidas para um tubo de cultura contendo 1 mL do meio YEB e incubadas a 28°C por um total de 3 horas, sendo que na primeira hora as células eram cultivadas sem agitação e nas duas horas restantes, sob agitação. Ao final das três horas, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm e o sedimento espalhado sobre placas contendo o meio YEB acrescido dos antibióticos seletivos Rifampicina (100 µg/mL), Gentamicina (40 µg/mL). As placas foram então incubadas a 28°C por 48 horas.

5. Métodos para cultivo e transformação de plantas

5.1. Condições de cultivo

Os cultivos *in vitro* foram feitos em sua maioria em placas de Petri, de 15 cm de diâmetro, contendo meio MS sólido, acrescido de antibióticos ou indutores, quando necessário. Para germinação *in vitro* as sementes foram lavadas com etanol 70% por 2 minutos e em seguida tratadas com uma solução de hipoclorito (NaOCl 5%) e 0,05% do detergente Tween 20 por 15 minutos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram

lavadas três vezes em água destilada estéril e distribuídas nas placas de Petri, que foram fechadas com esparadrapo cirúrgico "Micropore Scotch 3 M", que constitui uma barreira efetiva contra partículas mas não impede a troca gasosa com o exterior. Com o objetivo de buscar uma maior sincronia no processo de germinação das sementes, permitindo uma avaliação quantitativa mais precisa das alterações fenotípicas e estruturais, o material recém semeado foi mantido por quatro dias a 4 °C. A seguir, as placas foram transferidas para câmaras de crescimento, nas mesmas condições citadas acima, onde permaneceram por um período mínimo de duas semanas. Para alguns experimentos, as placas foram mantidas na posição horizontal.

Após duas a três semanas de crescimento as plantas de interesse foram transplantadas para o solo contendo uma mistura de terra adubada acrescida de vermiculita (proporção de 2:1) e cultivadas em câmara de crescimento nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodos citadas, até completarem seu desenvolvimento.

Em alguns casos sementes de *A. thaliana* foram germinadas diretamente em terra adubada:vermiculita (proporção de 2:1), e cultivadas em câmara de crescimento nas condições citadas acima. Neste caso não houve necessidade de desinfecção prévia das sementes.

Para evitar o contato entre as plantas adjacentes, as plantas foram isoladas com cilindros de plástico transparente, denominados aracons (aracons, Beta Tech). O recolhimento das sementes contidas na totalidade das siliquis de uma planta (o produto de sua autofecundação) foi feito pressionando uma planta seca em uma pequena peneira, sobre uma folha de papel. Este procedimento possibilita recolher as sementes que caem sobre as folhas de papel e eliminar os restos de siliquis e outras partes secas da planta.

As sementes das estirpes selvagens e mutantes foram armazenadas em microtubos (1,5 mL) convenientemente rotulados, e conservadas a 4 °C, durante pelo menos uma semana.

5.2. Transformação genética de *A. thaliana* via floral dip

Plantas transgênicas de *A. thaliana* foram obtidas pelo método "Floral Dip" (Clough e Bent, 1998), pelo qual construções foram introduzidas estavelmente no genoma da planta através de transformação mediada por *A. tumefaciens*. Como o tecido alvo da transformação genética são os óvulos imaturos é aconselhável que as plantas a serem transformadas apresentem um grande número de botões florais fechados. Assim, visando à quebra da dominância apical e, conseqüentemente, a obtenção de múltiplos eixos de inflorescência, plantas selvagens crescidas em câmara de crescimento até seu estágio de floração tiveram seus eixos de inflorescência removidos. Após um período de 5-7 dias as plantas, que já apresentam novos eixos de inflorescência, podem ser transformadas.

O método de transformação consiste na embebição dos eixos de inflorescência em uma solução contendo cultura de células de agrobactérias. Esta cultura foi obtida pelo cultivo de células de agrobactérias contendo a construção p430::GFP-GUS por 24 horas à 28 °C em 5 mL de meio YEB acrescido dos respectivos antibióticos de seleção. A seguir a cultura crescida foi adicionada a 200 mL de meio, acrescido dos antibióticos, e cultivada à 28 °C até atingir a DO_{600} de 0,8. A cultura crescida foi centrifugada por 20 minutos a 5000g e o precipitado ressuspensão em 200 mL de sacarose 5% contendo Tween 80 0,02%. Este surfactante reduz a tensão superficial e ajuda na penetração da bactéria até em tecidos menos acessíveis da planta.

Após a embebição, as plantas inoculadas foram cobertas por uma redoma plástica por 16 horas, visando manter a umidade do local e possibilitar uma melhor mobilidade das bactérias no tecido do hospedeiro. A infiltração foi repetida após uma semana e as plantas foram isoladas pelo uso de "aracons". As sementes foram coletadas após 5-8 semanas da segunda inoculação e mantidas a 4 °C até o momento do uso.

Estas sementes foram desinfetadas com descrito no item 3.7.1 e crescidas em meio MS contendo 0,3% sacarose e agente seletivo apropriado por 2-3 semanas. As plantas resistentes foram passadas para terra e crescidas em câmara de crescimento

para a obtenção de sementes. Cada indivíduo transplantado representa uma linhagem independente.

5.3. Cruzamento manual

Para o cruzamento manual são selecionadas duas estirpes de *A. thaliana*: uma das estirpes é escolhida como doadora e a outra como receptora de pólen (parentais masculina e feminina, respectivamente). Após a escolha de um dos botões florais presentes no ápice do eixo de inflorescência da parental feminina foi feita a remoção de todas as flores maduras, presumidamente autofecundadas. Dos botões florais restantes foram extirpadas duas sépalas, duas pétalas e os estames imaturos, obtendo desta forma flores cuja única estrutura funcional é um pistilo não fecundado. Estas manipulações foram feitas com pinças microcirúrgicas previamente imersas em etanol 95%, visando eliminar qualquer traço de pólen contaminante. Três dias após a realização deste procedimento, foi retirada da planta escolhida para ser doadora de pólen uma flor madura, apresentando as pétalas abertas e estames em cujas anteras eram visíveis os grãos de pólen. Os estames foram então extirpados e suas anteras foram colocadas em contato com o pistilo da flor receptora do pólen. O cruzamento é finalizado marcando o eixo, junto com a flor fecundada manualmente, com uma etiqueta com a indicação do genótipo parental masculino empregado para polinização. Finalmente, a planta que foi fecundada por este procedimento foi devolvida a câmara de crescimento, onde permaneceu até a formação, amadurecimento e coleta da siliqua.

5.4. Seleção *in vitro* de plantas transformadas

Para seleção *in vitro* as sementes foram desinfectadas e germinadas em meio MS contendo 0,3% sacarose e o agente seletivo adequado, como descrito no item 3.7.1. Duas a três semanas após a germinação as plântulas foram analisadas e as plantas resistentes foram transplantadas para o solo e cultivadas em câmara de crescimento.

6. Métodos para análise fenotípica das plantas transgênicas

6.1. Análise fenotípica do sistema aéreo

Sementes das gerações T2 e T3 do mutante *aqt* e das linhagens RNAi::At1g55430 e 35S::At1g55430 foram germinadas em solo como descrito anteriormente e analisadas quanto à apresentação de alterações fenotípicas. As bandejas foram então transferidas para câmara de crescimento, onde permaneceram sendo avaliadas semanalmente com relação ao tempo de floração, ramificação dos eixos de inflorescência, número e forma dos botões florais e das flores, até a fase de senescência e coleta das sementes. As fotografias das plantas foram feitas usando máquina digital.

Para análise da morfologia, forma e padrão de venação, cotilédones e folhas de *Arabidopsis* foram removidos pelo pecíolo e clareados. Visando a remoção da clorofila as folhas foram inicialmente incubadas por 20 minutos em presença de etanol 95% a 70 °C minutos e a seguir em uma solução de lactofenol (ácido láctico, fenol, glicerol e água em iguais proporções). A seguir foram montadas lâminas para observação do padrão de venação em campo escuro (lupa binocular Leika M32, dotado de dispositivo fotográfico Leika wild MPS 52).

6.2. Análise fenotípica do sistema radicular

Para análise da morfologia e complexidade do sistema radicular sementes de *Arabidopsis* foram germinadas em placas de Petri contendo meio MS como descrito anteriormente, vernalizadas por quatro dias a 4 °C e então transferidas para câmara de crescimento. Após duas e oito semanas de crescimento em meio de cultura, as raízes das plantas foram colocadas em lâminas de microscopia contendo glicerol e analisadas em lupa binocular (Leika M32, dotado de dispositivo fotográfico Leika wild MPS 52) e microscópio ótico (Leika DMR dotado de dispositivo fotográfico Leika DMLD).

Para análise do desenvolvimento radicular, placas de Petri contendo sementes alinhadas foram crescidas na posição vertical, de forma a permitir uma melhor observação e análise do desenvolvimento radicular. Para o cálculo do aumento no tamanho da raiz, o tamanho médio das raízes de cada linhagem foi comparado a média dos controles de cada experimento. Para minimizar a variação da resposta em relação às condições de cultura, os resultados foram comparados dentro de cada experimento e não entre experimentos diferentes. As fotografias do sistema radicular foram feitas utilizando máquina digital.

7. Análise histológica das plantas

7.1. Fixação de material para microscopia

Para observação de cortes semi-finos, regiões de raízes localizadas próximo à base e segmentos de eixo localizados a 0,5 mm do ápice e da base de eixos de inflorescência de *Arabidopsis* foram pré-fixados em solução contendo formaldeído 4% e glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,5, por pelo menos 1 hora, sob vácuo. A seguir o tecido pré-fixado foi lavado em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,5, por 30 minutos, duas vezes consecutivas. As amostras foram desidratadas gradualmente em acetona (uma vez, por 1 hora, em acetona, 15%, 30%, 50%, 70%, 90%, respectivamente, e três vezes por 30 minutos em acetona 100%) e infiltradas com uma mistura de resina Spurr/acetona 100% nas proporções de 1:3, 2:2 e 3:1 e, posteriormente, em apenas em Spurr (24 horas em cada etapa). Após duas trocas em Spurr a cada 24 horas, o tecido foi colocado em formas de silicone cheias de resina Spurr pura, e a polimerização foi feita em estufa a 70 °C por 14 horas.

Os cortes histológicos semi-finos (3 µm) foram feitos em micrótomo "Rotary Microtome HM325" (MICROM). Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,1% e observados ao microscópio ótico (Leika DMR) em busca de alterações estruturais e as

imagens capturados utilizando-se o programa AnalySIS[®] 3.0 (Soft Imaging System) ou o dispositivo fotográfico Leica DMLD.

8. Métodos para análise molecular das plantas transformadas

8.1. Análise do padrão de segregação do transgene

Foram realizados experimentos visando à caracterização do padrão de segregação do transgene na progênie das linhagens obtidas. Para tal, as sementes de plantas transformadas foram plaqueadas em meio MS acrescido do agente seletivo. Após duas semanas de crescimento em placas, foi realizada uma contagem das plântulas resistentes e sensíveis ao agente seletivo, para análise de segregação.

8.2. Extração de DNA genômico de *A. thaliana*

Após maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido foram adicionados 900 µL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, PVP 40 2% e 2-β-mercaptoetanol 0,2%). Os tubos foram agitados vigorosamente e a seguir incubados a 65°C por 1 hora. O material foi resfriado a temperatura ambiente e de-proteinizado através de extração, sob agitação por 5 minutos, com 1 volume de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e foram adicionados 0,1 volume de solução de precipitação (CTAB 10% e NaCl 1,4 M). A extração com clorofórmio:álcool isoamílico foi repetida mais duas vezes. A seguir foram adicionados dois terços do volume em isopropanol e o material foi incubado a 4 °C por 16 horas. Após centrifugação por 30 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Após secar, o precipitado foi ressuspensão em 50 µL de água MilliQ estéril contendo 20 ng/µL de RNase.

8.3. Extração de RNA de *Arabidopsis*

Para extração do RNA total, folhas e raízes de plantas selvagens e transformadas foram maceradas em nitrogênio líquido. Foi acrescentado a cada 0,3 mg de material macerado 600 µL do tampão de extração (Tris-HCl 200mM, pH 8,0; EDTA 200mM e SDS 1%) e 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O material foi agitado vigorosamente e centrifugado por 15 minutos à 14000 rpm. A seguir foram feitas mais uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e uma apenas com fenol. O RNA foi precipitado com cloreto de Lítio 4M à 4^oC durante 16 horas, e em seguida centrifugado por 20 minutos a 4^oC. O precipitado de RNA foi então lavado três vezes com etanol 70%, posto para secar a vácuo e ressuspenso em 50µL de água MilliQ[®].

8.4. Análise por *Southern blot*

Para a análise de *Southern blot* (Sambrook *et al.*, 1989) 10-20 µg de DNA genômico de plantas tipo selvagem e transformadas foram digeridos com enzimas de restrição de interesse e separado através de eletroforese em gel de agarose. O DNA digerido foi separado em gel de agarose 1%, a 30 volts, em tampão TAE 1x, por cerca de 6 horas. Após a eletroforese, o gel foi lavado uma vez na solução de depuração (HCl 0,25 N), por 10 minutos. A seguir foi lavado duas vezes na solução de desnaturação (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) e duas vezes na solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M; EDTA 1 mM; NaCl 1,5 M) em períodos de 1 hora. O DNA presente no gel foi então transferido por capilaridade para uma membrana de nylon Hybond-N (Nucleic acids transfer - Amersham Corporation), em solução SSC 15X (NaCl 1,5 M, citrato de sódio 1,5 M, pH 7,0) por um período de aproximadamente 16 horas. A membrana foi incubada por 2 horas a 80 °C e exposta por 3 minutos à luz ultravioleta, visando fixar o DNA. A seguir a membrana foi lavada duas vezes rapidamente em SSC 2x, seca à temperatura ambiente e armazenada a 4 °C até o momento do uso.

8.5. Análise por *Northern blot*

Para os experimentos de *Northern blot* foram utilizados cerca de 20 µg de RNA total de cada amostra. As amostras de RNA foram incubadas por 10 minutos a 65°C, em uma solução contendo formamida 50%, tampão MOPS 1x (9,3 mM de MOPS, 0,02 mM de acetato de sódio e 0,48 mM de EDTA), formaldeído 6%, 50 ng de brometo de Etídio e tampão de amostra (2 corantes). A seguir, o RNA foi separado em gel contendo agarose 1,5% acrescido de tampão MOPS 1x e formaldeído 7%. Após a corrida em tampão MOPS 1x a 20 volts, o RNA presente no gel foi transferido para membrana de nylon Hybond-N (Amersham Corporation) por capilaridade pelo mesmo procedimento usado no *Southern blot*.

8.6. Obtenção de sondas

Foram utilizados como sondas nos experimentos de *Southern* e *Northern blot* os fragmentos correspondentes ao gene *NPTII* e a região compreendida entre as bases 92 e 1022 do gene *At1g55430*, respectivamente.

Para obtenção de fragmentos correspondentes ao gene *NPTII* foi utilizada a técnica de PCR. Os iniciadores utilizados na PCR para a seqüência *NPTII* foram na região amino-terminal o 5' TGT TCC GGC TGT CAG CGC AG 3' e na região carboxi-terminal o: 5' TCG GCA AGC AGG CAT CGC CA 3'. Foi feita uma reação contendo: 100 ng de cada um dos iniciadores; 200 ng do plasmídeo pK7FWG2, contendo a seqüência do gene *NPTII*; 0,2 mM nucleotídeos trifosfatados; 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e tampão na concentração de uso indicada pelo fabricante. As condições utilizadas na PCR foram: 5 minutos à 94 °C, para desnaturar a fita de DNA; 1 minuto à 94 °C; 2 minutos à 66 °C, para anelamento dos iniciadores; 1 minuto à 72 °C, para extensão dos iniciadores; repetição dos passos 2 à 4 por 15 vezes; e 10 minutos à 72 °C, para extensão completa das novas fitas. Como controle negativo da reação foi utilizada água estéril no lugar do DNA. O aparelho termoregulador utilizado foi o modelo PTC-100 da empresa M.J.

Research. A análise dos produtos foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% como descrito no item 3.5.2. Visando a purificação do produto proveniente da PCR foi feito um tratamento com fenol:clorofórmio, seguido de precipitação com 0,5 M de cloreto de sódio e 2,5 volumes de etanol por 2 horas a -20°C . Após centrifugação o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 10 μL de água MilliQ[®].

Os fragmentos correspondentes a região interna do gene *At1g55430* compreendida entre as bases 92 e 1022 foram obtidos através de reação de digestão do cDNA *At1g55430* clonado no plasmídeo pGEM-T easy com as enzimas *AvaI* e *HindIII*. Visando o isolamento do fragmento de interesse, o material obtido foi separado através de eletroforese em gel de agarose. Ao final da corrida, a banda de interesse visualizada foi excisada e o DNA purificado utilizando o Kit "CONCERT™ Gel Extraction Systems" da Gibco BRL Products, seguindo-se as condições recomendadas pelo fabricante (item 3.5.4).

8.7. Preparo de sonda radioativa

As sondas radioativas utilizadas nos experimentos de *Southern blot* e *Northern blot* foram preparadas pelo método *random priming*. Aproximadamente 30 ng dos fragmentos correspondentes às sondas foram desnaturados a 95°C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 3 μL de dDTP 5 Mm, 12 μL de mix de marcação de sonda 2,5X (125mM Tris-HCl, pH 6,8; 12,5 mM MgCl_2 ; 25 mM de β -mercaptoetanol; 1 mg/mL BSA e 750 $\mu\text{g/mL}$ $\text{Pd}(\text{N})_6$ Random Hexamer 5'-Phosphate), 1 unidade de klenow (fragmento maior da DNA polimerase de *E. coli*) e 3 μL de α -dCTP³². Após incubação de 2 horas a 37°C , o material foi precipitado pela adição de 1,2 μL de espermina 0,25 M, incubado em gelo por 15 minutos e centrifugado por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 100 μL de tampão (10 mM EDTA e 0,5% SDS). A porcentagem de incorporação foi avaliada com auxílio de um contador Geiger.

8.8. Hibridização

Nos experimentos de *Northern* e *Southern blot*, as membranas foram pré-hibridizadas por 2 horas a 65 °C em solução contendo 1 mM EDTA, 0,5 M tampão fosfato e 7% SDS. Após este período a sonda radioativa previamente desnaturada por 5 minutos a 100°C foi adicionada a esta solução e foi feita incubação por 16 horas a 65 °C (Church e Gilbert, 1994). A seguir a membrana foi lavada por 30 minutos em cada uma das seguintes soluções: SSC 3X e SDS 0,1%, SSC 1X e SDS 0,1% e SSC 0,1X e SDS 0,1%. Após cada lavagem, a radioatividade dos filtros foi monitorada com auxílio de um contador Geiger, para determinação do término das lavagens. As membranas foram expostas a filme de auto-radiografia X-OMAT (Kodak), e mantidas a -80 °C pelo tempo necessário para a detecção do sinal.

8.9. RT-PCR

As reações de RT-PCR (síntese de cDNA sobre um molde de mRNA realizada pela enzima transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR) foram feitas a partir de 2 µg de RNA total, ao qual foram adicionados 1 µg do iniciador Poli-T e dNTP 0,2mM. Após incubação à 70 °C por 10 minutos, foram adicionados DTT 10mM, 1 µL da enzima M-MLV (Gibco BRL) e tampão (Tris 50 mM, KCL 75 mM e MgCl₂ 3 mM). Após incubação de 2 horas a 45 °C, 3 µL das reações foram utilizadas como molde para reações de PCR.

Para reação de PCR foram utilizados os iniciadores 5' GAG GGA CAG CTC CGC TTC AG 3' para região amino-terminal e 5' TCG GGT TCT TCA GGC ACT CC 3' para a região carboxi-terminal. Foi feita uma reação contendo: 200 ng de cada um dos iniciadores; 0,2 mM nucleotídeos trifosfatados; 1,5 mM cloreto de magnésio; 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e tampão na concentração de uso indicada pelo fabricante. As condições utilizadas na PCR foram: 5 minutos à 96 °C; 30 segundos à 94 °C; 30 segundos à 60 °C; 1 minuto à 72 °C; repetição dos passos 2 à 4 por 25 vezes; e 10 minutos à 72 °C. Como

controle negativo da reação foi utilizada água estéril no lugar do DNA e como controle interno foi utilizada a actina. O aparelho termoregulador utilizado foi o modelo PTC-100 da empresa M.J. Reasearch.

9. Detecção histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase

Ensaio histoquímico para detecção da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) foram realizados de acordo com o protocolo desenvolvido por Jefferson *et al.* (1987), com algumas modificações. Órgãos inteiros foram pré-incubados com acetona 90% por 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para remoção da cutícula e facilitação da penetração do substrato (Hemerly *et al.*, 1993). Os órgãos ou cortes foram incubados numa solução contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β -D-glucoronídeo (X-gluc) 0,2 mM e tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. As amostras foram então incubadas por um período de 16 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o desenvolvimento da reação, os tecidos verdes foram incubados com etanol 70% para remoção da clorofila, sendo posteriormente montados em lâminas para observação em microscópio.

10. Ensaio de resposta à auxina

Para testar a capacidade de resposta à auxina, plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem e mutante foram crescidas em meio MS sólido. Cinco dias após a germinação os cotilédones foram destacados, transferidos para meio MS líquido acrescido de 0,3 mg/L de IBA e incubados por 7 dias a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante e leve agitação (50 rpm). Após este período os cotilédones foram analisados em lupa em busca de raízes adventícias (Mattsson *et al.*, 2003 - com modificações).

Em outro experimento plantas tipo selvagem e mutante foram crescidas em meio MS sólido por duas semanas e a seguir transferidas para meio MS sólido acrescido de 0,3 mg/L de IBA, onde permaneceram até completar seu desenvolvimento.

Alternativamente, plantas tipo selvagem e mutantes também foram crescidas diretamente em meio MS suplementado com 0,3 mg/L de IBA.

11. Programas de computador utilizados

O programa MatInspector - Genomatix (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>) foi usado para busca de possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição presentes na seqüência regulatória 5' do gene *At1g55430*.

Os programas InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) e ProDom (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/form.php>) foram utilizados na busca de domínios conservados nas proteínas.

Os programas MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/index/clustalw.html) foram usados para o alinhamento das seqüências gênicas.

As análises de homologia de seqüência foram feitas através do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

A lista de proteínas de *Arabidopsis* contendo o domínio DC1 foi obtida no banco de dados do genoma de *Arabidopsis thaliana* (MATDB) (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>).

As análises de seqüências de DNA foram feitas através do programa Vector NTI e as ferramentas gráficas utilizadas para apresentação dos dados e resultados foram os programas *Excel*, *PowerPoint* e *Corel Draw*.

Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene *At1g55430*

Family/ matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
P\$MYCL/ICE.01	ICE (inducer of CBF expression 1), AtMYC2 (rd22BP1)	0.95	407 - 417	412	(+)	0.863	0.965	tACA G ttgctg
			428 - 438	433	(-)	1.000	0.953	tACA T ttgaa t
			713 - 723	718	(+)	1.000	0.970	gACA T gtgcta
			797 - 807	802	(+)	0.954	0.961	aACA A gtgg t c
			860 - 870	865	(+)	1.000	0.953	tACA T gtgact
			1062 - 1072	1067	(+)	0.954	0.972	tACA A atgg t a
			1586 - 1596	1591	(-)	0.863	0.959	tACA G ctgtt t
			1721 - 1731	1726	(+)	0.954	0.978	tACA A ctgtt t
			2418 - 2428	2423	(+)	0.954	0.972	aACA A atgct t
			2895 - 2905	2900	(-)	1.000	0.953	aACA T ctgccc
2928 - 2938	2933	(-)	1.000	0.964	tACA T ctgt t			
P\$GTBX/GT1.01	GT1-Box binding factors with a trihelix DNA-binding domain	0.85	799 - 815	807	(+)	0.843	0.851	caagt G TCAatattg g
			982 - 998	990	(+)	0.968	0.858	atgat G TAActctcg g
			1312 - 1328	1320	(+)	1.000	0.855	ttt g ct G TAttat a tc
			1474 - 1490	1482	(-)	1.000	0.866	tctccc G TAAat t tcga
			1486 - 1502	1494	(+)	1.000	0.862	ggagaa G TAAatg t aac
			1804 - 1820	1812	(-)	0.843	0.859	aaaa g G TGAat t tata
			1839 - 1855	1847	(-)	0.843	0.927	cata g G TGAat t tttt
			2215 - 2231	2223	(+)	1.000	0.854	tttag t G TAg t cttt g
			2453 - 2469	2461	(-)	1.000	0.866	tgatt g G TAttat t aa
P\$DOFF/PBOX.01	Prolamin box, conserved in cereal seed storage protein gene promoters	0.75	430 - 446	438	(+)	1.000	0.847	tcaaat g TAAGctt g c
			878 - 894	886	(-)	1.000	0.867	cgat g TAAG t g a tc
			1378 - 1394	1386	(-)	0.761	0.777	tggt g ggAAA a g c aa
			1588 - 1604	1596	(+)	0.776	0.760	acagct g AA T g t aca
			1649 - 1665	1657	(-)	1.000	0.821	tg t tttTAAG t ag a c
			1860 - 1876	1868	(-)	0.761	0.761	aaaa g TA A AC t ca g
			1891 - 1907	1899	(-)	0.761	0.799	taaa g TA A AC t ca g
			1898 - 1914	1906	(-)	0.761	0.814	taatt g AAA t g t aa
P\$AHBP/WUS.01	Homeodomain protein WUSCHEL	0.94	448 - 460	454	(-)	1.000	0.963	caact T A A T c ggt
			1194 - 1206	1200	(+)	1.000	0.963	gggt T A A T c ttt
			1489 - 1501	1495	(+)	1.000	1.000	gaagt T A A T g t a a
			1681 - 1693	1687	(+)	1.000	0.963	ttgt T A A T c atc
			1773 - 1785	1779	(+)	1.000	1.000	tggt T A A T g cat
			2047 - 2059	2053	(+)	1.000	0.963	tttt T A A T c iat
			2394 - 2406	2400	(-)	1.000	0.963	cta a t T A A T c aac
2776 - 2788	2782	(+)	1.000	1.000	ttag t T A A T g aga			
P\$TBPF/TATA.02	Plant TATA box	0.90	1690 - 1704	1697	(+)	1.000	0.922	catc T A T A t atcc a a
			1800 - 1814	1807	(+)	1.000	0.917	aaaa T A T A a at t cc a c
			1972 - 1986	1979	(-)	1.000	0.963	aatt T A T A a at t ct
			1975 - 1989	1982	(+)	1.000	0.904	tatt T A T A a at t tt g
			2053 - 2067	2060	(+)	1.000	0.912	aatc T A T A t at t g t c
			2088 - 2102	2095	(+)	1.000	0.909	tttc T A T A t at t tt t
			2266 - 2280	2273	(+)	1.000	0.908	cg t c T A T A t at g at t
			2465 - 2479	2472	(-)	1.000	0.903	gaat T A T A a at g at t

■ Sítios presentes dentro da sequência de 1877 pb usada na construção p430::GFP-GUS

Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene *At1g55430* (continuação)

Family/ matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
P\$GAGA/GAGABP.01	(GA)n/(CT)n binding proteins (GBP, soybean; BBR, barley)	0.75	2720 - 2744	2732	(-)	1.000	0.791	gata gaAGAG gattgagaatagt
			2817 - 2841	2829	(+)	1.000	0.796	gcta agAGAG atagatagagagaga
			2819 - 2843	2831	(+)	0.750	0.828	ta agAGAT agatagagagagaga
			2821 - 2845	2833	(+)	0.750	0.782	agag agATAG atagagagagagaaac
			2823 - 2847	2835	(+)	0.750	0.812	agag atAGAT agagagagagaaacaa
			2825 - 2849	2837	(+)	0.750	0.818	agat agATAG agagagagagacaaga
			2831 - 2855	2843	(+)	1.000	0.758	atag agAGAG agaacaagagacttg
			2833 - 2857	2845	(+)	1.000	0.805	agag agAGAG aacaagagacttgaa
O\$RPOA/APOLYA.01	Avian C-type LTR PolyA signal	0.71	342 - 362	352	(+)	1.000	0.745	ata caTAAAc cccacttacc
			1665 - 1685	1675	(+)	0.750	0.758	aata TAATa atccgattggt
			1801 - 1821	1811	(+)	1.000	0.714	aa ataTAAAt caccttttt
			2455 - 2475	2465	(+)	0.750	0.723	aata TAAC caatcatttata
			2541 - 2561	2551	(-)	1.000	0.754	gt gaaTAAa aactgattcag
			2618 - 2638	2628	(+)	0.750	0.714	aaa aaAAAA atgataatlttat
			2622 - 2642	2632	(-)	1.000	0.841	cata TAAa atcatatltttt
P\$AHBP/ATHB5.01	HDZip class I protein ATHB5	0.89	977 - 989	983	(-)	0.936	0.896	acc ATCAtt gtga
			1536 - 1548	1542	(-)	0.829	0.904	tg aATAAt tttt
			1538 - 1550	1544	(+)	1.000	0.958	aaa ATTAtt cata
			2461 - 2473	2467	(-)	0.829	0.899	taa ATGAtt ggtt
			2463 - 2475	2469	(+)	0.936	0.977	cca ATCAtt tata
			2686 - 2698	2692	(-)	0.829	0.902	gt aATGAtt gaga
			2688 - 2700	2694	(+)	0.936	0.977	tca ATCAtt actc
P\$GTBX/SBF1.01	SBF-1	0.88	1205 - 1221	1213	(+)	1.000	0.901	tttg tgTAA atltta
			1917 - 1933	1925	(+)	1.000	0.927	atltt cgTAA tttct
			2045 - 2061	2053	(-)	1.000	0.885	atatag TAAa aaaag
			2300 - 2316	2308	(-)	1.000	0.898	tg tcagTAA ttaaga
			2378 - 2394	2386	(-)	1.000	0.950	ctag cgTAA aagac
			2447 - 2463	2455	(-)	1.000	0.903	gtt attaTAA atlttg
			2773 - 2789	2781	(+)	1.000	0.898	tttt agTAA tgagaa
P\$CCAF/CCA1.01	Circadian clock associated 1	0.85	246 - 260	253	(+)	1.000	0.857	cca altatAATC ict
			262 - 276	269	(-)	1.000	0.952	aacc ataaAATC icc
			1212 - 1226	1219	(-)	0.757	0.860	aaaa ataaAAT ltaa
			1794 - 1808	1801	(+)	0.757	0.860	taaaaa aaAAT ltaa
			1867 - 1881	1874	(-)	0.766	0.862	gaaaa aaAATG ltaa
			2093 - 2107	2100	(-)	0.757	0.859	aaaca aaAAT lat
P\$CAAT/CAAT.01	CCAAT-box in plant promoters	0.97	376 - 384	380	(-)	1.000	0.975	ca CCAAt cg
			592 - 600	596	(-)	1.000	0.979	ac CCAAt gc
			809 - 817	813	(-)	1.000	0.972	ca CCAAt at
			1548 - 1556	1552	(-)	1.000	0.975	aa CCAAt at
			2461 - 2469	2465	(+)	1.000	0.984	aa CCAAt ca
			2587 - 2595	2591	(-)	1.000	0.983	ca CCAAt gg
P\$MADS/MADSA.01	Determines identity of floral meristem and sepal and petal development	0.81	1213 - 1233	1223	(-)	1.000	0.814	agaaa caAAAA ltaaattta
			1247 - 1267	1257	(+)	1.000	0.830	gt ttgatgAAA tgaaatga
			1253 - 1273	1263	(+)	1.000	0.833	tgaaa tgAAA tgataaaat
			1894 - 1914	1904	(-)	1.000	0.877	ta attgtAAA tgtaaactc
			2178 - 2198	2188	(+)	1.000	0.814	ataa catAAA aggaagtt
			2616 - 2636	2626	(+)	1.000	0.849	aaaa aaAAA tgataatltt

■ Sítios presentes dentro da sequência de 1877 pb usada na construção p430::GFP-GUS

Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene *At1g55430* (continuação)

Family/ matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
P\$MYBL/MYBPH3.02	Myb-like protein of <i>Petunia hybrida</i>	0.76	1573 - 1587	1580	(-)	1.000	0.800	ttaattTAGTtgata
			1748 - 1762	1755	(+)	1.000	0.765	cctcatTAGTtagca
			2370 - 2384	2377	(+)	1.000	0.789	gagagtTAGTcttat
			2441 - 2455	2448	(-)	0.817	0.805	taaattTTGTtaagc
			2771 - 2785	2778	(+)	1.000	0.770	attttTAGTtaatg
			2954 - 2968	2961	(-)	1.000	0.771	atcagaTAGTaaaa
P\$GAPB/GAP.01	Cis-element in the GAPDH promoters conferring light inducibility	0.88	111 - 125	118	(+)	1.000	0.891	cctgATGAagatac
			168 - 182	175	(+)	1.000	0.912	agtcATGAacattat
			1015 - 1029	1022	(-)	1.000	0.919	cacaATGAagattac
			1248 - 1262	1255	(+)	1.000	0.899	gttgATGAaatgaa
			1254 - 1268	1261	(+)	1.000	0.929	gaaaATGAaatgat
P\$HEAT/HSE.01	Heat shock element	0.81	184 - 198	191	(+)	1.000	0.859	tgaagctccaAGAAa
			1374 - 1388	1381	(-)	1.000	0.858	ggaaaaagcaAGAAa
			2088 - 2102	2095	(-)	1.000	0.811	aaaaatatAGAAa
			2476 - 2490	2483	(-)	1.000	0.830	aggaacttaAGAAa
			2724 - 2738	2731	(-)	1.000	0.833	agagagattgAGAAa
P\$CARM/CARICH.01	CA-rich element	0.78	334 - 352	343	(+)	0.750	0.781	acctcccAATAcataaaca
			1152 - 1170	1161	(-)	1.000	0.837	gccctgaAACAcataagat
			1202 - 1220	1211	(-)	1.000	0.791	aaaaattAACAccaaaaga
			1282 - 1300	1291	(-)	0.750	0.785	agactccAAAACcaaaacg
			1327 - 1345	1336	(-)	1.000	0.872	cttatAACAcctaaaga
P\$IBOX/GATA.01	Class I GATA factors	0.93	172 - 188	180	(-)	1.000	0.933	cttcaGATAatgltcat
			1261 - 1277	1269	(+)	1.000	0.963	aaaatGATAaaattctg
			1520 - 1536	1528	(+)	1.000	0.942	tatgtGATAagtacaca
			1787 - 1803	1795	(+)	1.000	0.942	ctattGATAaaaaaaaa
P\$OPAQ/O2.01	Opaque-2	0.65	54 - 70	62	(-)	1.000	0.716	TCATtctcgtgcaca
			129 - 145	137	(-)	0.750	0.666	TCAAtcctcacaatgg
			253 - 269	261	(+)	0.750	0.651	TAATctctcggagatt
			2981 - 2997	2989	(+)	1.000	0.651	TCATtccaagaacc
P\$GARP/ARR10.01	Type-B response regulator (ARR10), member of the GARP-family of plant myb-related DNA binding motifs	0.97	513 - 521	517	(+)	1.000	0.973	AGATgcgct
			530 - 538	534	(+)	1.000	0.970	AGATccttt
			1147 - 1155	1151	(-)	1.000	0.973	AGATgcgct
			1468 - 1476	1472	(+)	1.000	0.971	AGATtctcg
P\$DOFF/DOF1.01	Dof1 / MNB1a - single zinc finger transcription factor	0.98	530 - 546	538	(-)	1.000	0.980	catqaattAAAGgatct
			1323 - 1339	1331	(-)	1.000	0.984	taacacctAAAGatata
			2484 - 2500	2492	(-)	1.000	0.980	acataattAAAGgaact
			2880 - 2896	2888	(-)	1.000	0.981	ccagagttAAAGaccag
P\$WBXF/ERE.01	Elicitor response element	0.89	571 - 587	579	(+)	1.000	0.935	tcaactTGACccatggt
			613 - 629	621	(+)	1.000	0.970	ccgactTGACcaaggca
			798 - 814	806	(-)	1.000	0.913	caataTGACcacttgt
			1932 - 1948	1940	(-)	1.000	0.937	tcttcTGACcatagag
P\$L1BX/ATML1.01	L1-specific homeodomain protein ATML1 (<i>A. thaliana</i> meristem layer 1)	0.82	832 - 848	840	(+)	1.000	0.910	cagaatTAAAtgcagat
			1589 - 1605	1597	(+)	1.000	0.899	cagctgTAAAtgtacac
			1800 - 1816	1808	(+)	1.000	0.835	aaaataTAAAtcacct
			1865 - 1881	1873	(-)	0.750	0.829	gaaaaAAAAtgtaaac
P\$GBOX/TGA1A.01	TGA1A	0.96	61 - 81	71	(-)	1.000	0.978	catccacACGTcattcctcg
			62 - 82	72	(+)	1.000	0.961	gaggaatgACGTgtggatgg
			500 - 520	510	(+)	1.000	0.965	tcaaatagACGTcagatgcgc

■ Sítios presentes dentro da sequência de 1877 pb usada na construção p430.: GFP-GUS

Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene *At1g55430* (continuação)

Family/ matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
P\$EINL/TEIL.01	TEIL (tobacco EIN3-like)	0.92	172 - 180	176	(+)	0.964	0.922	aTGAAcatt
			914 - 922	918	(-)	1.000	0.931	aTGTAcata
			915 - 923	919	(+)	1.000	0.931	aTGTAcatg
P\$LEGB/RY.01	RY and Sph motifs conserved in seed-specific promoters	0.87	220 - 246	233	(-)	1.000	0.899	gaatcgtgCATGcaacacaactactgt
			227 - 253	240	(+)	1.000	0.937	ttgtgtgCATGcaccgaltccaattat
			1768 - 1794	1781	(-)	1.000	0.922	atcaatagCATGcattaaaccataatc
P\$ABRE/ABRE.01	ABA response elements	0.82	618 - 644	631	(-)	1.000	0.824	tgagctgagcatACGTgccttggtcaa
			1043 - 1069	1056	(+)	1.000	0.854	attcaagatgatACGTggatacaaatg
			1100 - 1126	1113	(+)	1.000	0.831	tcttgccctggACGTcctaaltgaag
P\$MADS/AGL1.01	AGL1, Arabidopsis MADS-domain protein AGAMOUS-like 1	0.84	694 - 714	704	(-)	0.995	0.842	tcaTACCcaaaaaggagctgt
			2015 - 2035	2025	(-)	0.975	0.920	tttTCCcacaaaaaggaaattct
			2016 - 2036	2026	(+)	0.975	0.911	gaaTCCtttgggaaaaaa
P\$OPAQ/O2_GCN4.01	Recognition site for BZIP transcription factors that belong to the group of Opaque-2 like proteins	0.81	818 - 834	826	(-)	1.000	0.816	ctgattcACATatclca
			857 - 873	865	(-)	1.000	0.907	aagagtcACATgtataa
			1515 - 1531	1523	(-)	1.000	0.830	actatcACATagttga
P\$GTBX/GT3A.01	Trihelix DNA-binding factor GT-3a	0.83	982 - 998	990	(-)	1.000	0.918	ccgagaGTTAccatcat
			1492 - 1508	1500	(-)	1.000	0.915	ttatacGTTAcattaac
			2325 - 2341	2333	(-)	0.750	0.839	tagaatGTGAcaatcta
P\$MYBL/MYBPH3.01	Myb-like protein of Petunia hybrida	0.80	1503 - 1517	1510	(-)	1.000	0.872	tgagaactGTTAtac
			2136 - 2150	2143	(+)	1.000	0.808	gtttatcaGTTAggc
			2382 - 2396	2389	(-)	1.000	0.849	aactagcgGTTAata
P\$AHBP/ATHB1.01	Arabidopsis thaliana homeo box protein 1	0.87	1661 - 1673	1667	(-)	1.000	0.883	attATTAttgttt
			2451 - 2463	2457	(-)	1.000	0.877	gttATTAttaaat
			2758 - 2770	2764	(+)	1.000	0.870	attATTAttat
P\$LREM/ATCTA.01	Motif involved in carotenoid and tocopherol biosynthesis and in the expression of photosynthesis-related genes	0.85	1689 - 1699	1694	(+)	1.000	0.887	tcATCTatata
			2052 - 2062	2057	(+)	1.000	0.892	taATCTatata
			2400 - 2410	2405	(-)	1.000	0.936	atATCTaatta
P\$STKM/STK.01	Storekeeper (STK), plant specific DNA binding protein important for tuber-specific and sucrose-inducible gene expression	0.85	1835 - 1849	1842	(+)	1.000	0.873	tttTAAAaaattcac
			2129 - 2143	2136	(-)	1.000	0.861	tgaTAAAcaactttt
			2767 - 2781	2774	(-)	1.000	0.860	aacTAAAaaatataa
P\$TBPF/TATA.01	Plant TATA box	0.88	2173 - 2187	2180	(+)	1.000	0.939	attgTATAaacataa
			2657 - 2671	2664	(+)	1.000	0.912	caatTATAaacacac
			2761 - 2775	2768	(-)	1.000	0.883	aaaaTATAaataat
P\$PSRE/GAAA.01	GAAA motif involved in pollen specific transcriptional activation	0.83	2602 - 2618	2610	(-)	1.000	0.867	ttttaGAAAcctttgaa
			2687 - 2703	2695	(-)	0.750	0.845	ttagaGTAAtgattgag
			2700 - 2716	2708	(-)	1.000	0.843	ctgcaGAAAaactttag
P\$ERSE/ERSE_I.01	ERSE I (ER stress-response element I)-like motif	0.79	44 - 62	53	(+)	0.750	0.821	ccattcgcattgtgcAACG
			592 - 610	601	(+)	1.000	0.804	gcattgggtgtagacCACG
P\$MYBS/OSMYBS.01	Rice MYB proteins with single DNA binding domains, binding to the amylase element (TATCCA)	0.82	74 - 90	82	(-)	0.750	0.828	gatctTCTCcatccac
			1052 - 1068	1060	(-)	1.000	0.857	atttgTATCcacgtatc
P\$AHBP/ATHB9.01	HD-ZIP class III protein ATHB9	0.77	155 - 167	161	(-)	1.000	0.785	gaaATGAtgaatt
			2575 - 2587	2581	(-)	1.000	0.788	gagATGAtgacct
P\$CAAT/CAAT.02	CCAAT-box in plant promoters	1.00	244 - 252	248	(+)	1.000	1.000	ttcCAATa
			2654 - 2662	2658	(+)	1.000	1.000	gtcCAATa

■ Sítios presentes dentro da sequência de 1877 pb usada na construção p430.: GFP-GUS

Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene *At1g55430* (continuação)

Family/ matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
O\$RPOA/DTYPEPA.01	PolyA signal of D-type LTRs	0.78	255 - 275	265	(-)	1.000	0.852	aCCATaaaatctccgagagat
			1764 - 1784	1774	(-)	0.750	0.834	tGCATtaaacataatcagag
P\$SALT/ALFIN1.02	Zinc-finger protein in alfalfa roots, regulates salt tolerance	0.95	362 - 376	369	(-)	1.000	0.954	gggaaaggGTGgagg
			473 - 487	480	(+)	1.000	0.971	caaatgcGTGagga
P\$MIIG/PALBOXL.01	Cis-acting element conserved in various PAL and 4CL promoters	0.80	373 - 387	380	(+)	1.000	0.818	tcccattGGTGgga
			2745 - 2759	2752	(-)	1.000	0.875	ataaagtaGGTGaga
P\$CE1F/ABI4.01	ABA insensitive protein 4 (ABI4) (AtABI4 - Arabidopsis, ZmABI4 - maize, OsABI4 - rice)	1.00	479 - 483	481	(-)	1.000	1.000	CACCg
			779 - 783	781	(-)	1.000	1.000	CACCg
P\$CDC5/CDC5.01	Myb related transcriptional activator, direct ortholog of S.pombe CDC5 protein	0.85	634 - 644	639	(+)	0.752	0.860	tgctcAGCTca
			1142 - 1152	1147	(+)	1.000	0.853	tgatcAGCGca
P\$LEGB/LEGB.01	Legumin box, highly conserved sequence element about 100 bp upstream of the TSS in legumin genes	0.59	1041 - 1067	1054	(-)	0.750	0.613	ttgtatCCACgtatcatcttgaatgc
			1150 - 1176	1163	(-)	0.750	0.600	acgaaagCCCTgaaacacataaagatgc
P\$MADS/AGL2.01	AGL2, Arabidopsis MADS-domain protein AGAMOUS-like 2	0.82	1274 - 1294	1284	(-)	0.968	0.850	caaaaCCAAaacgagaacaga
			2150 - 2170	2160	(-)	0.968	0.875	actagCCAatattagaattag
P\$MSAE/MSA.01	M-phase-specific activators (NtmybA1, NtmybA2, NtmybB)	0.80	1477 - 1491	1484	(+)	1.000	0.831	aaattAACGggagaa
			2383 - 2397	2390	(-)	0.750	0.802	caactAGCGgtaat
O\$LDPS/LDSPOLYA.01	Lentiviral Poly A downstream element	0.89	1525 - 1539	1532	(-)	0.862	0.912	ttTTGTgtacttacc
			1679 - 1693	1686	(+)	0.862	0.892	gaTTGTttaatcatc
P\$WBXF/WRKY.01	WRKY plant specific zinc-finger-type factor associated with pathogen defence, W box	0.92	1550 - 1566	1558	(+)	1.000	0.940	attggTTGActattatg
			2856 - 2872	2864	(+)	1.000	0.920	aatagTTGActtatac
P\$MADS/AGL15.01	AGL15, Arabidopsis MADS-domain protein AGAMOUS-like 15	0.79	2151 - 2171	2161	(+)	0.925	0.791	taaTTCTaatattggctagtt
			2608 - 2628	2618	(+)	0.925	0.797	agtTTCTaaaaaaaataaat
O\$RPOA/LPOLYA.01	Lentiviral Poly A signal	0.94	2158 - 2178	2168	(-)	1.000	0.941	tacAATAaacctagccaatatt
			2743 - 2763	2753	(-)	1.000	0.989	aatAATAagtaggtgagaga
P\$HMGF/HMG_IY.01	High mobility group I/Y-like proteins	0.89	2627 - 2641	2634	(+)	1.000	0.910	atgaTATTttattat
			2759 - 2773	2766	(+)	1.000	0.956	ttatTATTttattat
P\$PALA/PALBOXA.01	Putative cis-acting element on various PAL and 4CL gene promoters	0.84	71 - 89	80	(-)	0.825	0.869	atcttctCCATcccacacg
P\$OPAQ/O2.03	Opaque-2	0.85	148 - 164	156	(+)	1.000	0.917	tgagacaatTCATcat
P\$MADS/AGL3.01	AGL3, MADS Box protein	0.83	186 - 206	196	(+)	0.973	0.836	aagctCCAQaaaaaagaaaacc
P\$E2FF/E2F.01	E2F class I sites	0.82	207 - 221	214	(-)	0.757	0.841	gtctTTCtgcacaat
P\$RAV5/RAV1-5.01	5'-part of bipartite RAV1 binding site, interacting with AP2 domain	0.96	226 - 236	231	(-)	1.000	0.972	tgCACACAcaat
P\$GTBX/S1F.01	S1F, site 1 binding factor of spinach rps1 promoter	0.79	267 - 283	275	(+)	1.000	0.806	tttATGGTgtatgga
P\$MIIG/ATMYB15.01	R2R3-type myb-like transcription factor (IIG-type binding site)	0.79	352 - 366	359	(-)	1.000	0.830	ggagGTAagtgggt

■ Sítios presentes dentro da sequência de 1877 pb usada na construção p430::GFP-GUS

Tabela 6: Análise da sequência de 3000 pb localizada acima do códon de início do gene *At1g55430* (continuação)

Family/ matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
O\$RPAD/PADS.01	Mammalian C-type LTR Poly A downstream element	0.87	457 - 469	463	(+)	1.000	0.911	gttGTGGtttcgt
P\$DREB/CRT_DRE.01	C-repeat/dehydration response element	0.89	609 - 621	615	(+)	1.000	0.903	cgaaCCGActtga
P\$GBOX/OSBZ8.01	Oryza sativa bZIP protein 8	0.84	620 - 640	630	(-)	1.000	0.885	ctgagcatACGTgccttggtc
P\$GBOX/BZIP911.02	bZIP transcription factor from <i>Antirrhinum majus</i>	0.76	706 - 726	716	(+)	1.000	0.776	tgggtaTGACatgtgctagtt
P\$GBOX/GBP.01	G-box binding proteins	0.92	1046 - 1066	1056	(-)	1.000	0.935	ttgatccACGTatcatcttg
P\$OPAQ/O2.02	Opaque-2	0.97	1049 - 1065	1057	(-)	1.000	0.977	tgtatccACGTatcatc
P\$TELO/RPBX.01	Ribosomal protein box, appears unique to plant RP genes and genes associated with gene expression	0.84	1187 - 1201	1194	(-)	1.000	0.972	ttaaaCCCTaagaaa
P\$OCSE/OSL.01	OCS-like elements	0.69	1359 - 1379	1369	(-)	1.000	0.699	aagaatgatatgacaACGTctc
P\$DOFF/DOF3.01	Dof3 - single zinc finger transcription factor	0.99	1376 - 1392	1384	(-)	1.000	0.996	gtgtggaaAAGCaaga
P\$MIIG/PALBOXP.01	Putative cis-acting element in various PAL and 4CL gene promoters	0.81	1383 - 1397	1390	(-)	0.936	0.821	atGTGGTgtggaaaa
P\$GBOX/BZIP911.01	bZIP transcription factor from <i>Antirrhinum majus</i>	0.77	1404 - 1424	1414	(-)	1.000	0.778	cggccaTGACTtggactatag
P\$GBOX/UPRE.01	UPRE (unfolded protein response element) like motif	0.86	1405 - 1425	1415	(+)	0.767	0.875	tatagtCCAAGtcatggcgga
P\$IBOX/IBOX.01	I-Box in rbcS genes and other light regulated genes	0.81	1424 - 1440	1432	(+)	1.000	0.824	gatgtGATAaagttgtg
P\$MYBS/MYBST1.01	MybSt1 (Myb Solanum tuberosum 1) with a single myb repeat	0.90	1457 - 1473	1465	(-)	1.000	0.939	gaatctATCCgactctc
O\$RPOA/POLYA.01	Mammalian C-type LTR Poly A signal	0.76	1734 - 1754	1744	(+)	1.000	0.769	cttatTAAACAatcctcatt
P\$MADS/MADSB.01	Floral determination	0.89	1863 - 1883	1873	(-)	1.000	0.893	aagaaaAAAATglaaactc
P\$MYBL/CARE.01	CAACTC regulatory elements, GA-inducible	0.83	2119 - 2133	2126	(-)	1.000	0.835	cttttaAGTTggaa
P\$DOFF/PBF.01	PBF (MPBF)	0.97	2356 - 2372	2364	(+)	1.000	0.988	agaaaaaaAAGaggag
P\$LFYB/LFY.01	Plant specific floral meristem identity gene LEAFY (LFY)	0.93	2585 - 2597	2591	(+)	1.000	0.943	cTCCAtgttgtag
P\$EPFF/ZPT22.01	Member of the EPF family of zinc finger transcription factors	0.75	2797 - 2819	2808	(-)	1.000	0.809	agcatctctatCAGTagtctctc
P\$SEF4/SEF4.01	Soybean embryo factor 4	0.98	2952 - 2962	2957	(+)	1.000	0.981	gaTTTTtacta
P\$SPF1/SP8BF.01	DNA-binding protein of sweet potato that binds to the SP8a (ACTGTGTA) and SP8b (TACTATT) sequences of sporamin and beta-amylase genes	0.87	2956 - 2968	2962	(+)	1.000	0.871	ttTACTatctgat

■ Sítios presentes dentro da sequência de 1877 pb usada na construção p430::GFP-GUS

RESULTADOS

1. Análise de segregação do T-DNA na linhagem mutante *aqt*

Visando a caracterização do padrão de segregação do T-DNA na progênie da linhagem mutante sementes *aqt* foram selecionadas em meio MS acrescido de 25 mg/L de canamicina. Após duas semanas de crescimento em placa, foi realizada a contagem das plântulas resistentes ao antibiótico. De 597 sementes da linhagem *aqt* germinadas, 142 apresentaram sensibilidade ao antibiótico canamicina e 403 apresentaram resistência, o que corresponde a uma relação de cerca de três plantas resistentes para cada planta sensível (segregação de 3:1), indicando a existência de apenas uma cópia do inserto. A seguir estas plantas resistentes foram submetidas a uma nova seleção em meio com canamicina em busca daquelas plantas cuja progênie era composta de 100% de plantas resistentes ao antibiótico, indicando a presença do inserto em homozigose, que foram selecionadas para dar continuidade as análises.

2. Análise da integração do DNA pela técnica de *Southern Blot*

A determinação do número de cópias do T-DNA inserido no genoma da planta *aqt* foi feita por meio de um experimento de *Southern Blot* (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA genômico de plantas do tipo selvagem e mutantes *aqt* foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *AvaII* e transferido para filtros de hibridização. Como sonda foi utilizado o gene *NPTII*, obtido através de reação de PCR.

Conforme o esperado para digestão com *EcoRI*, foi observada a presença de um único sinal de hibridização e, com *AvaII* foram observados dois fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda, uma vez que a enzima *EcoRI* não reconhece sítios de restrição dentro da seqüência do gene *NPTII* e a enzima *AvaII* reconhece um único sítio de restrição nesta seqüência (figura 19). Assim, este resultado indica a presença de um único inserto de T-DNA no genoma da linhagem mutante *aqt*.

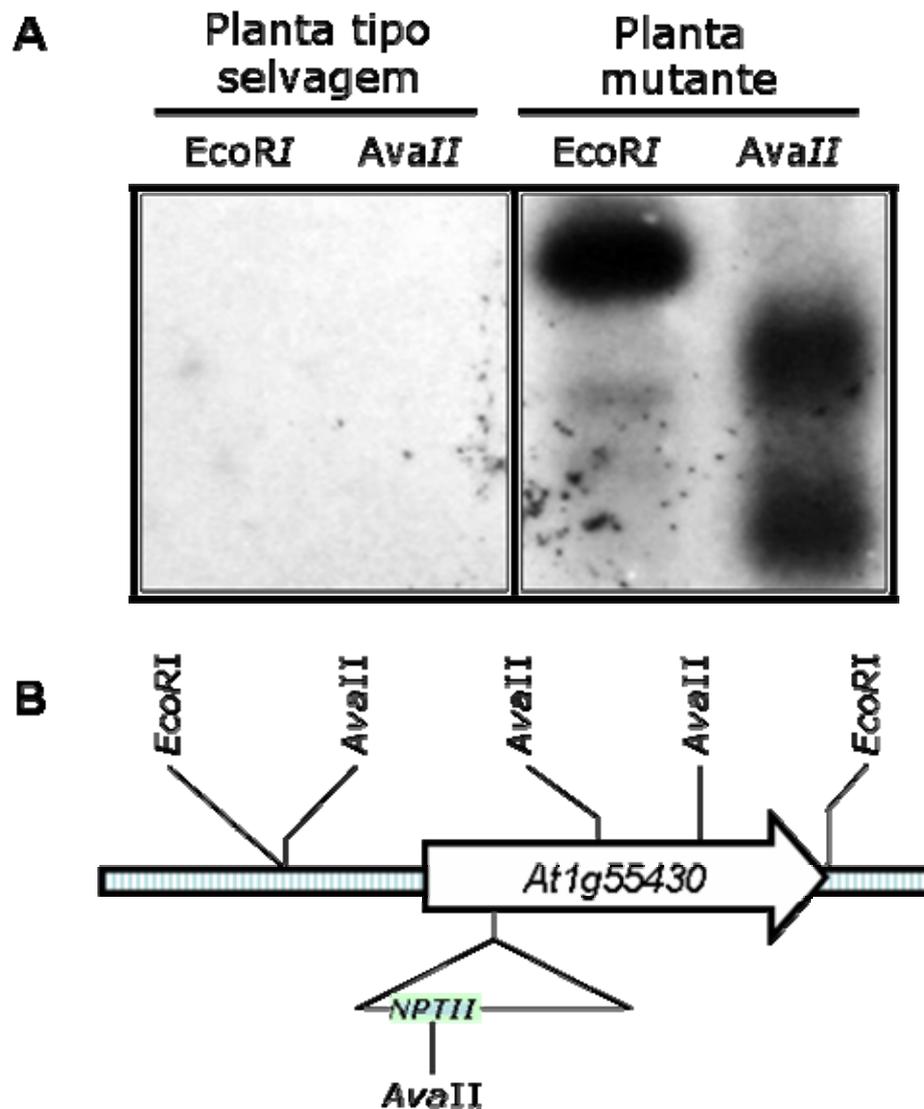


Figura 19: Autoradiografia do experimento de *Southern blot* de plantas tipo selvagem e mutante *aqt* e diagrama do sitio de inserção do T-DNA no gene *At1g55430*. (A) Autoradiograma do experimento de *Southern Blot* de plantas tipo selvagem e *aqt*. O DNA genômico total das plantas tipo selvagem e *aqt* foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *AvaII*, separado por eletroforese e transferido para membrana de hibridização. Como sonda foi usado o produto de PCR do gene *NPTII*. (B) Esquema de parte do cromossomo 1 de *A.thaliana* mostrando o local de inserção do T-DNA no gene *At1g55430* e os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *AvaII* mais próximos.

3. Caracterização fenotípica do sistema aéreo das plantas mutantes *aqt*

Para a caracterização fenotípica da parte aérea das plantas mutantes *aqt* as sementes foram crescidas por duas semanas em meio MS contendo 25 mg/L de canamicina. Após a seleção as plântulas foram transferidas para câmara de crescimento, onde foram acompanhadas durante seis a oito semanas. A comparação entre as plantas *aqt* e do tipo selvagem mostrou que as plantas *aqt* apresentavam um aumento no número de folhas da roseta, alterações na morfologia das folhas da roseta e no tempo de floração, redução no tamanho das silíquas, perda de dominância apical no eixo de inflorescência e eixos de inflorescência curtos, resultando em uma redução no tamanho global da planta.

Quando as sementes de plantas homozigotas foram germinadas diretamente em terra, foi observado o mesmo fenótipo, porém com menor intensidade, provavelmente devido à ausência do estresse provocado pela canamicina.

Foi visto que plantas mutantes *aqt* crescidas por seis semanas em terra apresentavam de 20 a 26 folhas na roseta, enquanto que as plantas tipo selvagem da mesma idade apresentavam entre 4 e 8 folhas (gráfico 1). Foi observado também que estas plantas apresentavam alterações na morfologia das folhas da roseta. As folhas de plantas *aqt* possuem as bordas voltadas para baixo e seu eixo de inflorescência só começa a se alongar 7-10 dias após o início do alongamento dos eixos das plantas tipo selvagem (figura 20 A-C; tabela 1). Durante esse período de retardo no desenvolvimento, geralmente ocorre a formação de uma estrutura abaulada no centro da roseta, semelhante a um meristema aumentado. Após 4-5 dias é formada uma pequena estrutura semelhante a uma inflorescência que permanece neste local até que o eixo comece a se alongar. Esta estrutura consiste de um pequeno botão associado a uma folha com características de folha de eixo.

Quando a comparação foi feita entre plantas adultas nós observamos que as plantas mutantes apresentavam eixos de inflorescência pequenos e ramificados, medindo entre 5 e 9 cm de altura, enquanto que os eixos de plantas selvagens mediam entre 20 e

26 cm (gráfico 2; figura 20 D e H). Foi observado que a inflorescência central dos eixos de inflorescência de plantas *aqt* geralmente não se desenvolvia, enquanto que as inflorescências laterais apresentavam um desenvolvimento aparentemente normal (figura 20 F-G). Foi observado ainda que as silíquas de plantas mutantes eram menores e mais grossas que as das plantas tipo selvagem.

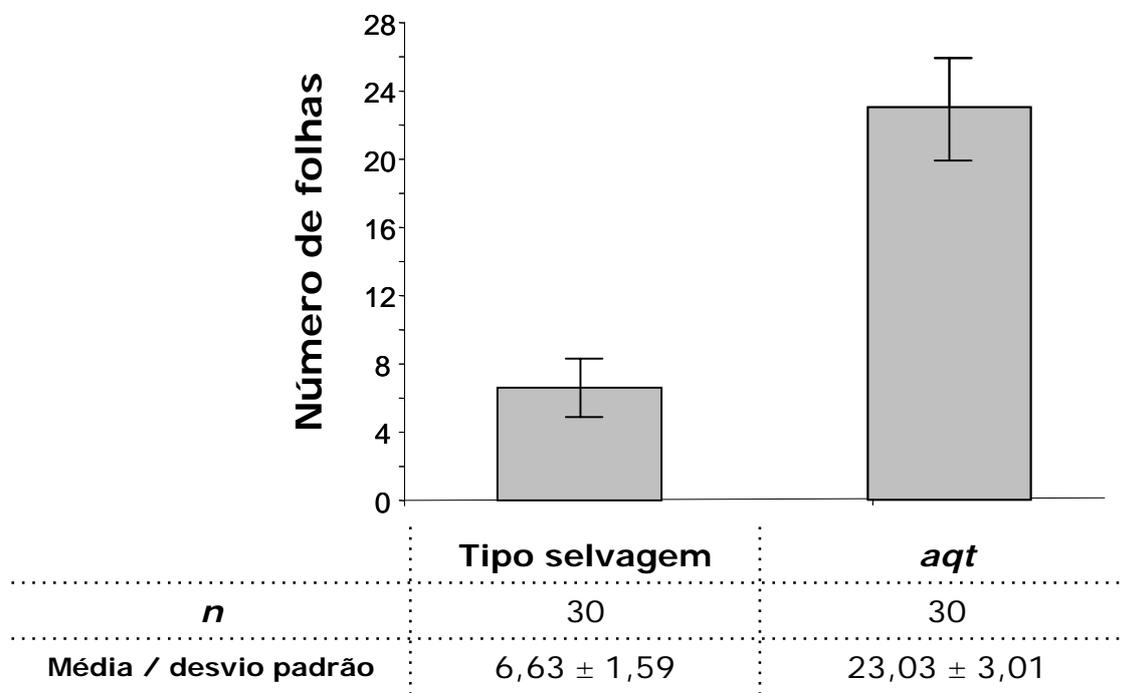


Gráfico 1: Número de folhas observado em plantas tipo selvagem e *aqt* 45 dias após a germinação.

Tabela 1: Análise do tempo de emissão do eixo de inflorescência

Linhagens	<i>n</i>	% de plantas com eixos de inflorescência									
		15 DAG		30 DAG		35 DAG		40 DAG		45 DAG	
		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%
Tipo selvagem	20	0	0	9	45	20	100	20	100	20	100
<i>aqt</i>	20	0	0	1	5	7	35	12	60	20	100

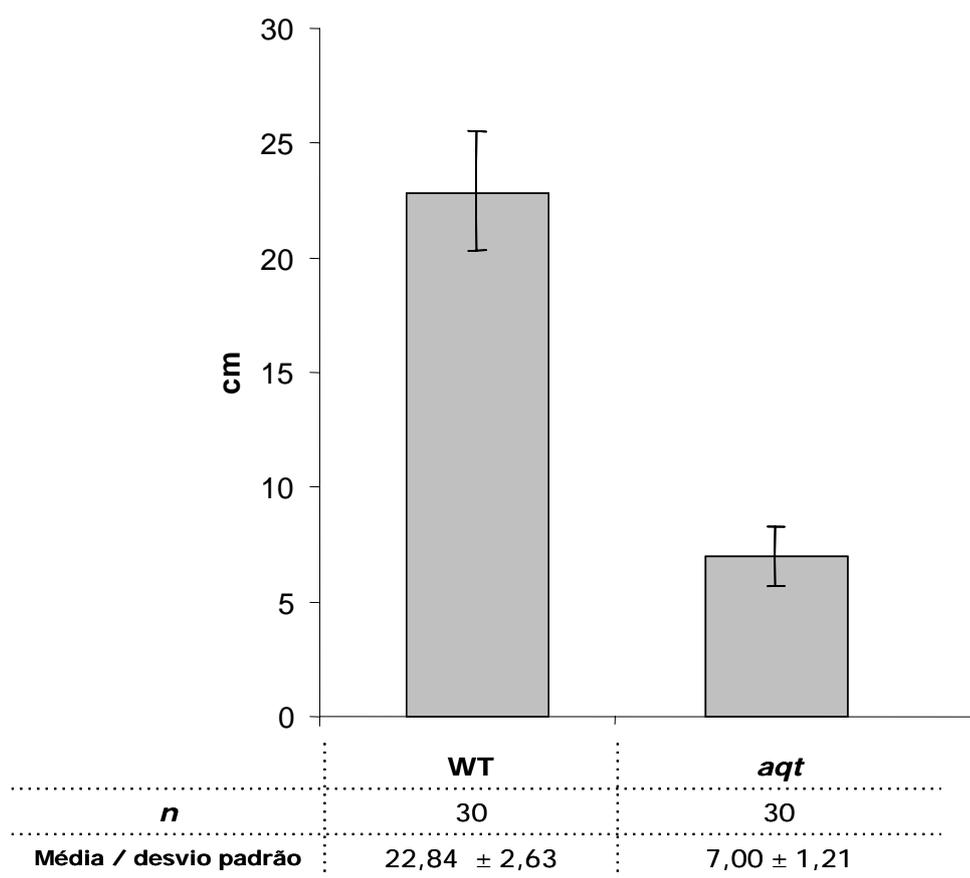


Gráfico 2: Comprimento do eixo de inflorescência de plantas tipo selvagem e *aqt* crescidas por 45 dias em terra.

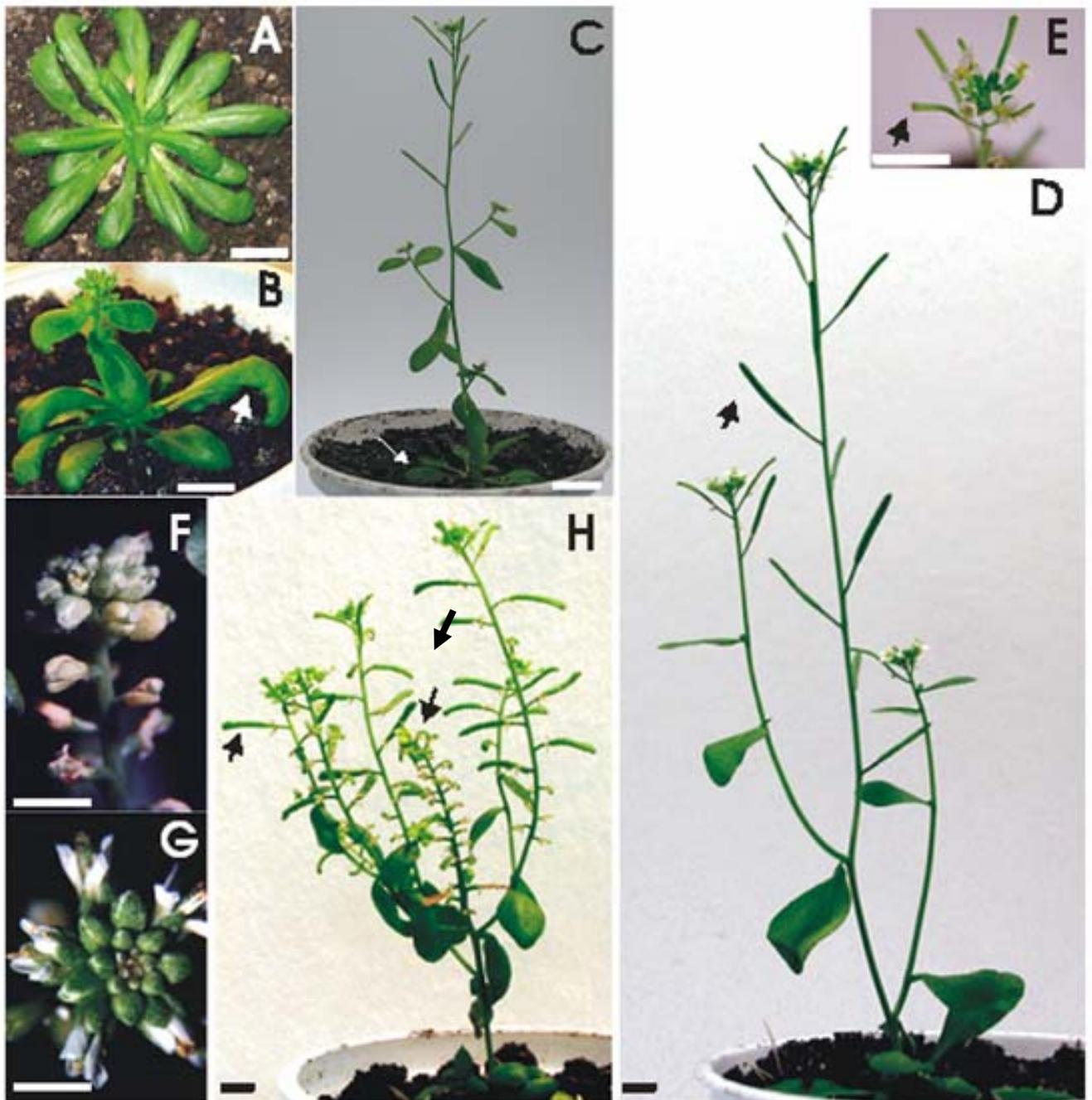


Figura 20: Fenótipo da parte aérea de plantas *aqt* durante o desenvolvimento. Morfologia de plantas mutantes *aqt* (A-B) e tipo selvagem (C) após seis semanas de crescimento em terra. Mutantes apresentam as margens das folhas curvadas para baixo e retardo no desenvolvimento. Comparação entre o tamanho de plantas tipo selvagem (D) e mutante *aqt* (H) adultas. Mutantes apresentam pequeno tamanho, e eixo de inflorescência reduzido e ramificado. Detalhe de inflorescência selvagem (E) mostrando siliquis alongadas com sementes viáveis. Detalhe de inflorescências *aqt* central (F) e lateral (G). Note que a inflorescência central não produz flores férteis. Barra: 5 mm.

4. Caracterização do padrão vascular de folhas e cotilédones

4.1. Padrão vascular de folhas

Foram observadas alterações nos feixes vasculares de todas as folhas da roseta e nos cotilédones de plantas *aqt* quando comparadas ao padrão observado na planta tipo selvagem. Foi visto um aumento na quantidade dos feixes vasculares secundários e terciários, porém estes feixes aparentavam ter um calibre reduzido em relação ao selvagem; e um número aumentado de feixes vasculares que terminavam abruptamente, não se conectando a nenhum outro (figura 21). Este aumento na quantidade dos feixes vasculares, apesar de não quantificado, pode ser confirmado pelo aumento na complexidade do padrão vascular de folhas *aqt*, que é representado pelo aumento no número total de pontos de ramificação presentes nas folhas (ver item 3.3)

4.2. Análise da complexidade do padrão vascular dos cotilédones

Os cotilédones dos mutantes também apresentaram alterações no padrão vascular (figura 22 e gráfico 3). A complexidade do padrão vascular em cotilédones pode ser representada pelo número de aréolas no espaço delimitado pelos feixes vasculares secundários (Sieburth, 1999). Em geral são observados cotilédones com quatro aréolas, mas em alguns casos podem ser encontrados cotilédones com um número maior ou menor de aréolas (figura 22). Foram analisados 100 cotilédones de plantas *aqt* e 100 cotilédones de plantas tipo selvagem, previamente clareados com lactofenol. Foi observado que cerca de 28% dos cotilédones de plantas mutantes *aqt* apresentavam um número menor de aréolas delimitadas pelos feixes vasculares secundários, enquanto apenas cerca de 5% dos cotilédones de plantas tipo selvagem apresentavam esta característica (gráfico 3). Esta tendência à diminuição no número de aréolas indica que o padrão vascular de cotilédones de indivíduos mutantes apresenta uma complexidade menor que os cotilédones de plantas selvagens.

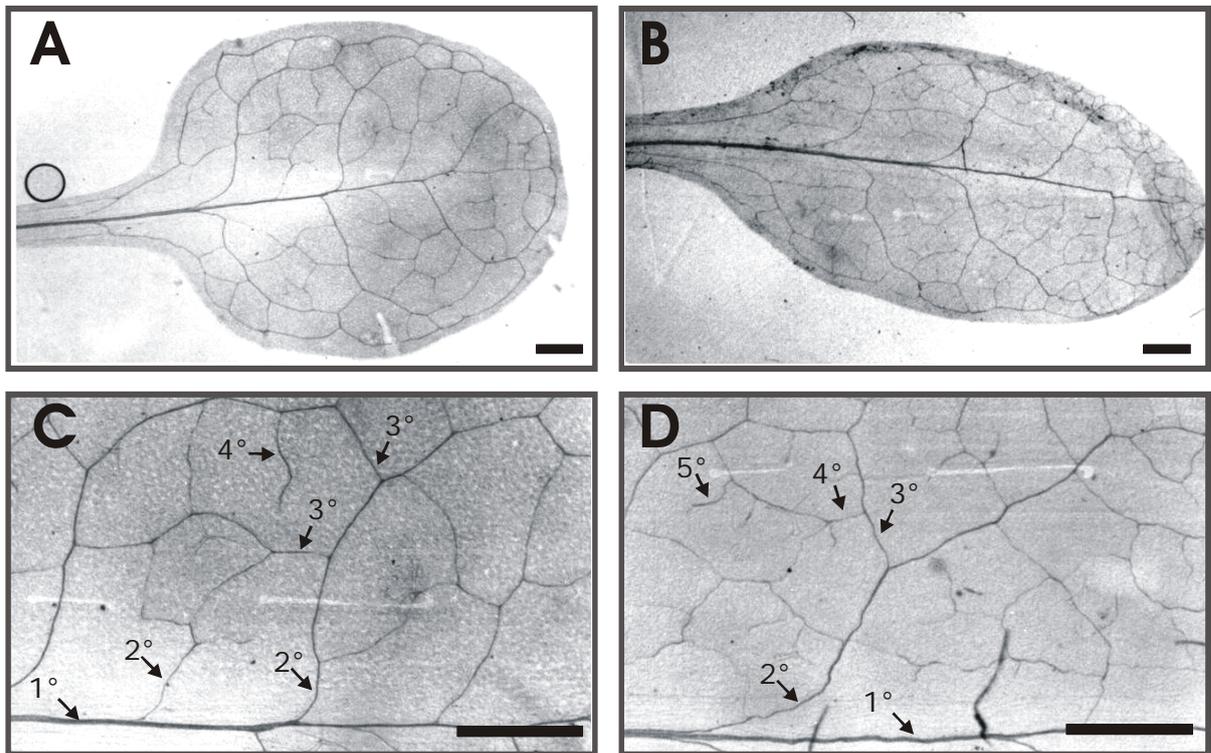


Figura 21: Folhas de plantas *aqt* e tipo selvagem clareadas com lactofenol para melhor visualização do padrão vascular. Comparação entre a quarta folha da roseta de plantas do tipo selvagem (A) e *aqt* (B), clareadas com lactofenol, mostrando alteração na morfologia e no padrão vascular da folha da planta mutante. Padrão vascular típico da folha do tipo selvagem (C), mostrando os feixes principal, secundários e terciários. Padrão vascular da folha mutante *aqt* (D) mostrando um feixe principal bem marcado, feixes secundários e terciários pouco definidos e em maior número. Barra: 1 mm.

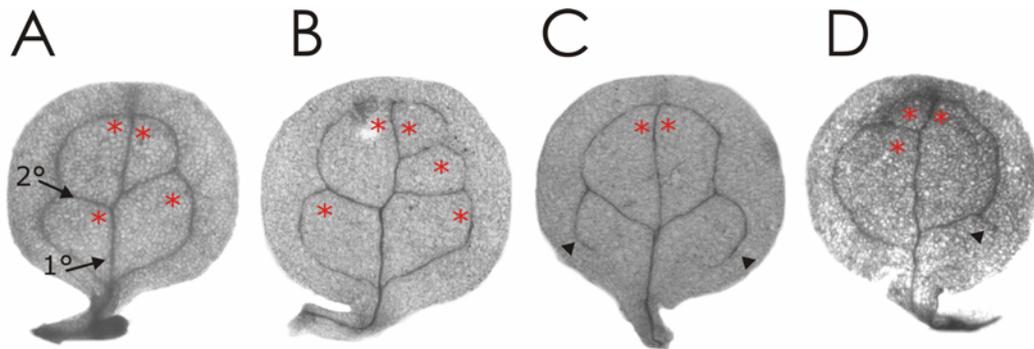


Figura 22: Cotilédones de plântulas tipo selvagem e *aqt* com duas semanas, clareadas com lactofenol para melhor visualização do padrão vascular. (A) Padrão vascular normal encontrado em cotilédones de plantas selvagens. (B-D) Variações no padrão vascular encontradas em cotilédones de plantas *aqt*. (1°) Feixe vascular principal. (2°) Feixe vascular secundário. (*) Câmaras completas. (▸) Feixe vascular interrompido.

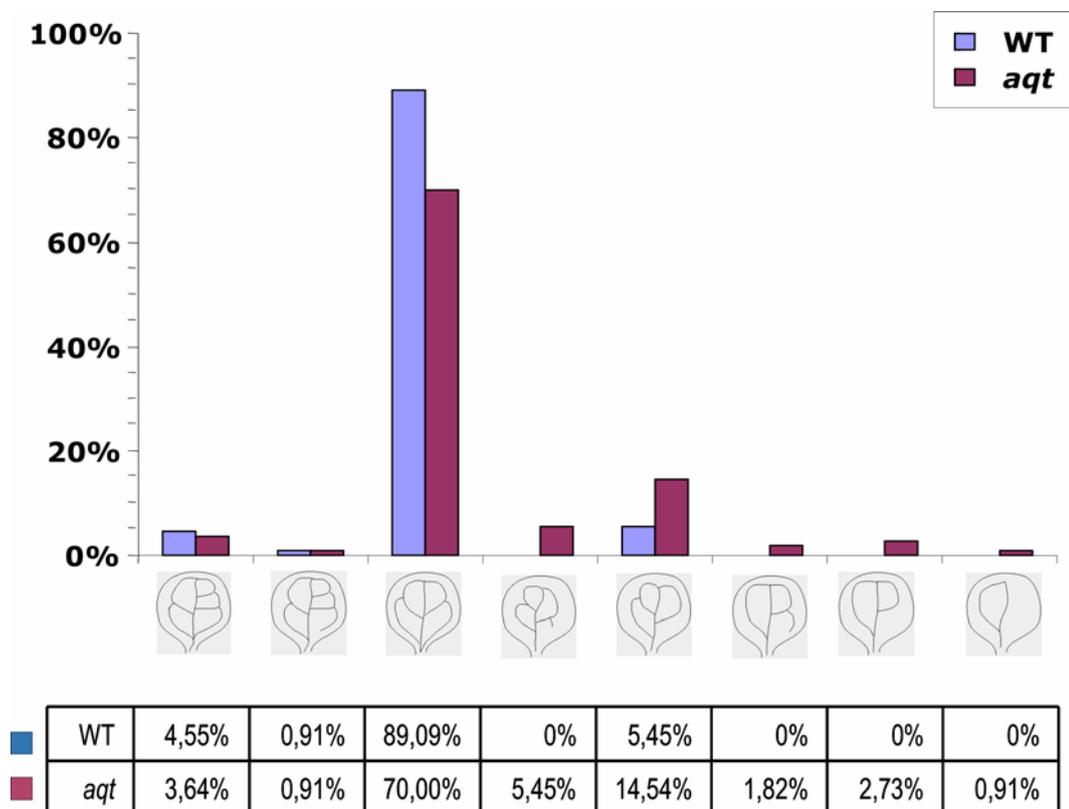


Gráfico 3: Análise quantitativa da complexidade vascular em cotilédones de plântulas tipo selvagem e *aqt*.

4.3. Análise da complexidade vascular de folhas

A complexidade do padrão vascular de folhas pode ser representada pelo número total de pontos de ramificação presentes nas folhas (Hamada *et al.*, 2000). Para quantificar o efeito da interrupção do gene no padrão vascular, foram contados os pontos de ramificação presentes nas quatro primeiras folhas da roseta de plantas tipo selvagem e *aqt*, clareadas com lactofenol. Foi observado que, em folhas tipo selvagem, o número total de pontos de ramificação por folha aumentava de acordo com o grau de desenvolvimento das folhas. Não foi observada uma diferença significativa no número total de pontos de ramificação presentes nas folhas mais velhas das plantas *aqt* e tipo selvagem. Porém as folhas mais jovens do mutante apresentavam o número total de pontos de ramificação superior ao encontrado nas folhas tipo selvagem (tabela 2).

Tabela 2: Análise da complexidade do padrão vascular de folhas: medida do número total de pontos de ramificação

	Folha 1	Folha 2	Folha 3	Folha 4
Tipo selvagem (n=10)	53,75 ± 13,28	38,7 ± 2,26	31,7 ± 2,78	21,5 ± 3,50
<i>aqt</i> (n=10)	63,2 ± 11,03	50,1 ± 5,47	49 ± 9,08	44,3 ± 13,67

5. Análise histológica dos eixos de inflorescência de plantas *aqt*

As plantas mutantes apresentam, além de alterações no padrão vascular de folhas e cotilédones, alterações no eixo de inflorescência. Quando comparados com eixos de plantas selvagens, é observado que os eixos destas plantas iniciam seu alongamento 7-10 dias mais tarde, e apresentam uma redução de duas a três vezes em sua altura final e aumento em seu calibre. Para investigar se a redução na altura do eixo está relacionada com alterações no desenvolvimento vascular, foi feita uma análise histológica em plantas adultas.

Assim, para a melhor caracterização das alterações observadas nos eixos de inflorescência de plantas *aqt*, as regiões basal e apical de eixos de inflorescência de plantas selvagem e *aqt* com cerca de 40 dias de idade foram cortadas e emblocadas em resina Spurr. Nesta fase o eixo de plantas tipo selvagem já está completando seu desenvolvimento e as sílquas ainda estão verdes. Para obter amostras comparáveis de plantas com divergência morfológica, foram feitos cortes a uma distância de 5 mm das extremidades nas porções basal e apical do eixo de inflorescência. O material obtido foi emblocado e foram obtidos cortes semi-finos.

Nos cortes relativos às regiões basal e apical de eixos de plantas tipo selvagem foi possível observar a disposição normal dos tecidos, que consiste em epiderme, córtex, floema, xilema, região interfascicular e região medular (figura 23 A-D). A análise comparativa destas regiões mostrou que a disposição dos diferentes tecidos no mutante é semelhante à do selvagem (figura 23 E-H).

Foi visto nas plantas *aqt* que na região apical existem células ligeiramente irregulares; floema e xilema ligeiramente desorganizados; e uma região interfascicular reduzida, fazendo com que os pacotes vasculares frequentemente estejam quase unidos (figura 23 E-F). Já na região basal foi observada a presença de células irregulares no córtex, na medula e na região interfascicular (figura 23 G-H). Esta característica pode estar relacionada a uma redução na lignificação das paredes celulares ou ser provocada pela técnica de fixação empregada.

Foi observado ainda um aumento do número de células na região basal do eixo de inflorescência de plantas *aqt*, porém com um tamanho menor que o apresentado pelas células das plantas tipo selvagem. Além disto, foi visto um aumento na quantidade de feixes vasculares, principalmente do xilema (figura 23 G-H). Outra característica que pode ser observada nestes cortes é a superfície irregular apresentada pelos eixos de inflorescência da planta mutante.

Também pode ser observada uma alteração no formato dos feixes vasculares, que nas plantas selvagens apresentam a forma de um triângulo isósceles e nas plantas *aqt* adquirem a forma de um triângulo equilátero, devido principalmente ao aumento das células do xilema (comparar figuras 23 C-D e 23 G-H).

Visando esclarecer a causa da alteração da morfologia das células do eixo de inflorescência observada em plantas *aqt* foi realizada uma análise de cortes feitos à fresco em diferentes regiões dos eixos de inflorescência de plantas tipo selvagem e *aqt*. A comparação entre estes cortes mostrou que as células do eixo de inflorescência do mutante apresentavam uma morfologia normal, indicando que a forma irregular observada quando as células foram embebidas em resina consistia apenas de um artefato de técnica de fixação (dados não mostrados).

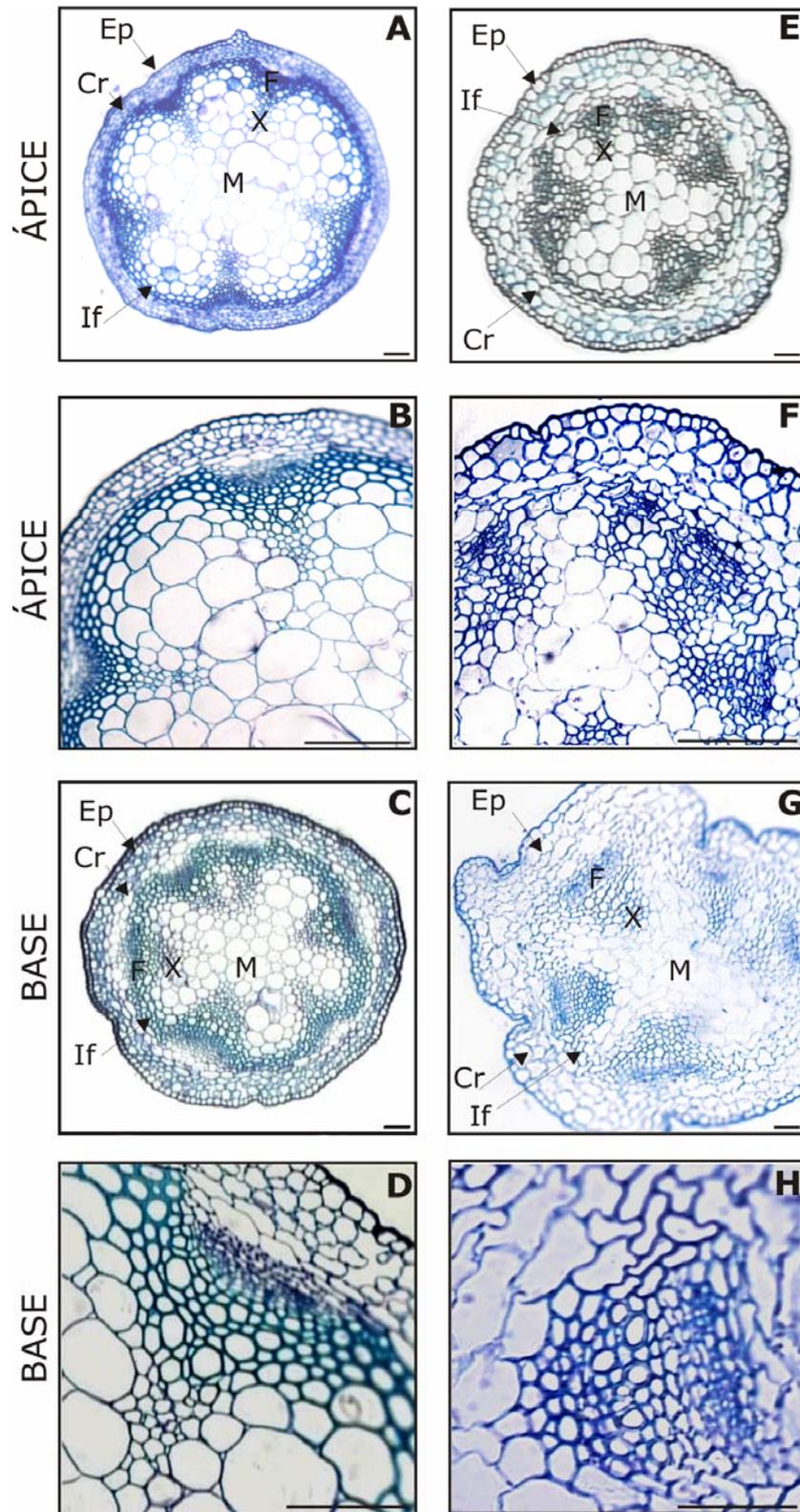


Figura 23: Seções transversais de eixos da inflorescência de plantas tipo selvagem e *aqt* coradas com azul do toluidina. Corte transversal do ápice e da base mostrando a estrutura secundária do sistema vascular em eixos de plantas tipo selvagem (A-D) e *aqt* (E-H) com 6 semanas. Cr, córtex. Ep, epiderme. If, região interfascicular. F, floema. M, Medula. X, xilema. Barra: 0,25 mm

6. Caracterização fenotípica do sistema radicular das plantas *aqt*

6.1. Morfologia e complexidade do sistema radicular

Para a medida do comprimento da raiz principal, plantas tipo selvagem e *aqt* foram crescidas por 10 dias em placas de Petri contendo meio MS, na posição vertical. Foi observada uma diferença significativa no comprimento das raízes das plantas *aqt*, que são em média 26% maiores que as raízes de plantas tipo selvagem (tabela 3).

Tabela 3: Comprimento de raízes de plantas *aqt* e tipo selvagem

Linhagem	N	Média (cm) / desvio padrão
Tipo selvagem	96	4,46 ± 0,21
<i>aqt</i>	96	5,62 ± 0,85

Com o objetivo de verificar se a interrupção do gene *At1g55430* pode causar algum efeito no desenvolvimento da epiderme em raízes, plantas tipo selvagem e *aqt* crescidas por 10 dias em placas foram analisadas por microscopia de contraste interferencial. Foi observado que o fenótipo das raízes destas plantas difere do fenótipo das raízes de plantas do tipo selvagem (figura 24).

Foram feitas comparações entre os meristemas das raízes principais, as zonas de alongamento, as zonas de diferenciação, os sítios de iniciação de raízes secundárias, e os meristemas de raízes secundárias de plantas tipo selvagem e *aqt*. Raízes de plantas *aqt* apresentaram aumento no calibre das raízes principais, redução da zona de alongamento, um aparente aumento no número de células formadoras de pêlos e pêlos radiculares mais longos que os de plantas tipo selvagem (figura 24). As raízes laterais de plantas *aqt* apresentam características semelhantes às apresentadas pelas raízes principais, no que diz respeito a redução da zona de alongamento e alterações nos pêlos radiculares.

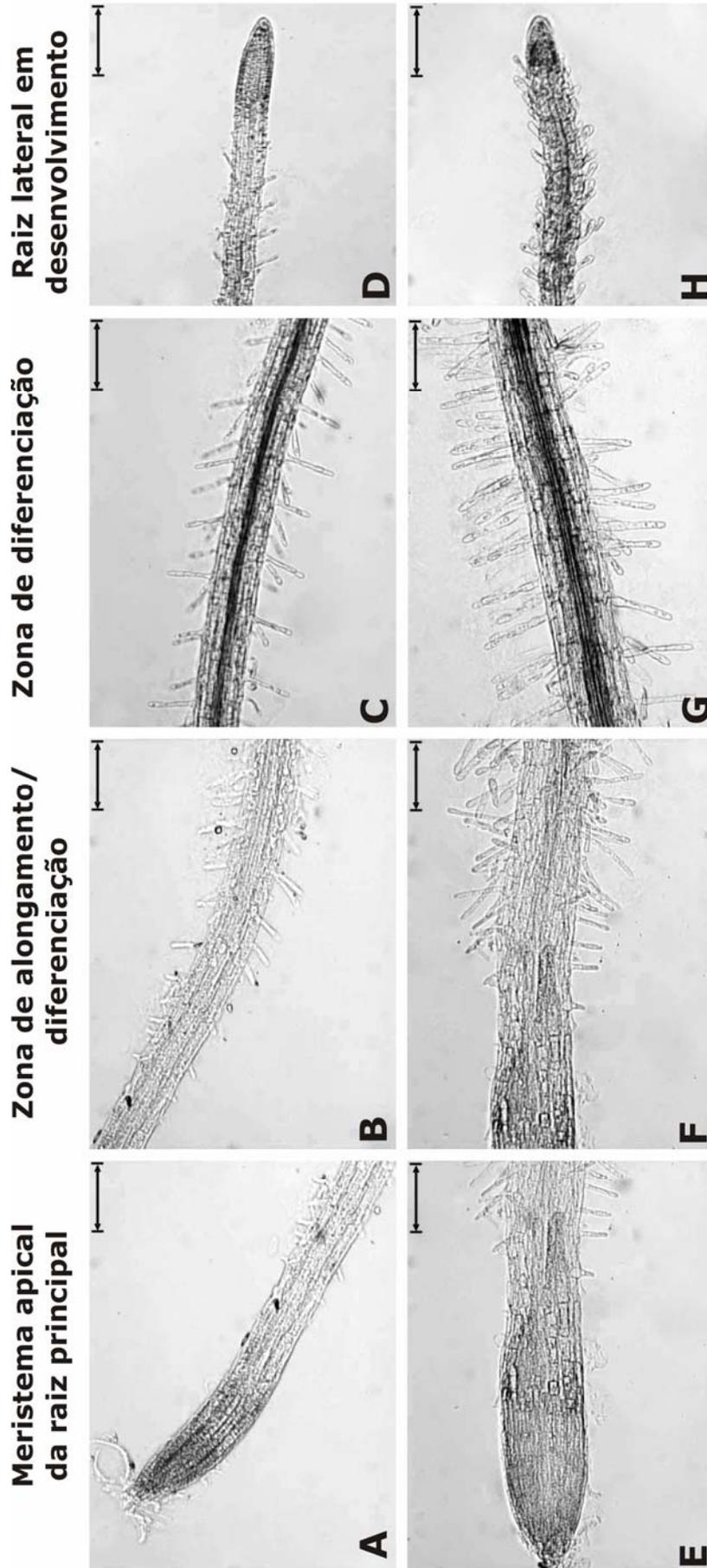


Figura 24: Micrografias de raízes intactas de plantas tipo selvagem e aqt em microscopia de contraste interferencial. Análise das raízes íntegras de plantas crescidas em meio MS por duas semanas. Comparação entre o meristema da raiz principal, a transição entre a zona de alongamento e diferenciação, a parte inicial da zona de alongamento e uma raiz lateral em desenvolvimento de plantas tipo selvagem (A, B, C e D) e aqt (E, F, G e H). Pode ser observado um aumento radial em todas as partes da raiz mutante e um aparente aumento no número de tricoblastos nas raízes principal e lateral do mutante. Barra: 1 mm

Foi observado também que as regiões adultas das raízes principais de plantas *aqt* apresentavam uma quantidade menor de raízes laterais desenvolvidas. Além disto, foi possível observar nesta região a presença de vários sítios de iniciação de raízes laterais que se desenvolveram até protrair da camada epidérmica da raiz principal, mas que não foram capazes de completar seu desenvolvimento (dados não apresentados). Isto resultou em um sistema de raízes menos complexo que os das plantas selvagens.

Além disto, foi observado que as células da raiz do mutante apresentavam uma forte redução em seu comprimento e um ligeiro aumento em sua largura (figura 25). Essa observação em conjunto com o fato de que as raízes do mutante *aqt* são mais longas indica um aparente aumento no número de células nas raízes de plantas mutantes, em comparação com as raízes de plantas tipo selvagem.

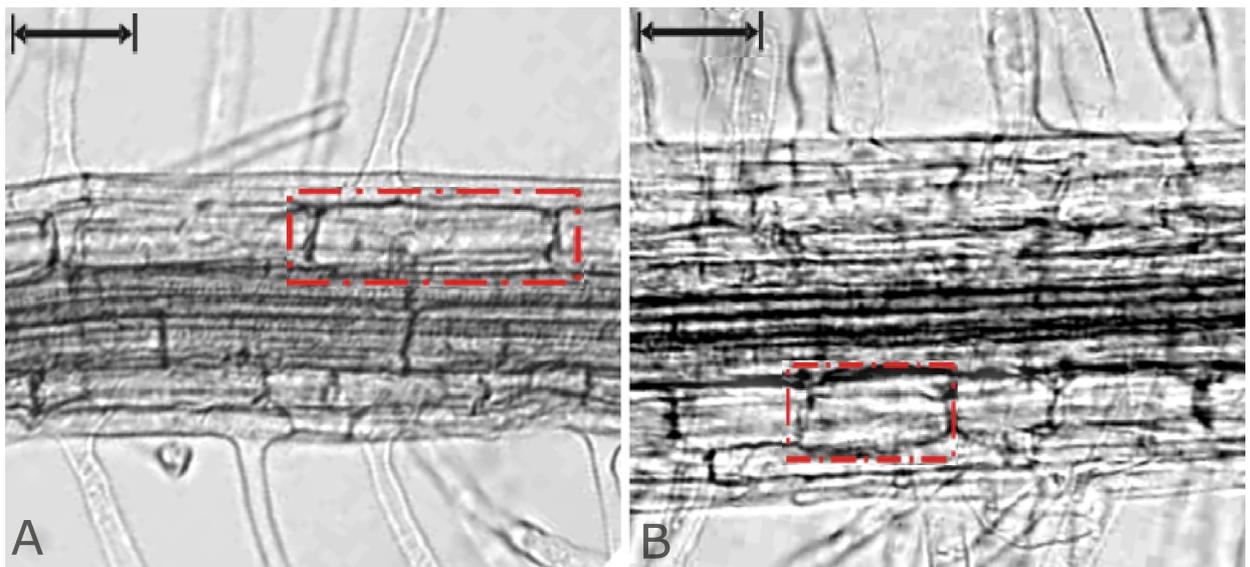


Figura 25: Micrografias de raízes intactas de plantas tipo selvagem e *aqt* em microscopia de contraste interferencial. Análise das raízes íntegras de plantas crescidas em meio MS por duas semanas. Comparação entre o tamanho de células radiculares presentes em plantas tipo selvagem (A) e *aqt* (B). Pode ser observado um aumento no número de células presentes na raiz mutante. O retângulo delimita uma célula individual, destacando a redução no comprimento de células *aqt*. Barra: 0,25 mm

6.2. Análise histológica das raízes de plantas *aqt*

Visando esclarecer se o aumento do calibre observado nas raízes de plantas *aqt* é devido ao aumento no número de camadas celulares ou ao aumento do volume das células foi feita uma análise das raízes por microscopia ótica.

Raízes de plantas tipo selvagem e *aqt* crescidas em placas por duas semanas foram fixadas e emblocadas em Spurr. Cortes semi-finos mostraram que as raízes de plantas *aqt* não apresentavam alterações significativas quanto à organização dos diferentes tipos celulares que compõem as raízes (epiderme, córtex, endoderme, periciclo, protoxilema e protofloema), quando comparado as raízes de plantas tipo selvagem. Foi observado ainda um aparente aumento no tamanho das células de *aqt*, porém essa característica não foi avaliada estatisticamente (figura 26).

Análise semelhante foi feita em raízes de plantas tipo selvagem e *aqt* adultas crescidas diretamente em terra. Os cortes semi-finos foram feitos na região adulta da raiz, próximo à base. Nesses cortes pode ser vista a organização normal das regiões referentes à periderme, ao floema secundário e ao câmbio, e ao xilema em raízes de plantas tipo selvagem (figura 27). As raízes de plantas *aqt* adultas também apresentaram uma organização normal dos seus diferentes tipos celulares, porém com um aumento no diâmetro final da raiz, devido ao aumento da formação dos tecidos vasculares, principalmente de floema secundário e das células do cambio vascular, o que é compatível com o resultado observado anteriormente (figura 27). Foi possível observar ainda que as paredes celulares do mutante são mais delgadas, e coram menos que as paredes celulares de raízes tipo selvagem.

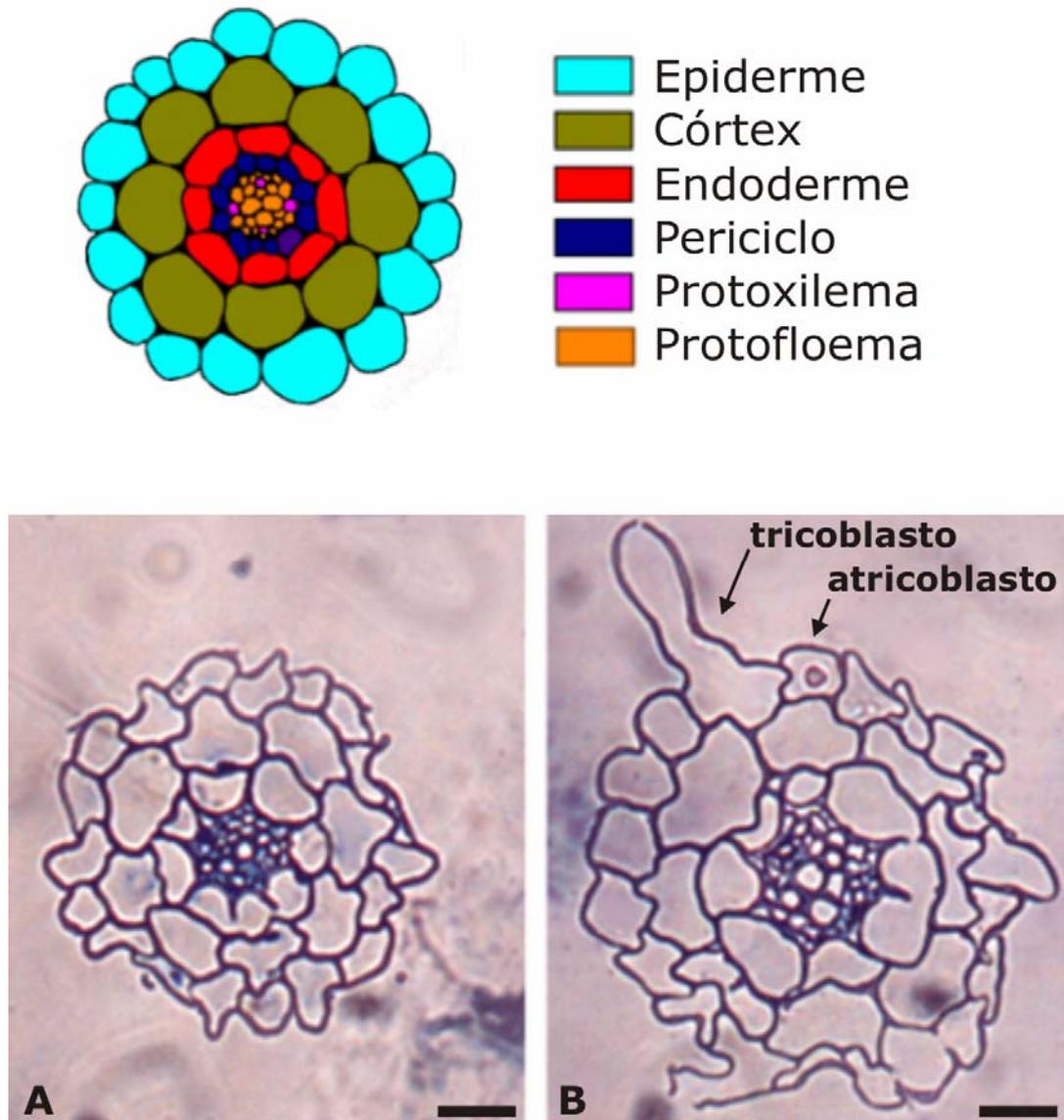


Figura 26: Cortes transversais de raízes de plantas tipo selvagem (A) e *aqt* (B) 14 dias após a germinação. Os cortes foram feitos próximos à base da raiz. Barra: 20 µm.

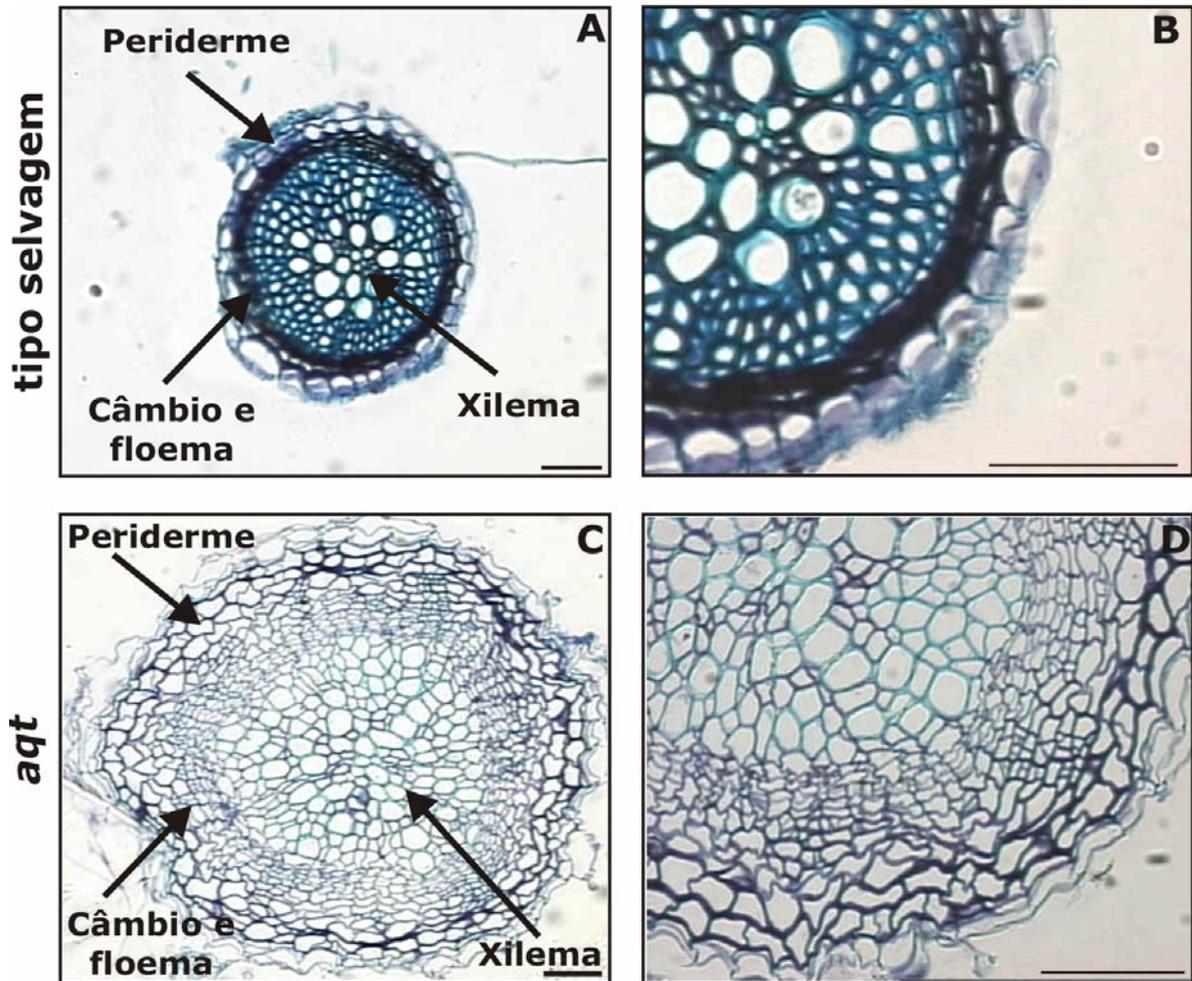


Figura 27: Micrografias de seções transversais de raízes de plantas do tipo selvagem e *aqt* emblocadas em resina e coradas com azul de toluidina. Cortes transversais de raízes mostrando o grau de crescimento secundário na porção basal de raízes de plantas tipo selvagem (A,B) e *aqt* (C,D). Barra: 0,25 mm

7. Análise de sensibilidade da planta *aqt* ao hormônio auxina

Como algumas das características apresentadas pelo mutante *aqt* se assemelham as características apresentadas por mutantes com alterações na síntese, transporte ou sensibilidade à auxina, foram realizados testes para averiguar a sensibilidade e a resposta deste mutante à aplicação de auxina exógena.

Para o teste de sensibilidade à auxina, plantas tipo selvagem e *aqt* foram crescidas em meio sólido por cinco dias, após este período os cotilédones destas plantas foram retirados e transferidos para meio líquido acrescido de auxina, sob iluminação e agitação constantes (Mattsson *et al.*, 2003, com modificações). Após sete dias neste meio, tanto os cotilédones selvagens quanto mutantes apresentaram a formação de raízes adventícias (informação não mostrada). Este resultado indica que os mutantes *aqt* são capazes de responder a aplicação de auxina exógena, pelo menos no que se refere à formação de raízes.

Para determinar se plantas *aqt* apresentam uma resposta alterada a auxina, plantas tipo selvagem e *aqt* também foram cultivadas em meio suplementado com auxina, para observação de possíveis alterações fenotípicas. Os resultados mostraram uma resposta diferenciada entre as plantas selvagem e *aqt* no que diz respeito ao desenvolvimento de raízes e a manutenção da dominância apical (figura 28). As plantas tipo selvagem crescidas em placas com auxina mostraram uma perda da dominância apical e a presença de grande quantidade de raízes laterais. As plantas *aqt* mostraram, por sua vez, fenótipo de parte aérea quase sem alterações, no entanto apresentaram um tufo de raízes (semelhante ao fenótipo observado nas linhagens com super expressão do gene, ver item 8.2).

Fenótipo similar foi observado quando plantas tipo selvagem e *aqt* foram crescidas inicialmente por 14 dias em meio MS e depois transferidas para meio MS suplementado com auxina.



Figura 28: Fenótipo de plantas tipo selvagem e *aqt* crescidas em meio MS suplementado com auxina. Plantas tipo selvagem apresentaram perda de dominância apical e aumento na quantidade de raízes laterais. Plantas *aqt* apresentaram a parte aérea pouca afetada, enquanto o sistema radicular apresentava a formação de grande quantidade de raízes laterais curtas. Barra: 0,5 cm.

8. Análise do padrão de expressão do gene *At1g55430* a partir da fusão da região regulatória 5' com o gene marcador GUS

A análise da seqüência regulatória de um determinado gene pode fornecer uma série de informações importantes para o entendimento da sua função. Além disso, a identificação de regiões promotoras de genes expressos de maneira específica em determinados tecidos poderá servir como uma ferramenta em biotecnologia vegetal, visto que sua utilização poderá permitir a expressão de genes de interesse em tecidos específicos.

O padrão espacial de expressão pode ser obtido através de experimentos de hibridação *in situ*, onde o mRNA é detectado diretamente com a utilização de uma sonda específica ou então pela utilização de plantas transgênicas contendo a região regulatória do gene associada a um gene marcador.

Em alguns casos específicos a utilização de hibridação *in situ* pode ser complicada. Este é o caso da análise de uma família de genes com alta similaridade, onde o problema de hibridização cruzada pode mascarar o resultado. Além disso, outro problema para utilização desta técnica está relacionado com sua sensibilidade. Como visto anteriormente, o gene *At1g55430* apresenta uma expressão relativamente baixa, o que dificultaria sua detecção, e o sítio de maior expressão é a raiz, um tecido de difícil fixação, por apresentar células com grandes vacúolos. Devido a sua complexidade, este experimento está sendo feito em colaboração com a Dra. Janice de Almeida-Engler, do UMR-Interactions Plantes-Microorganismes et Sante Vegetale - INRA/CNRS/UNSA

Visando obter o padrão de expressão do gene *At1g55430* a estratégia escolhida foi a fusão da região regulatória 5' deste gene com os genes marcadores *GFP* e *GUS* (figura 18 C – p430::GFP-GUS). Foi considerada como provável região regulatória um fragmento de cerca de 1877 pb localizado entre o sítio de início de tradução do gene *At1g55430* e o stop códon do gene imediatamente anterior a ele (figura 29 A).

Plantas de *A. thaliana* foram transformadas com a construção p430::GFP-GUS pelo método "floral dip". Para seleção das linhagens transformadas cerca de 2000 sementes

das plantas transformadas com esta construção foram crescidas em placas contendo meio MS acrescido de Basta[®]. A seguir, as sementes das plantas resistentes foram novamente selecionadas em meio com Basta[®]. Aquelas linhagens que apresentaram uma relação de três plantas resistentes para cada planta sensível (segregação de 3:1), indicando a existência de apenas uma cópia do inserto, foram selecionadas e sua prole submetida a nova seleção em busca de plantas homozigotas (100% de resistência).

Após a seleção, foi feita a análise das plantas transformadas através de ensaios histoquímicos, onde cortes e/ou órgãos inteiros foram incubados a fresco, na presença do substrato da enzima β -glucuronidase, que converte o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronídeo (X-gluc) em um produto de cor azul, de fácil detecção em microscópio ótico ou lupa.

A análise histoquímica das plantas selecionadas mostrou a expressão da enzima β -glucuronidase apenas nas estípulas de plantas com duas semanas de crescimento (figura 29 B). Plantas crescidas por seis semanas apresentaram expressão desta enzima na base do carpelo, na base das silíquas jovens, nos estames, na junção entre a raiz principal e as raízes secundárias, e nos primórdios de raízes laterais (figura 29 B). Com exceção da expressão nas estípulas, o padrão de expressão nas plantas contendo a construção p430::GFP-GUS contrasta com parte dos resultados prévios observados na linhagem GAL4-VP16/UAS-GFP, onde a expressão de GFP foi analisada (item 7.1 da introdução).

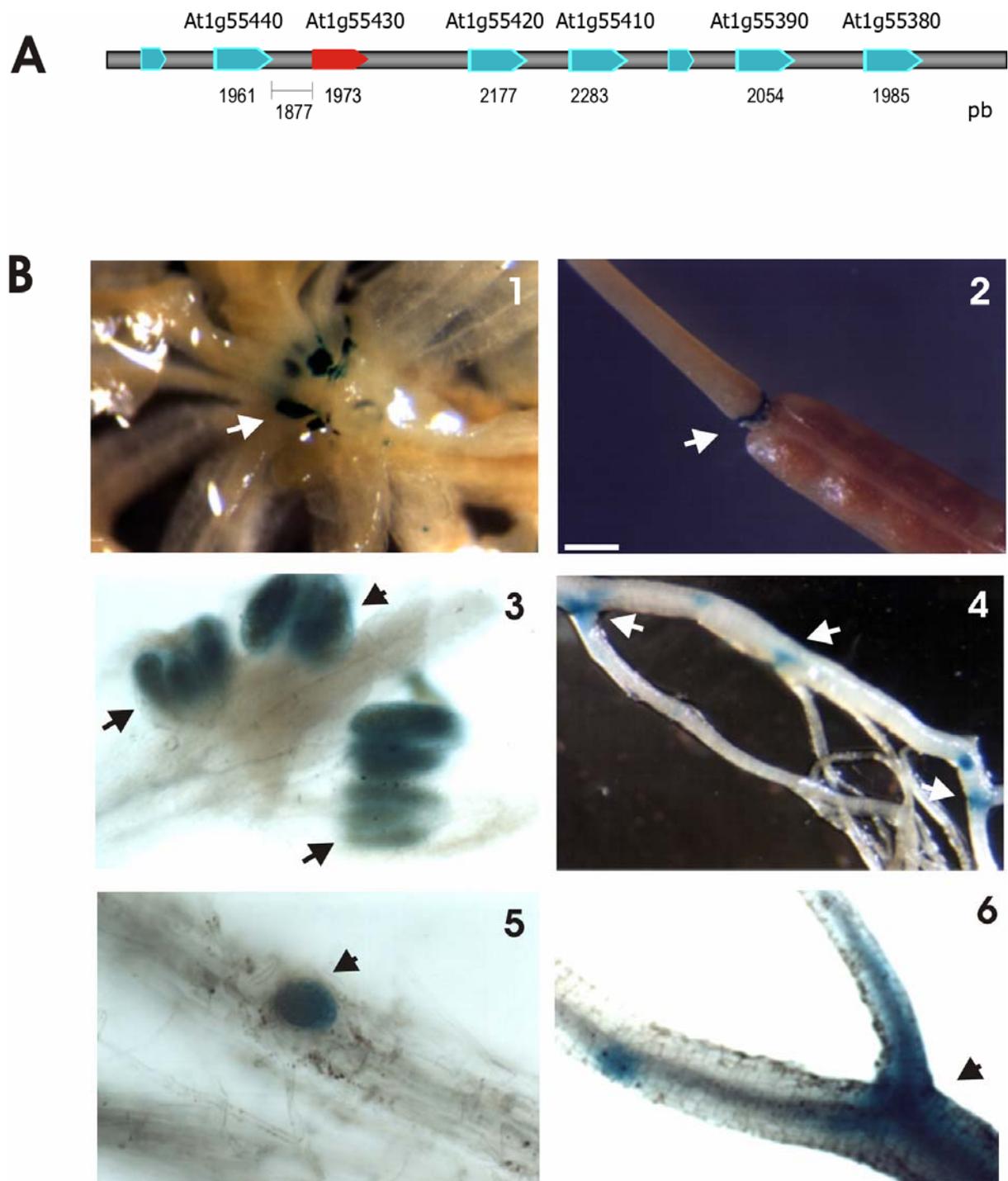


Figura 29: Diagrama da organização da região do cromossomo 1 contendo o gene *At1g55430* e seus parálogos e padrão de expressão fornecido pela construção p430::GFP-GUS. (A) Diagrama mostrando a posição dos primers usados para amplificação da provável região promotora do gene *At1g55430*. (B) Plantas transformadas com p430::GFP-GUS com duas semanas apresentaram marcação de GUS apenas nas estípulas (1). Atividade GUS também foi detectada na parte basal de silíquas jovens (2), nos estames (3), junção entre a raiz principal e as raízes secundárias (4 e 6), e nos sítios de iniciação dos primórdios de raízes secundárias (5).

9. Efeito fenotípico do silenciamento e da super expressão do gene *At1g55430*

A análise da função do gene *At1g55430* também foi realizada através da análise de plantas transgênicas que o super expressam, assim como de plantas com o silenciamento de sua expressão. Experimentos para construção dos vetores assim como transformação de plantas foram realizados anteriormente (Alves-Ferreira, M. e Meyerowitz, E.; comunicação pessoal).

Para o experimento de super expressão plantas foram transformadas com uma construção contendo a seqüência codificante do gene clonada sob controle do promotor constitutivo 35S CaMV (35S::*At1g55430* – figura 18 B).

Para obtenção do bloqueio da expressão do gene foi utilizada a estratégia de RNA interferência (RNAi - Karimi *et al*, 2002; Wang e Waterhouse, 2001). Para isto plantas foram transformadas com a construção RNAi::*At1g55430* (figura 18 A), contendo a seqüência do gene compreendida entre as posições 315 e 471 pb, nas posições sense e antisense, sob controle do promotor 35S CaMV. Este fragmento foi selecionado por ser o mais divergente e por não apresentar mais que 20 nucleotídeos idênticos justapostos em nenhum dos membros da família gênica, o que evita o silenciamento de outros genes desta família (Wesley *et al.*, 2001) (figura 30).

As plantas transgênicas obtidas com estas duas construções (para superexpressão ou silenciamento do gene *At1g55430*) foram avaliadas fenotipicamente.

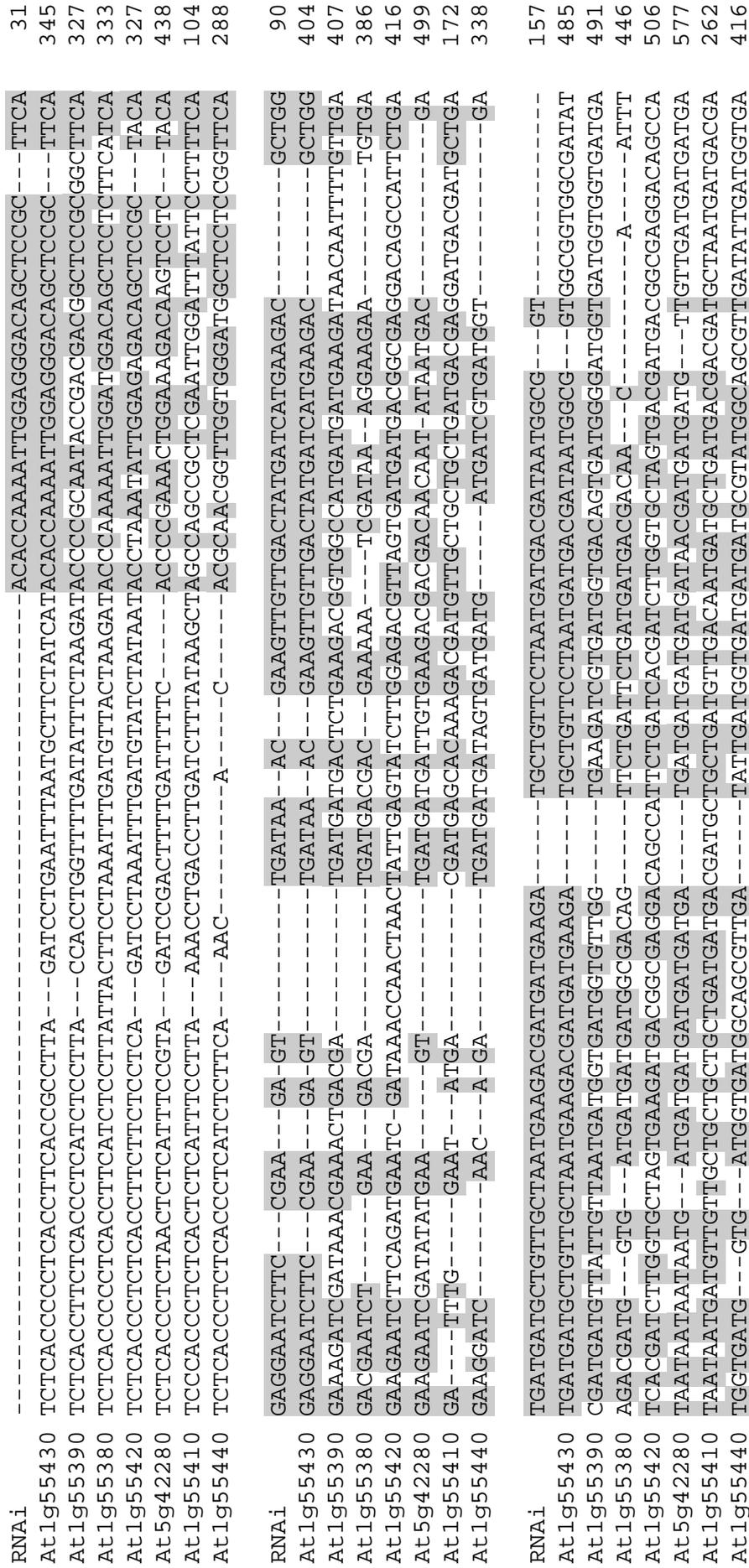


Figura 30: Alinhamento da região mais divergente nas proteínas da família gênica obtido pelo programa ClustalW. A região mais divergente entre a sequência de aminoácidos da proteína At1g55430 e os demais membros da família (At1g55380, At1g55390, At1g55410, At1g55420, At1g55440, At5g42280) foi usada para obtenção do bloqueio, de forma específica, da expressão do gene At1g55430. As caixas cinzas indicam resíduos idênticos e os traços indicam os intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento.

9.1. Caracterização das plantas transgênicas através de análise de segregação

Para seleção das linhagens transformadas, aproximadamente 5.000 sementes provenientes das transformações com as construções 35S::At1g55430 ou RNAi::At1g55430 foram selecionadas em placas contendo meio MS acrescido de 50 mg/L de canamicina. Após duas semanas de crescimento em placa, foi realizada a contagem das plântulas de cada linhagem resistentes ao antibiótico.

Foram selecionadas doze linhagens portando a construção 35S::At1g55430 e trinta linhagens portando a construção RNAi::At1g55430 apresentando uma relação de três plantas resistentes para cada planta sensível (segregação de 3:1), indicando a existência de apenas uma cópia do inserto. A seguir estas linhagens foram submetidas a uma nova seleção em busca de plantas homozigotas (100% de resistência). Foram obtidas três linhagens homozigotas com um único inserto de T-DNA para a construção 35S::At1g55430 e sete linhagens homozigotas com um único inserto de T-DNA para a construção RNAi::At1g55430.

As linhagens obtidas foram então avaliadas quanto a expressão do gene *At1g55430* assim como quanto as características fenotípicas.

9.2. Análise molecular das plantas transgênicas

Uma vez obtidas as plantas transgênicas homozigotas com as construções 35S::At1g55430 e RNAi::At1g55430, estas foram avaliadas quanto à expressão do gene endógeno através de RT-PCR e *Northern blot*. Estes experimentos visaram estabelecer a eficácia da super expressão, bem como o nível do bloqueio da expressão do gene, e a associação do fenótipo observado ao nível de expressão.

9.2.1. Análise por RT-PCR

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se amostra de mRNA total extraído de raízes de plantas homozigotas transformadas com as construções RNAi::At1g55430 e 35S::At1g55430 e iniciadores específicos para a sequência *At1g55430*. O produto de amplificação obtido na reação de RT-PCR corresponde a 779 pb e sua identificação foi feita por meio de eletroforese e gel de agarose (figura 31). Como controle da quantidade inicial de RNA e da síntese de cDNA foram usados iniciadores específicos para actina 2 e 8 (Charrier *et al.*, 2002). Nas plantas RNAi::At1g55430 foi observada uma redução na expressão do transcrito endógeno. Já nas plantas 35S::At1g55430 foi observada uma redução na expressão endógena do transcrito na linhagem L13.05.02, indicando um evento de co-supressão, e um aumento na expressão do transcrito endógeno na linhagem L06.02.05. O nível de transcritos nestas plantas mostrou uma correlação com o fenótipo observado nas plantas transformadas, no que diz respeito a alterações na morfologia e padrão vascular de folhas e morfologia de raiz.

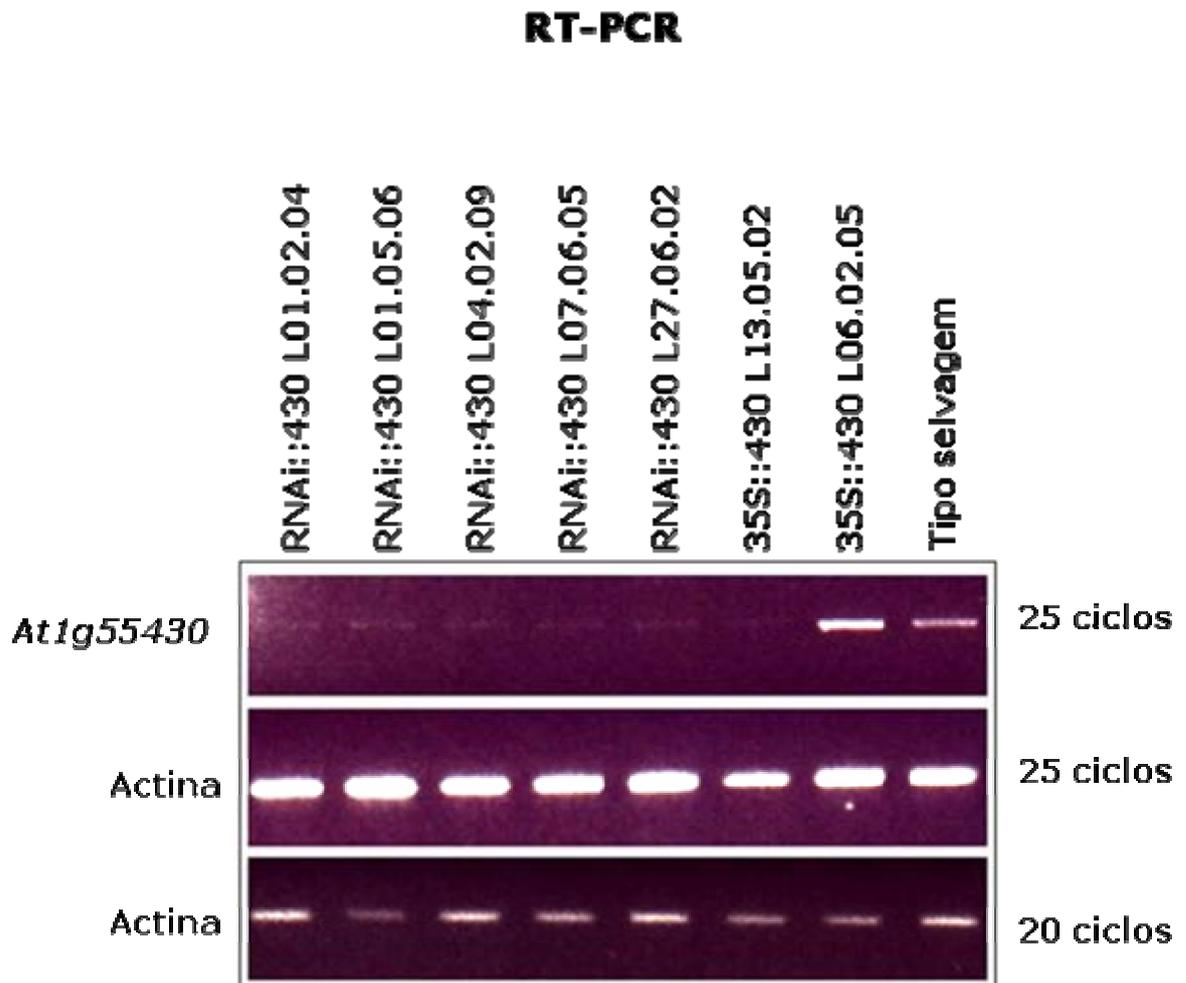


Figura 31: Perfil eletroforético do produto de RT-PCR obtido com os iniciadores específicos para amplificar o gene *At1g55430*. Fotografia de gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador por UV. Análise por RT-PCR dos transcritos do gene *At1g55430* em raízes de plantas selvagem e transformadas com as construções RNAi::*At1g55430* e 35S::*At1g55430*. Os números à direita em cada painel indicam o número de ciclos da reação. Como controle da quantidade de inicial de RNA e da reação da transcriptase reversa foram usados iniciadores para actina 2 e 8.

9.2.2. Análise por *Northern blot*

Análise por *Northern blot* mostrou redução no nível de transcritos *At1g55430* em plantas transformadas com a construção RNAi::*At1g55430* e que plantas transformadas com a construção 35S::*At1g55430* apresentavam aumento na expressão de transcritos endógenos do gene (figura 32). Porém, não foi possível observar o sinal de hibridização com *At1g55430* em raízes de plantas tipo selvagem conforme o esperado, indicando que a técnica não teve sensibilidade suficiente para detectar a expressão do gene *At1g55430*.

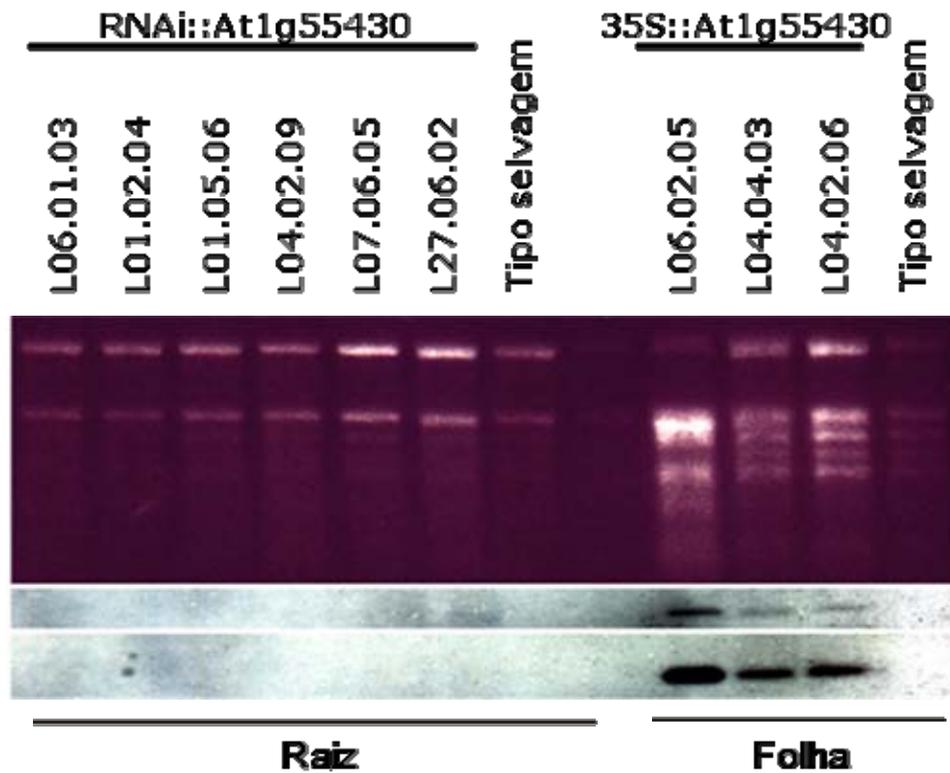


Figura 32: Análise por *Northern blot* do acúmulo de transcritos *At1g55430*. Fotografia de gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador por UV. Para análise do nível de transcritos em plantas transformadas com as construções RNAi::*At1g55430* e 35S::*At1g55430* foram extraídos RNAs de raízes e folhas de plantas tipo selvagem e transformadas, respectivamente. A sonda utilizada foi um fragmento interno (930 bp) do gene *At1g55430*.

9.3. Caracterização fenotípica das plantas transgênicas

Análises preliminares de plantas portando a construção 35S::At1g55430 da geração T2 (heterozigotas) mostrou uma grande redução no comprimento das raízes, que formavam tufos com raízes de no máximo 2 cm. As folhas destas plantas apresentavam pequenas alterações em sua forma e no padrão de seus feixes vasculares (tabela 4). Plantas da geração T3 (homozigotas) também apresentavam tufos de raízes com cerca de 1-2 cm de comprimento; e apenas 1-2% destas plantas conseguiram sobreviver mais que duas semanas (figura 33). Uma das linhagens (L13.05.02) apresentou características fenotípicas semelhantes às do mutante *aqt* (dados não mostrados).

Tabela 4: Análise fenotípica preliminar de plantas 35S::At1g55430.

Linhagem 35S::At1g55430		N	Morfologia das Raízes		Morfologia de folhas		Padrão vascular em folhas	
			normal	tufo de raízes curtas	normal	alterada	normal	alterado
L04	L04.02	08	01	07	07	03	10	-
	L04.04	10	10	-	09	01	10	-
	L04.06	06	06	-	06	-	na	Na
L06	L06.02	13	04	09	10	03	10	03
L13	L13.05	10	10 *	-	07	03	08	02
	L13.11	07	07	-	07	-	07	-

* raízes mais longas. N – número de plantas analisadas. na – não analisadas.

35S::At1g55430
L04.02.06 L06.02.05 *aqt*

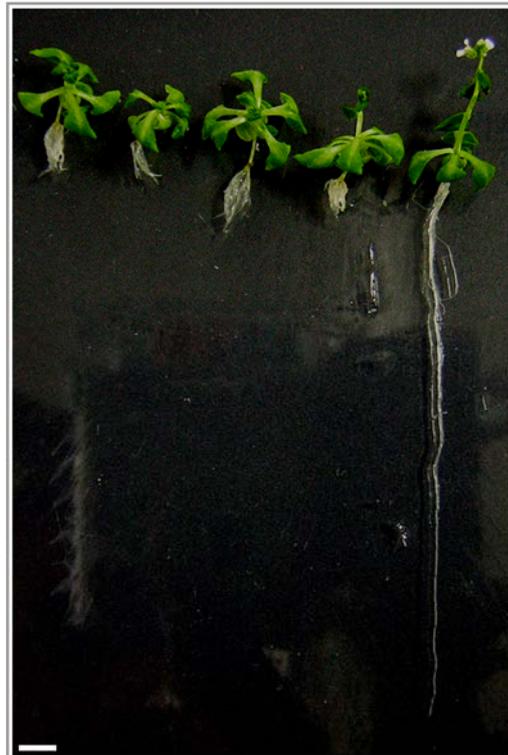


Figura 33: Fenótipo de plantas 35S::At1g55430 e *aqt* crescidas em placas por quatro semanas. Plantas transformadas com a construção 35S::At1g55430 apresentam tufo de raízes medindo entre 1-2 cm de comprimento, enquanto que a planta *aqt* apresenta uma raiz principal longa. Barra: 1 cm.

A análise fenotípica preliminar das plantas transformadas com o vetor RNAi::At1g55430 mostrou que estas plantas apresentavam raízes de comprimentos variados, em geral pouco mais compridas que as raízes de plantas tipo selvagem. Além disto, foram observadas pequenas variações na morfologia das folhas e na formação do sistema vascular. No entanto, estas análises ainda são preliminares (tabela 5).

Tabela 5: Análise fenotípica preliminar de plantas RNAi::At1g55430.

Linhagem RNAi::At1g55430		N	Morfologia de folhas		Padrão vascular em folhas	
			normais	alterados	normais	Alterados
L01	L01.02	10	04	06	8	2
	L01.05	10	06	04	7	3
	L01.07	06	06	-	na	Na
L04	L04.02	10	05	05	07	03
L06	L06.01	09	08	01	na	na
	L06.04	10	02	08	09	01
L07	L07.06	10	08	02	na	Na
L22	L22.02	07	07	-	na	Na
L25	L25.03	07	06	01	na	Na
L27	L27.06	10	07	03	na	na
	L27.07	13	13	-	na	na

N – número de plantas analisadas. na – não analisadas.

10. Análise das seqüências promotoras dos genes

Visando identificar os possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição presentes na região regulatória do gene *At1g55430* foi utilizado o programa MatInspector – Genomatix (<http://genomatix.gsf.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>). Foi feita uma busca na seqüência de 3000 pb localizada acima do códon de início deste gene, que revelou a presença de uma variedade de prováveis sítios regulatórios, como pode ser visto na tabela 6. Entre os prováveis sítios de ligação de fatores de transcrição foi observada a presença dos sítios de ligação das proteínas ATHB5 (uma proteína HD-ZIP de classe I, envolvida na regulação da atividade do ácido abscísico em plântulas em crescimento) e WUSCHEL (necessário para promover a identidade de células dos meristemas apical e floral, mantendo sua integridade estrutural e funcional).

DISCUSSÃO

A linhagem mutante *aqt* foi obtida através da inserção de um T-DNA (construção 35S::GAL4-VP16 UAS::GFP) 200 pb abaixo do códon de iniciação do gene *At1g55430*. As plantas desta linhagem apresentavam baixa estatura, folhas alongadas e fletidas para baixo, um feixe vascular paralelo à margem da folha e a diminuição no tamanho das silíquas. Uma análise inicial forneceu indicações de que o gene *At1g55430* poderia estar envolvido em processos como a diferenciação do tecido vascular, bem como com o desenvolvimento foliar e radicular. Com o objetivo de estudar a função do gene *At1g55430* foi realizada uma análise detalhada do mutante *aqt*, bem como a determinação do padrão de expressão deste gene.

Uma análise fenotípica mais detalhada de plantas desta linhagem mostrou que as principais características associadas à ausência da expressão deste gene são: má formação dos feixes vasculares em folhas e cotilédones (figuras 21 e 22); alterações na forma, tamanho e número de folhas da roseta (figura 20; gráfico 1); atraso na emissão do eixo de inflorescência (tabela 1); aumento na quantidade de feixes de xilema e floema em eixos de inflorescência (figura 23); redução no tamanho global da planta com eixos de inflorescência curtos (gráfico 2; figura 20); perda da dominância apical no eixo de inflorescência (figura 20); silíquas menores e mais grossas (figura 20); aumento no comprimento e diâmetro da raiz principal, bem como na quantidade e comprimento dos pêlos presentes nestas raízes (tabela 3, figura 24 e 25); e menor quantidade de raízes laterais desenvolvidas, resultando em um sistema de raízes menos complexo que o das plantas selvagens.

1. Análise do perfil de expressão do gene *At1g55430*

A caracterização inicial do perfil de expressão de GFP em plântulas heterozigotas desta linhagem (Alves-Ferreira, M. e Meyerowitz, E.; comunicação pessoal) mostrou uma expressão transiente de GFP no MAC, nas estípulas e nas células do sistema vascular de

folhas em desenvolvimento, inflorescências e raízes (figura 14 e 15). As raízes principais destas plantas apresentaram uma forte expressão restrita às células da epiderme, nas zonas de divisão e alongamento celular, e nos pêlos radiculares (figura 15). Já as raízes laterais também apresentam expressão em seus meristemas (figura 15). Uma análise da expressão de GFP durante o desenvolvimento embrionário também mostrou expressão nas células apicais de embriões no estágio globular (figura 14). Com o desenvolvimento do embrião esta expressão vai sendo restrita as extremidades que darão origem aos cotilédones em embriões no início do estágio cordiforme, e as regiões referentes ao ápice do caule e da raiz em embriões no final do estágio cordiforme e torpedado (figura 14). Através de análises por RT-PCR e PCR em tempo real foi visto que o gene *At1g55430* é predominantemente expresso em raízes de plantas do tipo selvagem, mas foi possível também observar baixa expressão em flores e siliquas (figura 17).

Posteriormente, um experimento de hibridização *in situ*, realizado em colaboração com a Dra. Janice de Almeida-Engler, confirmou a expressão do gene *At1g55430* no MAR, na zona de alongamento das raízes, nos tricoblastos e nas raízes mais jovens (figura 16). Também foi observada a expressão do gene nos primórdios foliares e na base dos tricomas de folhas adultas, além de uma fraca expressão no MAC (dados não mostrados). Em adição, este experimento informou a expressão do gene no hipocótilo de plântulas cinco e oito dias após a germinação e no tecido vascular do hipocótilo (dados não mostrados).

Uma análise histoquímica de plantas de *Arabidopsis* transformadas com uma construção contendo a provável região regulatória do gene *At1g55430* fusionada ao gene marcador GUS mostrou a expressão da enzima β -glucoronidase nas estípulas em plântulas, na base do carpelo, na base das siliquas jovens, nos estames e na junção entre a raiz principal e as raízes laterais mais velhas (figura 29). Portanto, em comparação com os sítios de expressão observados com experimentos de hibridização *in situ* e UAS::GFP, apenas a expressão nas estípulas foi conservada nas plantas p430::GFP-GUS. O padrão de expressão nas raízes contrasta com os resultados prévios onde a expressão é observada também nos tricoblastos (figura 15).

Esta diferença observada no padrão de expressão provavelmente é devida à ausência de elementos regulatórios na região usada para fusão com o gene repórter GUS. Como foi considerada como provável seqüência regulatória deste gene, uma seqüência de 1877 pares de bases compreendida entre a extremidade 3' do gene *At1g55540* e a extremidade 5' do gene *At1g55430*, este resultado indica a existência de elementos reguladores que controlam a expressão tecidual deste gene fora desta região.

A organização genômica dos genes parálogos ao *At1g55430*, com uma organização em justaposição de seis genes (figura 13), e os nossos resultados com a fusão p430::GFP-GUS (figura 29) indicam que a regulação desta família pode envolver acentuadores comuns. Dos genes parálogos de *At1g55430*, somente a expressão de *At1g55420* foi investigada detalhadamente. É interessante observar que a expressão deste gene em anteras de flores no estágio 9 do desenvolvimento floral (Alves-Ferreira, M. e Meyerowitz, E.; comunicação pessoal) coincide como o padrão de expressão da fusão p430::GFP-GUS. Isto sugere que elementos reguladores para expressão em anteras foram conservados entre estes dois genes e que possivelmente um evento distinto de modificação do promotor levou a modificação do padrão de expressão em *At1g55430*. Assim, esses resultados indicam que, dentro desta família gênica, os elementos de expressão para antera estavam presentes antes do processo de amplificação gênica. Apesar destas informações revelantes, o padrão de expressão observado na linhagem p430::GFP-GUS nos impediu de realizar experimentos com o objetivo de se entender mais sobre função do gene na fisiologia da planta, tais como resposta a hormônios ou estresses.

Visando identificar a presença de possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição foi feita uma análise da seqüência de 3000 pb localizada na extremidade 5' do gene. Esta busca revelou a presença de seqüências reguladoras TATA e CAAT box, envolvidas na regulação da transcrição, bem como de vários possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição (tabela 6). Entre eles foi observada a presença de possíveis domínios de ligação das proteínas ATHB5 e WUSCHEL. Já foi visto que a proteína ATHB5 é um fator transcricional da família HD-ZIP I que atua como um regulador da atividade

do ácido abscísico em plântulas em crescimento (Johannesson *et al.*, 2003) e que a proteína WUSCHEL é necessária para manter a integridade estrutural e funcional dos meristemas apical e floral (Schoof *et al.*, 2000). No entanto, nenhum sítio relacionado a genes de resposta a hormônios, significativo para nossa hipótese, foi encontrado nesta região.

2. Caracterização do sistema aéreo de plantas mutantes *agt*

A arquitetura global do sistema aéreo vegetal é derivada da atividade do meristema apical do caule (MAC), que surge durante a embriogênese, junto com a atividade de meristemas adicionais formados subsequentemente após a germinação da semente. O MAC é responsável pelo eixo principal do corpo vegetal. Durante o desenvolvimento, a arquitetura da planta é modificada devido à ramificação que resulta da atividade dos meristemas adicionais (pós-embrionários). A complexidade do padrão de ramificação depende do desenvolvimento temporal e espacial destes ramos. Estas características, apesar da plasticidade nas respostas aos sinais ambientais, são geneticamente determinadas, e variam dentro de cada espécie.

Assim, o crescimento da parte aérea das plantas requer a atividade contínua do MAC. A atividade do MAC é regulada pela atividade de fatores transcricionais da família *KNOX*, bem como pela atividade hormonal. Os genes *KNOX* atuam na manutenção do estado indiferenciado das células do meristema e a diminuição nos níveis de atividade de genes *KNOX* nas células fundadoras do primórdio foliar é essencial para o desenvolvimento foliar (Volbrecht *et al.*, 2000). Associado a isto, foi visto que o gradiente de auxina proveniente da parte aérea influencia a iniciação do primórdio foliar na periferia do MAC (Reinhardt *et al.*, 2003).

Segundo o modelo para regulação da filotaxia sugerido por Reinhardt *et al.* (2003), o primórdio foliar em desenvolvimento no MAC absorve a auxina vinda do ápice, retirando a auxina das células ao seu redor. Desta forma, a auxina só alcança a zona organogenética periférica do MAC a uma determinada distancia mínima do primórdio. O

acúmulo de auxina nesta região induz a formação de um novo primórdio, o que reinicia o processo.

As proteínas carreadoras de auxina presentes nas membranas das células condutoras de auxina são responsáveis pelo fluxo polar de auxina (Friml e Palme, 2002). A entrada da auxina na célula pode ocorrer por difusão ou pela atividade de proteínas carreadoras de influxo, e a saída pela atividade de proteínas carreadoras de efluxo, presentes na base da célula. Estudos mostraram que a proteína carreadora de influxo AUXIN RESISTANT1 (AUX1) pode ser localizada na face abaxial da epiderme de todo o primórdio foliar e na camada L1 do meristema, e que a proteína carreadora de efluxo PIN FORMED1 (PIN1) pode ser localizada na epiderme e nas células vasculares do primórdio em desenvolvimento, e nas camadas L1 e L2 do MAC (Reinhardt *et al.*, 2003).

O padrão de localização das proteínas AUX1 e PIN1 indica que a auxina é transportada para o MAC pela camada celular externa L1. Os nossos experimentos de análise de expressão mostraram que o gene *At1g55430* é expresso em baixos níveis na camada L1 do MAC (figura 14) e possivelmente está localizado nas células do sítio de iniciação do primórdio da folha (dados não mostrados). Também foi observada a expressão no sistema vascular em processo de diferenciação de folhas em desenvolvimento (figura 14). Esse padrão de expressão é uma indicação da possível atividade de *AQT* nos processos de transdução ou percepção de sinais mediados pela auxina.

Foi observado também que as plantas *aqt* apresentam um aumento no número de folhas da roseta, o que pode ser consequência de uma permanência maior na fase vegetativa de desenvolvimento, em comparação com as plantas tipo selvagem. As folhas do mutante *aqt* são mais estreitas e mais compridas que as folhas de plantas tipo selvagem, e apresentam uma curvatura para baixo em suas extremidades (figura 20). Além disso, os experimentos de análise de expressão mostraram que *AQT* é expresso na epiderme foliar, principalmente nas margens da folha (figura 14).

No entanto, nossos dados não são suficientes para se formular uma hipótese satisfatória para atuação de *AQT* no processo de desenvolvimento foliar. Ainda são

necessários experimentos para verificar se estão ocorrendo problemas na expansão celular, tanto na direção longitudinal quanto na transversal, e/ou alterações nos números de células presentes nas folhas do mutante *aqt*. Outra possibilidade que precisa ser avaliada é se a ausência de *AQT* poderia estar causando prejuízos para a atividade de genes envolvidos no estabelecimento do domínio abaxial como, por exemplo, os genes da família *KANADI* (Emery *et al.*, 2003).

As folhas são caracterizadas por uma complexa rede de tecido vascular (Aloni, 2001; Candela *et al.*, 1999; Sachs, 1981), um rápido desenvolvimento vascular e a manutenção de um padrão determinado para o aparecimento dos feixes vasculares (Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999). A diferenciação vascular é limitada às fases iniciais do desenvolvimento do primórdio foliar (Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999) e a formação de um padrão vascular, com células interconectadas, é crítica para a atividade vascular.

Evidências indicam que o fluxo apical-basal da auxina, sintetizada durante a morfogênese foliar, atua controlando a formação do padrão de feixes vasculares e a diferenciação vascular em *Arabidopsis* (Aloni *et al.*, 2003; Aloni, 2001). Foi observado que o uso de inibidores do transporte de auxina (Mattsson *et al.*, 1999, 2003; Sieburth, 1999; Tsiantis *et al.*, 1999) e mutações em genes que afetam este transporte (Geldner *et al.* 2004, Hardtke *et al.* 2004; Mattsson *et al.*, 2003, 1999; Berleth *et al.*, 2000) causam alterações no padrão vascular em folhas de *Arabidopsis*. Estudos mostraram que a superprodução de auxina leva ao aumento do tecido vascular em plantas transgênicas enquanto sua inativação leva a diminuição da diferenciação do tecido vascular (Romano *et al.*, 1991; Klee *et al.*, 1987).

Também foi visto que esteróis são importantes para a formação dos feixes vasculares em folhas uma vez que o bloqueio na via de biossíntese de esteróis, como visto nos mutantes *fackel* (Jang *et al.*, 2000, Schrick *et al.*, 2000) e *cvp1* (Carland *et al.*, 2002), causa a formação de feixes vasculares descontínuos e em menor número em cotilédones (Carland *et al.*, 2002; Schrick *et al.*, 2002; Souter *et al.*, 2002; Diener *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000; Choe *et al.*, 1999).

As alterações no padrão vascular de folhas podem ser causadas por perturbações em diversos processos. Os possíveis problemas incluem defeitos na informação espacial para posicionamento de novos feixes vasculares e na habilidade para formar novos feixes vasculares (Meinhardt, 1996, Sachs, 1981, 1991).

Em cotilédones de plantas tipo selvagem pode ser observado um feixe vascular principal que se estende pelo eixo proximal-distal e que, a partir dele se ramificam feixes vasculares secundários formando quatro aréolas (figura 22 A). Foi observado que a ausência de expressão de *At1g55430* em plantas *aqt* causa uma redução na complexidade vascular em cotilédones (figura 22 B-D; gráfico 3), devida principalmente à redução do número de feixes vasculares secundários, o que resulta na redução do número de aréolas presentes (figura 22 B-D; gráfico 3). No entanto, o feixe vascular principal do mutante apresenta-se contínuo e sem alterações, de forma similar ao observado em cotilédones tipo selvagem.

Vários mutantes com alterações na complexidade de seus sistemas vasculares já foram identificados. Os mutantes *cotyledon vascular pattern 1 e 2* (*cvp1* e *cvp2*) apresentam alterações em seus padrões vasculares. No entanto, apresentam uma morfologia global normal, e o crescimento e o desenvolvimento das raízes, os níveis de auxina livre, o transporte de auxina no eixo e a sensibilidade à auxina exógena semelhantes aos observados em plantas tipo selvagem (Carland *et al.*, 1999).

Os mutantes *cvp1* apresentam cotilédones com feixes vasculares mal alinhados e com alongamento celular reduzido. *CVP1* codifica a enzima *sterol metiltransferase 2* (SMT2) da via biossintética dos esteróis (Carland *et al.*, 2002). Plantas *cvp1* apresentam um aumento nos níveis de campesterol (precursor dos brassinosteroides) e redução nos níveis de sitosterol (precursor dos esteróis), o que leva a níveis de brassinosteróides mais altos que os observados em plantas tipo selvagem (Carland *et al.*, 2002). Como estas plantas não apresentam as células vasculares organizadas em feixes paralelos, mas em feixes fragmentados, foi sugerido que *CVP1* atua na promoção da polarização e alinhamento da célula vascular (Carland *et al.*, 2002). O fato dos mutantes *cvp1* apresentarem diminuição nos níveis de esteróis indica a sua necessidade para a correta

formação do padrão vascular. Assim, os esteróis podem atuar como um sinal específico para a formação de um padrão vascular correto ou, alternativamente, sua presença na membrana pode ser uma exigência estrutural para a montagem e/ou atividade de proteínas de membrana (como as proteínas PIN carreadoras do efluxo de auxina) envolvidas na formação do padrão vascular (Carland *et al.*, 2002).

Os mutantes *cvp2* apresentam defeitos vasculares em cotilédones e folhas. Nos cotilédones os defeitos vasculares estão restritos aos feixes vasculares secundários, que terminam prematuramente e que podem estar presentes em um número superior ao observado em cotilédones de plantas tipo selvagem. Nas folhas os feixes vasculares primários e secundários são aparentemente normais, porém os demais feixes vasculares estão alterados, se apresentando fragmentados ou terminando abruptamente (Carland *et al.*, 1999). Estes dados indicam uma aparente perda na orientação dos feixes vasculares em desenvolvimento no mutante *cvp2*.

Foi visto que *CVP2* é expresso em células vasculares em desenvolvimento e que codifica uma 5PTase (polifosfoinositídeo 5-fosfatase) (Carland e Nelson, 2004), que desfosforila os fosfolipídios de inositol na posição 5 do anel inositol. Assim, *CVP2* atua como um regulador negativo da transdução de sinal do IP_3 e de outros mensageiros secundários (como o Ca^{2+}), uma vez que ao hidrolisar IP_3 e transformá-lo em uma forma inativa, ele interrompe a mobilização do Ca^{2+} (Carland e Nelson, 2004). Desta forma, a rede vascular aberta em mutantes *cvp2* pode ser atribuída à ausência da atividade de *CVP2*, que acarreta níveis elevados de IP_3 , o que resulta em uma liberação contínua de Ca^{2+} , e a uma alteração na regulação gênica. Esta alteração leva a uma redução no recrutamento de células que iriam se diferenciar em células vasculares, resultando em um término prematuro do feixe vascular (Carland e Nelson, 2004).

Estes dados mostram que os mutantes *cvp* são defeituosos em processos específicos de formação do padrão e diferenciação vascular, e que os genes *CVP1* e *CVP2* podem estar envolvidos na geração e/ou percepção de sinais de posição que especificam o arranjo espacial do procâmbio em tecidos em desenvolvimento (Carland *et al.*, 1999).

Outro mutante que apresenta defeitos semelhantes nos padrões vasculares em cotilédones, folhas, sépalas e pétalas, é o mutante *scarface* (*sfc*) de *Arabidopsis*. Ao contrário das plantas tipo selvagem que apresentam feixes lineares e contínuos nestes órgãos, em mutante *scf* os feixes secundários e terciários são em grande parte substituídos por pequenos segmentos de feixes descontínuos (Deyholos *et al.*, 2000). Foi visto também que mutantes *scf* apresentam maior sensibilidade a aplicação de auxina exógena. Estas observações indicam que *SFC* pode ser necessário para formação de um padrão normal contínuo de feixes vasculares secundários em cotilédones.

Cabe ressaltar que a diferenciação vascular normalmente ocorre de forma descontínua, uma vez que os elementos de vasos individuais apresentam velocidades diferentes de maturação, de acordo com a proximidade com os sítios de produção de auxina (Scarpella e Mejer, 2004; Pyo *et al.*, 2004). No final do processo, os elementos de vasos isolados se unem em um feixe vascular contínuo. Assim, o fenótipo observado em mutantes defeituosos na formação de feixes vasculares contínuos, como por exemplo, o *scarface* pode ser decorrente da persistência destas discontinuidades no final do desenvolvimento nas folhas adultas. Estes defeitos podem ser decorrentes de mutações em genes que codificam componentes da maquinaria de transporte polar de auxina, como aqueles que causam alterações no transporte de auxina (Carland e McHale, 1996; Przemeck *et al.*, 1996), ou sensibilidade à auxina (Deyholos *et al.*, 2000). Por outro lado, a discontinuidade vascular em mutantes onde a síntese, o transporte e a percepção da auxina permanecem normais indica a existência de fatores adicionais envolvidos na regulação do padrão vascular da folha, entre eles os esteróis.

A presença de um feixe vascular principal intacto e de feixes vasculares secundários fragmentados ou ausentes nos cotilédones de mutantes *sfc*, *cvp*, bem como em mutantes *aqt*, indicam a existência de vias separadas especificando o padrão destes dois tipos de feixes vasculares. Assim, a diminuição na complexidade do padrão vascular em cotilédones dos mutantes *aqt* poderia ser devida a uma perda aparente da capacidade de percepção de sinais que levam ao correto alinhamento e diferenciação das

células vasculares. Isto ocasionaria um término prematuro e/ou a não formação dos feixes vasculares secundários.

Em folhas de plantas tipo selvagem, o número total de pontos de ramificação por folha aumenta de acordo com o grau de desenvolvimento das folhas (tabela 2), confirmando que folhas adultas da roseta exibem um padrão vascular mais complexo do que as folhas jovens (Candela *et al.*, 1999). No mutante *aqt*, as folhas mais jovens apresentam o número total de pontos de ramificação superior ao encontrado nas folhas tipo selvagem (tabela 2). Este aumento na complexidade se deve principalmente ao aumento no número de feixes vasculares secundários e terciários presentes nestas folhas. Foi observado que estes feixes vasculares secundários e terciários apresentam um calibre reduzido em relação ao tipo selvagem e que muitas vezes terminam abruptamente, não se conectando a nenhum outro (figura 21).

O fenótipo do tecido vascular nas folhas de plantas *aqt*, assim como em cotilédones (acima), indica uma aparente alteração na informação espacial para o posicionamento de novos feixes vasculares. Além disso, o fato de que o transporte polar de auxina do seu local de síntese para a base do órgão é necessário para o estabelecimento do padrão vascular, associado à observação de que o gene *At1g55430* é expresso nas células vasculares de folhas no início do desenvolvimento, nos permite supor que possa estar ocorrendo algum defeito na transdução ou percepção de sinais mediados pela auxina no mutante *aqt*. Este defeito poderia resultar em uma redução na diferenciação das células vasculares e na falta de continuidade dos feixes vasculares.

Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de que o fenótipo do tecido vascular observado nas folhas *aqt* seja uma consequência indireta da ausência do gene *At1g55430* nestas plantas. Como foram coletadas folhas de plantas *aqt* e tipo selvagem de mesma idade, e como as plantas *aqt* aparentemente apresentam um desenvolvimento vegetativo mais rápido que as plantas tipo selvagem, i.e., aparentemente as folhas são iniciadas mais rapidamente, é possível que o fenótipo observado seja devido a uma diferenciação vascular também acelerada nestas folhas.

No entanto, a observação de que o gene *At1g55430* é expresso transientemente no MAC, nas estípulas, nas células do sistema vascular das folhas em desenvolvimento, do hipocótilo e das inflorescências, e na base dos tricomas é compatível com sua provável atuação na transmissão ou percepção de sinais mediados pela auxina. Um estudo desenvolvido por Aloni *et al.* (2003) mostrou que durante a morfogênese foliar ocorrem trocas graduais nos sítios de produção de auxina, o que vai controlar a formação de um padrão vascular e a diferenciação vascular nas folhas de *Arabidopsis*. Foi sugerido que durante os estágios iniciais do desenvolvimento do primórdio foliar, antes do aparecimento do feixe vascular principal, a auxina começa a ser produzida localmente, nas estípulas e na extremidade do primórdio. Mais tarde sítios secundários de produção de auxina podem ser encontrados nos hidatódios, presentes nas margens da lâmina do primórdio foliar, no mesófilo e na base dos tricomas (apêndices epidérmicos). A auxina produzida ao ser transportada induz a diferenciação vascular nas folhas. Além disto, a presença de *AQT* no sistema vascular em desenvolvimento do hipocótilo e das inflorescências coincide com a rota de transporte da auxina. Desta forma, *AQT* parece ser expresso nos sítios de produção e em regiões de influência direta da auxina, como o tecido vascular em desenvolvimento e zona de diferenciação da raiz principal. Neste último caso, a expressão parece ser transiente, indicando que *AQT* só seria necessário durante uma etapa dentro do processo de diferenciação destas células. Esse padrão de expressão de *AQT* pode estar ligado a um nível de auxina intracelular em ambos os casos. Porém, a ação da proteína codificada por *AQT* dependente da concentração de auxina pode ser diferente dentro do contexto celular de produção de auxina (ex: estípulas e meristema de raízes secundárias) ou de aumentos transientes de concentração em sítios de fluxo de auxina (tecido vascular do hipocótilo, da folha e da raiz principal, zona de diferenciação da raiz principal e tricoblastos).

Uma análise do tempo de floração e, subsequentemente, da taxa de crescimento do eixo de inflorescência de plantas *aqt* revelou diferenças significativas em relação às plantas tipo selvagem. Eixos de inflorescência de plantas *aqt* apresentam um crescimento retardado, mas contínuo, emergindo sete a dez dias após os eixos selvagens (tabela 1).

Nesta etapa, antes da emissão do eixo de inflorescência, pode ser observada a formação de uma estrutura, semelhante a um meristema aumentado, no centro da roseta. Este atraso e a formação desta estrutura expandida provavelmente estão relacionados com a ausência de expressão de *AQT* no MAC, o que pode estar afetando de alguma forma os eventos relacionados com a transição entre as fases de crescimento vegetativo e reprodutivo.

Foi observado ainda que a taxa de alongamento dos eixos de plantas *aqt* é menor, resultando, no fim do ciclo de vida, em um eixo apresentando de cinco a nove cm de altura, ao passo que os eixos de plantas selvagens apresentam eixos variando entre vinte e vinte e seis cm de altura (gráfico 2). Visando averiguar se a redução no tamanho do eixo de inflorescência está relacionada com uma alteração no desenvolvimento vascular foi feita uma análise histológica destes eixos.

Foi observado que a estrutura anatômica dos eixos de inflorescência de plantas *aqt* (i.e., a disposição dos diferentes tipos celulares) é semelhante à de plantas selvagens (figura 23). No entanto foi observado um aumento na quantidade de células vasculares (principalmente xilema), alterações na morfologia celular e redução na quantidade de células das regiões interfasciculares, principalmente na região basal dos eixos de inflorescência *aqt* (figura 23). Além disto, foi observado que as células da região basal destes eixos são bem menores que as células de eixos de plantas tipo selvagem.

O aumento significativo na quantidade de células vasculares, principalmente xilema, observado nos eixos de inflorescência do mutante *aqt*, é uma indicação de que as células do procâmbio e/ou do câmbio estão sendo estimuladas a se proliferar e diferenciar pela ausência da proteína AQT. Isto indica que *AQT* pode estar atuando na regulação da atividade de meristemas vasculares em eixos, possivelmente como um regulador negativo de genes envolvidos no desenvolvimento vascular secundário no eixo floral. A diferenciação acelerada das células da região interfascicular em células vasculares também poderia ser a causa da redução na quantidade de células nesta região.

Vários estudos mostram que os feixes de xilema são induzidos ao longo das vias do fluxo polar de auxina e que a interrupção neste fluxo inibe a formação do xilema (Mattsson *et al.*, 2003; Hamann *et al.*, 1999; Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999; Gälweiler *et al.*, 1998).

O gene *At1g55430* parece atuar de forma oposta ao gene *Arabidopsis thaliana homeobox gene-8 (ATHB-8)*. O gene *ATHB-8* codifica um fator transcricional da família *HD-ZIP III* e atua especificamente no desenvolvimento vascular (Kang e Dengler, 2002; Baima *et al.*, 1995, 2001). *ATHB-8* é expresso nas células do procâmbio e sua expressão é induzida pela aplicação de auxina (Scarpella *et al.*, 2004; Kang e Dengler, 2002, 2004; Mattsson *et al.*, 2003; Baima *et al.*, 1995). Foi visto que o aumento na expressão de *ATHB-8* acelera e estimula a formação prematura de xilema durante o desenvolvimento vascular primário e secundário (Baima *et al.*, 2001). No entanto, mutantes de perda de função *ATHB-8* não apresentam fenótipo algum, o que pode ser devido a uma redundância funcional com outros genes. Assim, apesar de *ATHB-8* não ser essencial para o desenvolvimento vascular, foi proposto que este gene pode atuar como um regulador positivo dos eventos de diferenciação de células do procâmbio e câmbio em resposta a sinais locais de auxina (Baima *et al.*, 1995, 2001).

Outro membro da família *HD-ZIP III* envolvido na regulação da diferenciação de células vasculares em *Arabidopsis* é o *ATHB-15*. Ao contrário de *ATHB-8*, o gene *ATHB-15* atua como um regulador negativo da formação do xilema (Kim *et al.*, 2005). Plantas com expressão de *ATHB-15* reduzida apresentam um fenótipo anão, com eixo de inflorescência com tamanho reduzido, folhas da roseta pequenas e com as lâminas curvadas para baixo. O padrão radial e a polaridade dos feixes vasculares são mantidos, no entanto é observado um aumento na quantidade de feixes de xilema e tecido interfascicular formados (Kim *et al.*, 2005). Foi visto também que a expressão de *ATHB-15* nas células cambiais e procambiais, ao contrário de *ATHB-8*, não é influenciada pela aplicação de auxina (Ohashi-Ito e Fukuda, 2003; Kim *et al.*, 2005).

Um outro membro da família *HD-ZIP III*, o gene *Interfascicular fiberless1/Revoluta (IFL1-1/REV)*, cuja expressão foi observada nas regiões vasculares,

também afeta o desenvolvimento dos feixes vasculares nos eixos de inflorescência de *Arabidopsis*, regulando espacialmente a diferenciação de fibras (McConnell *et al.*, 2001; Ratcliffe *et al.*, 2000; Zhong e Ye, 1999). A proteína REV, bem como as outras proteínas desta família, apresenta um domínio HD-ZIP de ligação a DNA e dimerização de proteínas (Sessa *et al.*, 1998) e um domínio START de ligação a esteróis ou lipídios (Poething e Aravind, 1999). Mutações recessivas no gene *IFL1/REV* confirmam a atividade da auxina no controle da proliferação celular durante o desenvolvimento secundário. (Prigge *et al.*, 2005; Otsuga *et al.*, 2001).

Assim, com base nos dados apresentados, e na grande similaridade entre os fenótipos apresentados pelo mutante *aqt* e pelas plantas *athb-15*, incluindo o aumento no desenvolvimento vascular, podemos sugerir que *AQT* possa estar atuando dentro da mesma via de sinalização de *ATHB-15*. A caracterização de plantas derivadas do cruzamento entre plantas *aqt* e *ATHB-15* poderá ajudar a elucidar se a nossa hipótese é verdadeira. Porém, nossas análises indicam que a expressão de *AQT* é transiente e restrita ao início da diferenciação vascular. Desta forma, é provável que *AQT* seja necessário para regular as etapas iniciais do desenvolvimento vascular, atuando na regulação da atividade de genes ou na regulação do transporte das proteínas codificadas por estes genes que estimulam a proliferação e diferenciação das células do procâmbio e/ou câmbio. O fato dos feixes vasculares individuais do mutante *aqt* apresentarem a correta organização colateral do xilema e floema também indica que *AQT* não está envolvido no processo de manutenção da polaridade adaxial-abaxial em eixos.

Considerando que na maioria das plantas o crescimento primário corresponde ao crescimento em comprimento, a observação da diminuição no tamanho do eixo de inflorescência e do aumento dos feixes vasculares do mutante *aqt* poderia ser uma indicação que nestes mutantes pode estar ocorrendo uma diferenciação acelerada dos feixes vasculares primários. Esta diferenciação acelerada poderia estar provocando uma transição antecipada para o crescimento secundário, o que levaria conseqüentemente ao menor tamanho dos eixos de inflorescência. Esse desequilíbrio no desenvolvimento

vascular também poderia estar envolvido com o atraso de surgimento de um eixo da inflorescência.

Também foi observado que plantas *aqt* apresentam siliquas menores que as de plantas tipo selvagem (figura 20). A observação da expressão de *At1g55430* em estames de plantas transformadas com a construção p430::GFP-GUS (figura 29), bem como a expressão de *At5g42280* nas células do tapete da antera (Alves-Ferreira, M. e Meyerowitz, E.; comunicação pessoal), que é responsável pela nutrição dos grãos de pólen, nos permite especular que proteínas desta família poderiam ser necessárias para a formação dos grãos de pólen viáveis. Assim, a ausência da expressão de *At1g55430* poderia estar prejudicando o desenvolvimento do pólen, o que poderia levar a uma macho-esterilidade parcial, e conseqüentemente a formação de siliquas menores. Porém, o padrão de expressão de GUS nas linhagens p430::GFP-GUS não corresponde ao encontrado em plantas selvagem no que se refere a expressão em raiz, o que nos leva a avaliar quão confiável poderia ser a atividade GUS em anteras. Experimentos de hibridação *in situ* em botões florais são necessários para confirmar essa hipótese.

Foi observada ainda a perda da dominância apical em eixos de inflorescência de plantas *aqt* (figura 20). Apesar de não ter sido analisada a expressão de *AQT* no meristema de inflorescência, a formação da estrutura abaulada no centro da roseta observada antes da emissão do eixo de inflorescência nas plantas *aqt* também é uma indicação de que podem estar ocorrendo problemas na formação do meristema da inflorescência. A incompetência do meristema da inflorescência de continuar o desenvolvimento e sua conseqüente inviabilidade indica que *AQT* é fundamental também na manutenção deste meristema. Assim, os fenótipos observados indicam que o problema ocorre tanto na iniciação do desenvolvimento do eixo floral quanto na sua manutenção.

Estudos indicam que a auxina derivada do ápice, e seu transporte basípeto, têm um efeito inibitório no crescimento dos brotos axilares, ao passo que a citocinina, derivada principalmente das raízes, promove o crescimento destes brotos. Este efeito inibitório da auxina pode ser confirmado pela observação de um aumento na ramificação

da parte aérea do mutante *axr1* de *Arabidopsis*, cuja resposta à auxina é reduzida (Stirnberg *et al.*, 1999; Lincoln *et al.*, 1990). Também foi visto que plantas transgênicas com redução nos níveis de auxina apresentam um aumento na ramificação (Romano *et al.*, 1991), enquanto plantas transgênicas com aumento nos níveis de auxina apresentam redução na ramificação dos brotos (Klee *et al.*, 1987). Além disto, foi visto que, se a inflorescência primária for removida ocorre um aumento da exportação das citocinina das raízes, e que este aumento pode ser bloqueado pela aplicação de auxina ao ápice decapitado (Bangerth, 1994).

Desta forma, a perda de dominância apical em eixos de inflorescência de mutantes *aqt* pode ser uma indicação de que a relação auxina:citocinina na parte aérea pode estar afetada. Este desequilíbrio hormonal pode ser uma consequência da redução na percepção e/ou transporte da auxina, e pode estar levando a perda da inibição do desenvolvimento dos meristemas axilares pelo broto ou inflorescência primária.

Em um outro experimento plântulas *aqt* e tipo selvagem foram crescidas em meio sólido suplementado com auxina. Foi visto que os sistemas aéreos de plantas *aqt* e tipo selvagem crescidas em meio suplementado com auxina responderam de uma forma diferenciada. O sistema aéreo de plantas tipo selvagem apresentou perda completa da dominância apical, enquanto que o sistema aéreo de plantas *aqt* não apresentou alterações visíveis (figura 28).

Desta forma, o fenótipo de perda de dominância apical do eixo de inflorescência do mutante *aqt* e a incapacidade de sua porção aérea responder a aplicação de auxina exógena, indica que a ausência da proteína AQT pode estar prejudicando a capacidade de percepção da auxina pela planta no meristema da inflorescência.

3. Caracterização do sistema radicular das plantas mutantes *aqt*

O sistema radicular de *A.thaliana* é composto de uma raiz principal e de raízes laterais. Estas raízes laterais são formadas ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento do vegetal e sua quantidade pode variar em função do estágio de desenvolvimento da planta, bem como das condições ambientais ao seu redor, o que demonstra sua plasticidade. Estudos mostraram que o desenvolvimento radicular e sua capacidade de adaptação ao ambiente pode ser consequência de mecanismos intrínsecos comuns, e que nestes mecanismos, hormônios vegetais como a auxina (Di Donato *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2003) e o ABA (De Smet *et al.*, 2003) apresentam importantes funções.

As plantas *aqt* apresentam um sistema radicular menos complexo que o de plantas tipo selvagem. Uma análise da morfologia de raízes intactas de plantas *aqt* e tipo selvagem através de microscopia de contraste interferencial mostrou um aumento no diâmetro da raiz principal (figura 24). A região meristemática destas raízes apresenta-se alargada, o que pode indicar uma maior atividade de divisão celular neste local (figura 24). Além disso, foi observada uma redução na zona de alongamento destas raízes, indicando uma rápida passagem destas células para a fase de diferenciação celular (figura 24).

Estes dados são compatíveis com a observação de um grande aumento na quantidade de células na raiz e com o fenótipo destas células, que são menores e mais largas que as células de raízes tipo selvagem (figura 25). De fato, foi observado que as células da epiderme das raízes de *Arabidopsis* sofrem eventos de expansão direcional durante o desenvolvimento radicular (Grebe, 2004). Logo após a divisão celular, as células das raízes começam a se expandir radialmente. A seguir, na zona de alongamento, as células passam a se expandir longitudinalmente (Grebe, 2004). Assim, é possível que a redução no comprimento celular seja consequência do início prematuro dos processos de diferenciação celular.

As plantas *aqt* apresentam um aumento no comprimento da raiz principal (tabela 3), que provavelmente é consequência do aumento na taxa de divisão celular, e

consequentemente do maior número de células presentes nas raízes de plantas *aqt*, uma vez que foi observado um encurtamento destas células. Foi observado também que a zona de diferenciação (ou pilífera) apresenta um aparente aumento na quantidade, bem como no comprimento, dos pêlos radiculares (figura 24). Apesar de clara, esta característica não foi quantificada. Além disso, não foi possível distinguir se este aparente aumento na quantidade de pêlos é consequência de um aumento na quantidade de células formadoras de pêlos e/ou do aumento no número de camadas celulares. É possível que este aumento no comprimento das raízes principais e na quantidade dos pêlos observado no mutante *aqt* seja uma consequência da necessidade de compensar a diminuição da superfície de absorção, devido a menor complexidade de seu sistema radicular (Peterson e Farquhar, 1996).

Além disto, foi visto que as regiões mais antigas da raiz principal apresentam poucas raízes laterais completamente desenvolvidas e que entre elas existem sítios de iniciação de raízes laterais, que se desenvolvem até protrair da epiderme, mas que não completam seu desenvolvimento (informação não mostrada).

A análise histológica do sistema radicular mostrou que raízes de plantas *aqt* com duas semanas após germinação apresentam organização e morfologia aparentemente normal dos diferentes tipos celulares que as compõem (figura 26). No entanto, a análise histológica de raízes em estágios mais avançados de diferenciação mostrou que, apesar de manterem uma organização normal dos diferentes tipos celulares, elas apresentam um aumento no número de camadas celulares nas regiões da periderme, e do floema e xilema secundários (figura 27). Desta forma, este aumento nas camadas celulares, associado ao aumento na expansão radial das células da raiz, provavelmente são a causa do aumento no diâmetro observado na raiz principal.

Os mutantes *hypocotyl 5 (hy5)*, *aberrant lateral root formation 3 e 4 (alf3 e alf4)* são exemplos de mutantes conhecidos que apresentam alterações no sistema radicular. O mutante *hypocotyl 5 (hy5)* de *Arabidopsis* apresenta um fenótipo oposto ao do mutante *aqt*. Uma análise fenotípica completa deste mutante mostrou que, além de outras alterações, ele apresenta uma redução no crescimento vascular secundário no

hipocótilo e nas raízes, e um aumento na produção de raízes laterais, em comparação com o observado em plantas tipo selvagem (Cluis *et al.*, 2004; Oyama *et al.*, 1997).

HY5 é um fator transcricional que atua como um regulador positivo da fotomorfogênese em plântulas (Ang e Deng, 1994), afetando a transcrição de genes induzidos pela luz (Ang *et al.*, 1998; Chattopadhyay *et al.*, 1998). Sua atividade é controlada por uma ubiquitina ligase, *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)*, que atua como um regulador negativo levando a degradação de *HY5* em ausência de luz (Saijo *et al.*, 2003). São conhecidos vários outros fatores transcricionais que interagem com *COP1*, que podem ser regulados da mesma forma e atuar de forma parcialmente redundante ou sinérgica com *HY5* (Holm *et al.*, 2002).

Cluis *et al.* (2004) demonstraram que o fenótipo *hy5* é o resultado de uma alteração no balanço da sinalização entre auxina e citocinina e sugerem, com base em análises de expressão, que a sinalização via auxina seria aumentada nestes mutantes devido a uma diminuição na expressão de dois reguladores negativos da sinalização por auxina, os genes *AUXIN RESISTANT 2 (AXR2)/IAA7* e *SOLITARY ROOT (SLR)/IAA14*. Assim, *HY5* além de estar envolvido na promoção de transcrição de genes induzidos pela luz pode estar envolvido nas vias de sinalização mediadas por auxina (Cluis *et al.*, 2004). Uma avaliação da expressão dos genes *AXR2* e *SLR* no mutante *agt* poderia ajudar a esclarecer a função do gene *At1g55430* na sinalização por auxina.

Os mutantes *aberrant lateral root formation 3 e 4 (alf3 e alf4)*, por sua vez, apresentam um fenótipo radicular semelhante ao do mutante *agt*. O mutante *alf3* apresenta a raiz primária coberta por primórdios de raízes laterais que crescem somente até emergir pela camada de células da epiderme (Celenza *et al.*, 1995), fenótipo similar ao observado no mutante *agt*. A aplicação de auxina exógena atenua esta parada no crescimento, indicando que o gene *ALF3* atua, juntamente com a auxina, na manutenção do crescimento da raiz lateral (Celenza *et al.*, 1995).

Já o mutante *alf4* apresenta uma raiz primária normal, mas é completamente desprovido de raízes laterais (Celenza *et al.*, 1995). Além disto, estes mutantes apresentam alterações no desenvolvimento da parte aérea, tais como redução do

hipocótilo e expansão da folha, e macho esterilidade (Celenza *et al.*, 1995). Foi visto que a aplicação de auxina exógena nestas plantas não reverte o fenótipo de *alf4*. Além disso, a análise da expressão do gene *ALF4* fusionado a GUS mostrou a localização nuclear da proteína ALF4 e que a aplicação de auxina não afeta o padrão de expressão da proteína de fusão. Considerando as características genéticas e fenotípicas foi sugerido que *ALF4* atua de uma forma independente da sinalização via auxina e que atua na manutenção do estado mitoticamente competente das células do periciclo, o que é necessário para formação das raízes laterais (Di Donato *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que a auxina atua em várias etapas do desenvolvimento radicular, na iniciação e surgimento do primórdio de raiz lateral, alongamento da raiz, diferenciação do sistema vascular e gravitropismo. Apesar dos tecidos aéreos, tais como as folhas em desenvolvimento, serem considerados com a principal fonte de auxina, o sistema radicular não é totalmente dependente da auxina derivada do ápice (Bhalerao *et al.*, 2002). Foi observado que a região meristemática das raízes primárias de *A. thaliana*, bem como os meristemas das raízes laterais em desenvolvimento, são capazes de sintetizar auxina (Ljung *et al.*, 2005). Também foi observada uma menor, mas significativa capacidade de síntese de auxina nos tecidos da zona de alongamento e da zona de diferenciação da raiz, onde é iniciada a formação das raízes laterais (Ljung *et al.*, 2005).

A auxina produzida na parte aérea da planta é transportada para as raízes, de uma forma polar, através do sistema vascular da raiz (transporte acrópeto) (Friml *et al.*, 2003). Foi observada a formação de um gradiente de auxina na raiz principal de *Arabidopsis*, com altos níveis de IAA na região meristemática (Bhalerao *et al.*, 2002). A auxina acumulada no ápice da raiz pode ser então transportada, de uma forma basípeta, para as zonas de alongamento e diferenciação da raiz através das camadas de células do córtex e da epiderme (Teale *et al.*, 2005; Bhalerao *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1998). Participam do processo de transporte de auxina proteínas das famílias PIN e AUX, que atuam como mediadoras do efluxo e influxo de auxina, respectivamente.

É interessante notar que os sítios de expressão de *At1g55430* muitas vezes coincidem com o local de síntese ou transporte de auxina nas raízes (figura 34). A análise do padrão de expressão do gene *At1g55430* mostrou que ocorre uma forte expressão restrita às células da epiderme localizadas nas zonas de divisão e alongamento celular, e nos pêlos radiculares. As raízes laterais também apresentam expressão em seus meristemas. Também foi detectada a expressão de *At1g55430* no sistema vascular de raízes em desenvolvimento, desaparecendo no início da zona de diferenciação.

Os efeitos da auxina na diferenciação de células radiculares dependem da concentração da auxina e da capacidade dos tecidos responderem a ela, ou seja, da quantidade de auxina necessária para disparar as vias de sinalização e da subsequente ativação de genes de resposta à auxina (como os da família *AUX/IAA*). Assim, este padrão de expressão do gene *At1g55430*, associado aos fenótipos apresentados pelas raízes do mutante *aqt*, dão uma indicação de que a proteína AQT possa atuar em alguma via de sinalização ativada pela auxina durante o processo de desenvolvimento vegetal e que a expressão de *At1g55430* é regulada de maneira precisa de acordo com as variações na quantidade de auxina. Por exemplo, é possível que a ausência da função desempenhada por *At1g55430* na epiderme e/ou nos pêlos radiculares do mutante *aqt* esteja prejudicando a regulação do alongamento destas células pela auxina. A via de sinalização disparada pela auxina atua na modulação da abundância relativa de diferentes proteínas da família *AUX/IAA*, que pode determinar quais respostas serão induzidas, determinando assim a diferenciação celular da raiz (Knox *et al.*, 2003). *AUX/IAA* codificam fatores de transcrição de curta duração, que agem como repressores ou ativadores da expressão de genes tardios induzidos pela auxina. Assim, defeitos na percepção dos sinais gerados pela auxina levariam a uma alteração no controle da expressão gênica local, o que poderia acarretar uma redução da zona de alongamento e o início prematuro da diferenciação celular. Isto resultaria em células epidérmicas menos alongadas no mutante, em comparação com as células tipo selvagem.

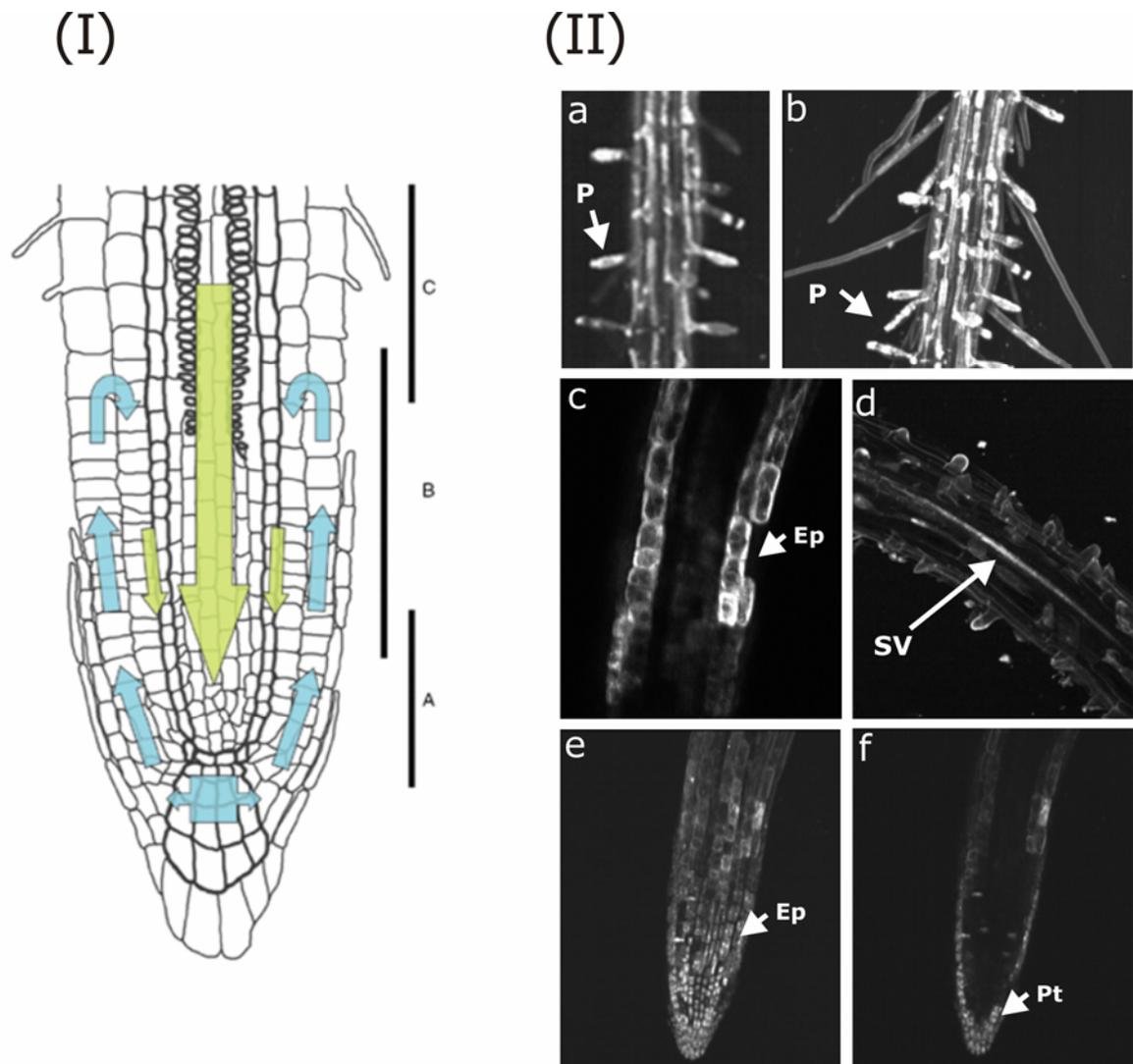


Figura 34: Comparação entre a rota de transporte de auxina em raízes de *A. thaliana* e o perfil de expressão do gene *At1g55430*. (I) Esquema da região apical de raízes de *Arabidopsis* mostrando as zonas de divisão celular (A), alongamento (B) e diferenciação (C). Setas verdes e azuis representam os fluxos apical e basípeto de auxina, respectivamente. Esquema retirado de Teale *et al.*, 2005. (II) Perfil de expressão de *At1g55430*. Imagens de microscopia confocal da plântulas *aqt* mostrando GFP acumulada nos pêlos radiculares (a-b), nas células epidérmicas da zona de alongamento (c) e região meristemática (e-f) e no sistema vascular em desenvolvimento (d). Ep, epiderme. P, pêlos radiculares. Pt, protoderme. SV, sistema vascular.

A epiderme da raiz de *Arabidopsis* é composta por feixes longitudinais de células, originados de divisões transversais que começam nas células iniciais do meristema radicular e continuam até o final da zona de divisão (Schneider *et al.*, 1997), e que apresentam padrões de desenvolvimento distintos (Dolan *et al.*, 1994; Galway *et al.*, 1994). Após a zona de alongamento celular estas células se diferenciam em tricoblastos (células formadoras de pêlos) ou atricoblastos (células que não formam pêlos) (Grierson *et al.*, 1997). Os tricoblastos normalmente se localizam sobre as paredes radiais entre duas células do parênquima cortical e os atricoblastos diretamente sobre as células corticais, o que resulta na disposição de fileiras de células epidérmicas alternadas ao redor da raiz (figura 4).

Foi visto que mutações de ganho de função nos genes *AXR3/IAA17* e *SHY2/IAA3*, membros da família *AUX/IAA*, afetam o desenvolvimento dos pêlos radiculares de diferentes formas, levando a ausência total de pêlos e ao desenvolvimento de pêlos mais longos que os de plantas tipo selvagem, respectivamente. Apesar de conferir efeitos opostos, estas duas mutações ocorrem em genes *AUX/IAA* altamente homólogos (Blilou *et al.*, 2002; Ouellet *et al.*, 2001; Colon-Carmona *et al.*, 2000). Acredita-se que as quantidades relativas de *AXR3* e *SHY2* controlam o tempo de iniciação de pêlo enquanto as células atravessam a zona de alongamento. No início os níveis destas proteínas seriam similares, mas após o alongamento celular, ocorreria uma redução na expressão de *AXR3* e um aumento na expressão de *SHY2*, resultando em uma alta relação *SHY2:AXR3*, e ativando assim a iniciação do pêlo radicular (figura 35).

Estudos indicam que o alongamento do pêlo radicular observado nos mutantes de ganho de função *SHY2*, não é devido a um aumento na taxa de alongamento dos pêlos após a iniciação, mas sim a antecipação da iniciação do pêlo radicular para um momento onde os tricoblastos ainda estão se expandindo ativamente. Assim, os pêlos se alongam de forma semelhante aos pêlos de raízes tipo selvagem, mas por um período de tempo mais longo, resultando em pêlos mais longos (Knox *et al.*, 2003).

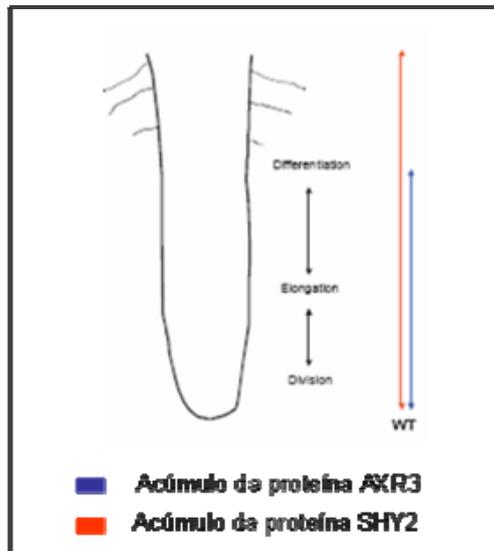


Figura 35: Esquema da localização das proteínas AXR3 e SHY2 na raiz de *A. thaliana*. Esquema retirado de Knox *et al.*, 2003, como modificações.

O crescimento em tamanho do pêlo radicular consiste de uma forma rápida de alongamento direcional, o qual envolve o direcionamento preciso de vesículas levando precursores de parede celular para a extremidade do pêlo (Grierson *et al.*, 1997; Benfey e Schiefelbein, 1994). Embora os mecanismos moleculares que regulam este processo de alongamento celular ainda não estejam totalmente esclarecidos, evidências indicam que as sinalizações por auxina e etileno estimulam o alongamento do pêlo radicular (Pitts *et al.*, 1998; Masucci e Schiefelbein, 1996). Foi visto que mutantes deficientes nas respostas a auxina (*axr1* e *aux1*) e ao etileno (*etr1* e *ein2*) apresentam pêlos radiculares curtos. A aplicação de auxina exógena restaura o comprimento normal dos pêlos radiculares em plantas mutantes *aux1* e *axr1* (Pitts *et al.*, 1998; Masucci e Schiefelbein, 1996). Além disto, o tratamento de plântulas tipo selvagem, *axr1* e *etr1* com auxina sintética (2,4-D), ou com o precursor do etileno ACC, levou ao desenvolvimento de pêlos radiculares mais longos que em plântulas não tratadas (Pitts *et al.*, 1998). Estes estudos indicam que a auxina e o etileno atuam como reguladores positivos do alongamento do pêlo radicular em *Arabidopsis* (Pitts *et al.*, 1998; Masucci e Schiefelbein, 1996).

Apesar do aparente aumento na quantidade de pêlos radiculares no mutante *aqt*, não foi possível determinar se está ocorrendo um aumento no número de camadas de células formadoras de pêlos ou um aumento no número de células que desenvolvem os pêlos radiculares.

No entanto, foi observado que os pêlos radiculares de plantas *aqt* não apresentam problemas relacionados à sua localização nas células epidérmicas, i.e., a protuberância que vai dar origem ao pêlo radicular se desenvolve no pólo basal da célula epidérmica, como observado em células tipo selvagem. Porém, estes pêlos são mais longos que os pêlos presentes em raízes de plantas tipo selvagem. Este aumento no comprimento dos pêlos poderia ser uma consequência da antecipação da diferenciação celular ocasionada pela redução da zona de alongamento. Assim, de forma semelhante ao que foi observado para o mutante *SHY2*, o início da diferenciação do pêlo radicular estaria ocorrendo em uma fase em que os tricoblastos ainda estariam se expandindo. Desta forma, o aumento no período de alongamento do pêlo radicular resultaria no maior comprimento destes pêlos no mutante *aqt*.

A observação da expressão de *At1g55430* no pêlo radicular em desenvolvimento, associada a este aumento em seu comprimento, pode ser uma indicação de que a proteína AQT é necessária para a manutenção da capacidade de alongamento do pêlo e/ou pode estar envolvida na regulação do alongamento dos pêlos, talvez regulando o direcionamento das vesículas que levam os precursores de parede celular para a extremidade do pêlo.

Além disso, a menor complexidade do sistema radicular, ou seja, a menor quantidade de raízes laterais desenvolvidas presentes no mutante *aqt* também poderia ser devida à ausência de expressão da proteína AQT na região meristemática da raiz lateral, prejudicando a via de sinalização mediada pela auxina e a manutenção da atividade destas células.

Vários estudos mostraram a importância da auxina e de seu transporte polar na iniciação e desenvolvimento das raízes laterais é conhecida (Bhalerao *et al.*, 2002; Malamy e Benfey, 1997; Boerjan *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995). As raízes laterais

são formadas a partir de um grupo de células do periciclo (células fundadoras) da raiz principal que, estimuladas pela auxina, iniciam uma série de divisões periclinais assimétricas (Bhalerao *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2001). Algumas destas células sofrem divisões periclinais adicionais que levam a formação de um primórdio de raiz lateral, que cresce até emergir das camadas externas da raiz principal (Boerjan *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995; Klee *et al.*, 1987). A seguir o primórdio de raiz lateral é ativado e forma um meristema de raiz lateral funcional (Malamy e Benfey, 1997). Nesse estágio o primórdio de raiz lateral, que apresenta entre 3-5 camadas celulares, se torna independente da auxina vinda do ápice (Casimiro *et al.*, 2003). Com a ativação do meristema, a raiz lateral passa a produzir auxina, que vai atuar também na manutenção da atividade do próprio meristema (Celenza *et al.*, 1995).

Desta forma, o hormônio auxina apresenta um papel central, não apenas no início da formação da raiz lateral, mas também na manutenção da atividade do meristema da raiz lateral. Considerando que a proteína AQT possa atuar na percepção de sinais gerados pela auxina e que, na ausência de sua expressão, os primórdios de raízes laterais continuam sendo formados, porém muitos não completam seu desenvolvimento, podemos sugerir que ela provavelmente atua no estabelecimento ou manutenção da atividade do meristema da raiz lateral. Neste caso a atividade de genes responsivos a auxina como, por exemplo, o *alf3*, que é importante para a manutenção do crescimento da raiz lateral, também poderia estar sendo inibida.

Outros resultados suportam a hipótese de que *AQT* poderia atuar na percepção de sinais gerados pela auxina. Quando plantas de *A. thaliana* foram transformadas com a construção 35S::At1g55430, que leva a super expressão do gene *At1g55430*, foi observada a formação de um sistema radicular caracterizado pela presença de grande quantidade de raízes laterais. No entanto estas raízes são curtas, não ultrapassando o comprimento de 2 cm, o que dá a aparência de que é formado um "tufo de raízes" nestas plantas (figura 33). Um fenótipo semelhante de raízes foi observado quando plântulas *aqt* e tipo selvagem foram crescidas em meio sólido suplementado com auxina. Neste experimento o sistema radicular de plantas tipo selvagem e *aqt* apresentaram a

formação de raízes laterais em grandes quantidades, no entanto as raízes de plantas *aqt* também apresentaram uma grande redução em comprimento (figura 28).

Estes fenótipos são compatíveis com a atividade proposta para AQT na regulação do desenvolvimento das raízes laterais. Considerando que AQT possa atuar na percepção de sinais gerados pela auxina, tanto a adição de auxina ao meio de crescimento do mutante *aqt*, quanto a super-expressão do gene em plantas transgênicas, estariam levando a um aumento na percepção do sinal da auxina. Isto levaria a um aumento na atividade dos genes de resposta a auxina, propiciando um aumento na ativação, no estímulo e na manutenção dos meristemas das raízes laterais, o que levaria a formação de raízes laterais em grande quantidade.

Esta hipótese pode ser suportada ainda por trabalhos que mostram que o bloqueio do transporte de auxina na junção entre a parte aérea e as raízes inibe a formação de raízes laterais (Reed *et al.*, 1998) e que a super expressão de auxina ou a aplicação de auxina exógena leva a um aumento na quantidade de eventos de iniciação de raízes laterais (Himanen *et al.*, 2004; Celenza *et al.*, 1995; Boerjan *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995).

Por outro lado, o aumento na vascularização observado nas raízes de plantas *aqt* adultas poderia ser o responsável pelo sistema radicular menos complexo observado nestas plantas. Em raízes sob crescimento secundário, parte do câmbio vascular é formado das células do periciclo (Dolan *et al.*, 1993). Como as raízes laterais também são formadas a partir da desdiferenciação e proliferação de células do periciclo, a diminuição na formação de raízes laterais poderia ser devida a um recrutamento precoce destas células do periciclo para o processo de crescimento vascular secundário, o que levaria a formação de um menor número de raízes laterais. No entanto esta é uma hipótese pouco provável, uma vez que se observa o estabelecimento dos primórdios de raízes laterais. O mais provável é que esteja ocorrendo dificuldades na ativação do MAR lateral ou ainda problemas no nível local de auxina pelo fato destes primórdios não se tornarem independentes da auxina vinda do ápice. Porém, como não foi feita uma quantificação do número de primórdios de raízes laterais que não completaram seu

desenvolvimento, não é possível saber se também está havendo uma redução na quantidade de primórdios formados. Desta forma, esta hipótese não pode ser descartada.

A auxina é essencial para o desenvolvimento das raízes laterais, no entanto ela não atua isoladamente. Estudos mostraram que o ácido abscísico (ABA) também atua na regulação do desenvolvimento do sistema radicular (De Smet *et al.*, 2003). Foi visto que a aplicação exógena de ABA inibe o desenvolvimento das raízes laterais em um estágio imediatamente após a emergência do primórdio de raiz lateral e bloqueia a ativação do meristema de raiz lateral (De Smet *et al.*, 2003). Além disto, o fato de a aplicação de auxina exógena não reverter o quadro de inibição, associado as observações de que a mutação no gene *ALF3*, que codifica um importante componente da via regulatória dependente de auxina, não afeta a sensibilidade das raízes laterais ao ABA, e que o ABA e a mutação *alf3* não atuam no mesmo ponto do desenvolvimento, dão indicações de que a inibição de raízes laterais induzida por ABA ocorre por uma via independente de auxina.

Os tecidos vasculares de raízes de *Arabidopsis* começam a se desenvolver logo após a germinação (Dolan *et al.*, 1993). A diferenciação dos dois pólos do protofloema ocorre na zona de alongamento, enquanto que a diferenciação do protoxilema ocorre mais a frente, na zona de diferenciação. Durante o desenvolvimento das raízes, as células do procâmbio vão dar origem às células do câmbio vascular, que após sofrer extensiva divisão, são diferenciadas nos tecidos do xilema e floema secundários (Dolan e Roberts, 1995).

A expressão de *At1g55430* também foi detectada no sistema vascular de raízes em desenvolvimento, desaparecendo no início da zona de diferenciação. Esta localização coincide com a região onde os feixes de floema começam a se diferenciar. Este padrão de expressão associado ao aumento na quantidade de camadas celulares, principalmente nas regiões da periderme e do floema secundário, observado nos mutantes *aqt* dão uma indicação da provável atuação da proteína AQT nos eventos de diferenciação celular. Assim, é provável que *AQT* também atue durante as fases iniciais do desenvolvimento vascular intermediando a regulação da diferenciação das células de floema,

provavelmente como um regulador negativo de genes envolvidos com a diferenciação vascular. Desta forma, na ausência de sua expressão estes genes teriam sua atividade aumentada, o que resultaria no aumento da diferenciação vascular.

Apesar da importância do fluxo polar de auxina no controle da formação dos feixes vasculares e na diferenciação celular já ter sido bem documentada em eixos de inflorescência e folhas de *Arabidopsis* (Aloni *et al.*, 2003; Aloni, 2001; Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999; Sachs, 1991), existem poucos trabalhos sobre sua função na diferenciação vascular em raízes. É conhecida a função do fluxo polar de auxina na formação de um padrão vascular contínuo (Mattsson *et al.*, 1999; Sieburth, 1999). Segundo a hipótese da canalização do fluxo de auxina, a presença de fontes de auxina em um campo inicialmente homogêneo expõe algumas células a um maior nível de auxina, induzindo a diferenciação das células vasculares e a formação de um sistema de transporte. As células diferenciadas vão atuar na drenagem da auxina das células próximas e levar a canalização do fluxo de auxina ao longo de uma fileira de células (Sachs 1981, 2000). Esta hipótese é suportada por estudos que mostram que a superprodução de auxina leva ao aumento do tecido vascular em plantas transgênicas enquanto sua inativação leva a diminuição da diferenciação do tecido vascular (Romano *et al.*, 1991; Klee *et al.*, 1987).

Estudos mostram ainda a atuação da citocinina em conjunto com a auxina na formação e manutenção das células do procâmbio (Fukuda, 1997). Foi demonstrado que vários genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese da citocinina são expressos nas extremidades e nos feixes vasculares de raízes de *Arabidopsis*, indicando que estes feixes vasculares são um sitio ativo para biossíntese de citocinina e que pode funcionar como fonte de citocinina (Miyawaki *et al.*, 2004). A demonstração da biossíntese de citocinina em tipos distintos de células vasculares indica que as citocininas possivelmente atuam como moléculas sinalizadoras para indução de diferenciação vascular.

4. A importância do transporte polar de auxina durante a embriogênese

O desenvolvimento apropriado das plantas após a germinação é dependente do transporte polar da auxina durante a embriogênese, que leva a formação de pro-meristemas de caule e de raiz funcionais e ao estabelecimento da polaridade apical-basal no vegetal (Weijers e Jürgens, 2005; Friml *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 1991, 1993).

Foi mostrado que o transporte polar de auxina é importante para a especificação do destino celular durante as fases iniciais da embriogênese (Friml *et al.*, 2003). Usando o gene repórter GFP fusionado ao promotor DR5 responsivo a auxina (DR5::GFP) foi possível observar que após a divisão do zigoto, as células apicais, mas não as basais, apresentam acúmulo de auxina (figura 36). Esta diferença é mantida até o estágio globular, no qual a célula suspensora superior, a hipófise, começa a expressar DR5::GFP e concomitantemente, sua atividade cessa no proembrião (figura 36). No estágio cordiforme do embrião o acúmulo da auxina pode ser visto nos pólos de iniciação dos cotilédones (figura 36) (Friml *et al.*, 2003).

Este padrão de distribuição assimétrica da auxina é dependente da atividade das proteínas carreadoras de efluxo de auxina pertencentes a família PIN. A interrupção neste fluxo de auxina em mutantes *pin*, ou por tratamento com inibidores do transporte de auxina, compromete a especificação do destino das células apicais, e da hipófise como precursora do meristema de raiz (Friml *et al.*, 2003).

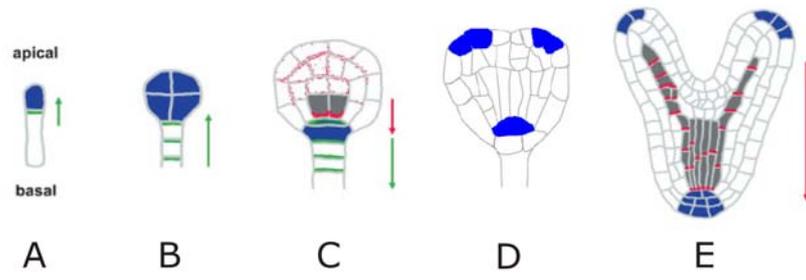
Segundo Friml *et al.* (2003), após a divisão do zigoto, a proteína PIN7 é encontrada especificamente na membrana apical do suspensor, direcionando o fluxo de auxina para célula apical (figura 36). Ao alcançar a fase globular, onde o embrião passa a produzir auxina, ocorre uma mudança na localização de PIN7, que passa a ser encontrado na membrana basal das células do suspensor, direcionando a auxina proveniente da planta mãe para fora. Além disso, a proteína PIN1 passa a ser localizada nas membranas basais das células provasculares localizadas na parte apical do embrião, provocando um acúmulo de auxina na célula superior do suspensor que assume a identidade de hipófise (Friml *et al.*, 2003). Esta é uma etapa fundamental, uma vez que a

hipófise vai originar o meristema de raiz, e também porque a localização das proteínas PIN1 nas membranas basais de células provasculares marca o início da formação da polaridade do tecido vascular. Além disso, foi visto que mutações no gene *GNOM (GN)*, que é essencial para localização do carreador de efluxo de auxina PIN1, prejudicam o estabelecimento da hipófise e da polaridade apical-basal (Mayer *et al.*, 1991, 1993).

A expressão de *At1g55430* foi identificada durante o desenvolvimento embrionário de *Arabidopsis* (figura 36). Embriões no estágio globular do desenvolvimento apresentaram expressão nas células de sua porção apical. Na transição para o estágio cordiforme, os embriões globulares sofrem uma série de divisões celulares rápidas em duas regiões em cada lado do futuro ápice da parte aérea. A expressão de *At1g55430* foi observada nestas duas regiões, que mais tarde darão origem aos cotilédones e será responsável pela simetria bilateral do embrião. A seguir, com o alongamento celular ao longo do eixo do embrião e o desenvolvimento dos cotilédones, a expressão de *At1g55430* ficou restrita as regiões referentes aos meristemas apical e radicular que já podem ser identificadas neste estágio (estágio de torpedo).

Assim, a expressão de *At1g55430* durante a embriogênese nos sítios de acúmulo de auxina, é mais uma indicação de que *At1g55430* pode estar envolvido na percepção de sinais gerados pela auxina e, desta forma, interferir com os processos do desenvolvimento da parte aérea e radicular.

(I)



(II)

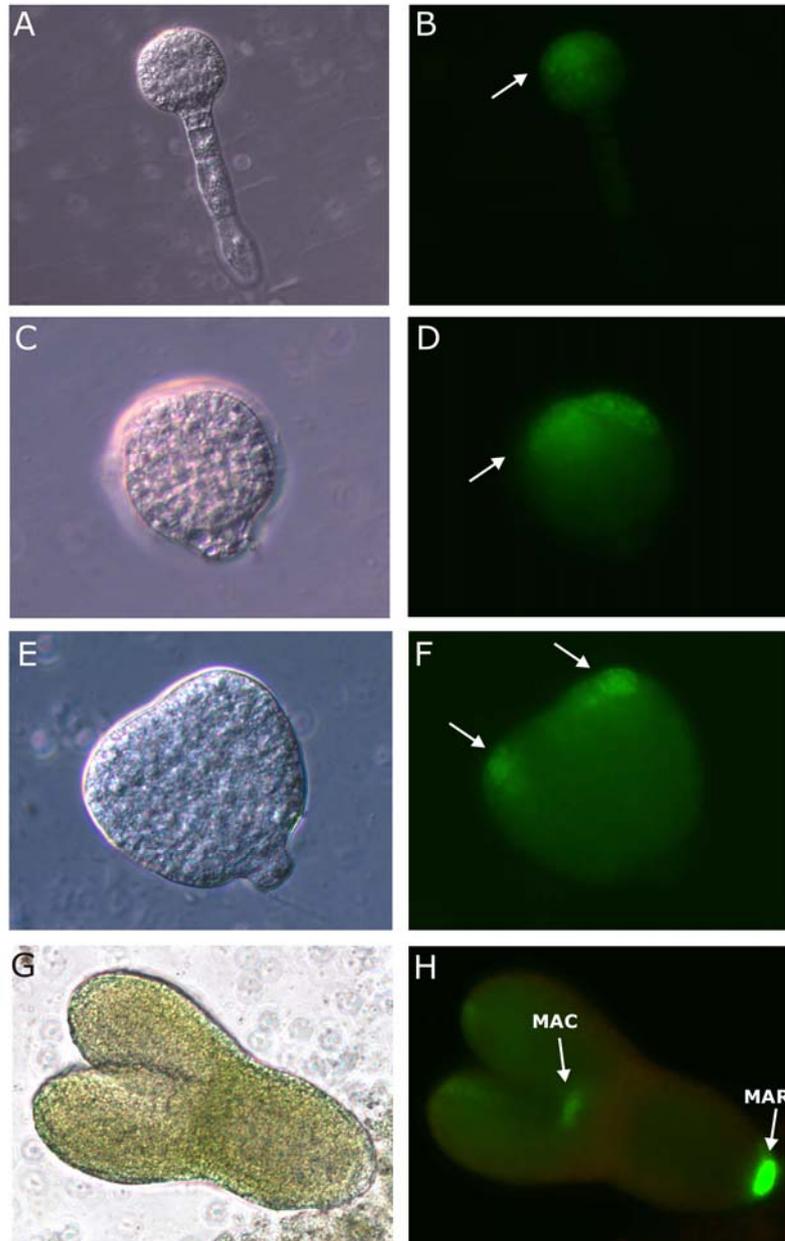


Figura 36: Comparação entre os locais de acúmulo de auxina e o padrão de expressão de *At1g55430* em embriões. (I) Representação esquemática da distribuição de auxina durante os diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. Acúmulo de auxina na célula apical após a divisão assimétrica do zigoto (A), nas células derivadas apicais de embrião no estágio de oito células (B), nas células derivadas basais do embrião globular (C), e nos pólos dos cotilédones e radicular de embriões nos estágios cordiforme (D) e torpedo (E). Em azul está representado o local de acúmulo de auxina. Em verde e vermelho estão representadas as localizações dos carreadores de efluxo de auxina PIN7 e PIN1, respectivamente. Em cinza estão representados os tecidos provasculares. Setas verdes e vermelhas representam a direção do transporte de auxina conferida por PIN7 e PIN1, respectivamente. Esquema retirado de Grebe (2004), com modificações. (II) Análise por microscopia de contraste interferencial e epifluorescente de embriões do mutante *agt*. Imagens de epifluorescência mostrando expressão de GFP na região apical de embriões globulares (B), nos pólos que darão origem aos cotilédones, nas extremidades de embriões no início do estágio cordiforme (D), e nos MAC e MAR do embrião no estágio torpedo (F). Para facilitar a visualização imagens de microscopia de contraste interferencial dos mesmos embriões são mostradas em A, C e E, respectivamente.

5. Avaliação do efeito da super expressão e do bloqueio da expressão do gene *At1g55430* em *A. thaliana*

Visando compreender melhor a função do gene *At1g55430* no desenvolvimento de *Arabidopsis* foram obtidas plantas transgênicas com aumento e redução na expressão do gene *At1g55430*. As análises destas plantas indicam que o aumento na expressão é mais danoso para planta, uma vez que estas plantas não se desenvolvem normalmente, em geral não sobrevivendo mais que duas semanas.

Dada a grande dificuldade para obtenção de plantas transformadas com a construção 35S::*At1g55430*, apenas doze linhagens foram obtidas na primeira etapa de seleção e destas, apenas três linhagens eram homozigotas (linhagens L04, L06 e L13). Uma análise fenotípica preliminar das plantas destas linhagens na geração T2 mostrou uma grande diminuição no comprimento das raízes (tamanho final entre 1 e 2 cm), que geralmente formavam tufos, e pequenas alterações na forma da folha e no padrão dos feixes vasculares. A análise de plantas da geração T3 (homozigotas) das linhagens L04 e L06 mostrou que elas apresentam um fenótipo mais severo, com a presença de raízes formando um tufo de cerca de 1-2 cm de comprimento (figura 31) e com apenas 1-2% destas plantas sobrevivendo mais que duas semanas. Foi visto também que as plantas homozigotas da linhagem L13 apresentam um fenótipo compatível com um evento de co-supressão. Experimentos de RT-PCR e *Northern blot* foram usados para comprovar o aumento da expressão do gene endógeno em plântulas das linhagens L04 e L06, e a redução na expressão gênica na linhagem L13.

Como discutido anteriormente, o fenótipo radicular observado nas plantas com aumento da expressão do gene *At1g55430* é semelhante ao observado quando plantas mutantes *agt* foram crescidas em presença de auxina, o que é compatível com uma possível atuação do gene na percepção de sinais gerados pela auxina. Além disso, as alterações na amplitude da resposta aos níveis hormonais endógenos decorrentes do aumento de sua atividade poderia ser um dos fatores responsáveis pela alta letalidade

observada nas plantas transgênicas, uma vez que poderia estar ocasionando problemas na diferenciação e proliferação celular.

Foram obtidas 30 linhagens de plantas transformadas com a construção RNAi::At1g55430 e destas sete eram homozigotas para o inserto. Uma análise fenotípica preliminar em plantas das gerações T2 e T3 destas linhagens mostrou que estas plantas apresentam raízes de comprimentos variados e pequenas alterações a nível vascular em folhas. A redução na expressão do gene endógeno nestas linhagens foi comprovada por experimentos de RT-PCR. No entanto, essa redução na expressão parece não ter sido suficiente para reproduzir os fenótipos observados no mutante *aqt*. A nossa preocupação no momento do desenho da construção do vetor para RNAi foi evitar a presença de regiões que pudessem silenciar os genes parálogos de *At1g55430*. Para isso foi escolhido um fragmento de 176 pb de *At1g55430* que não apresentava nenhuma região com mais de 21 nucleotídeos de identidade com seus parálogos (figura 30). Porém, é conhecido que regiões menores de 400 nucleotídeos são ineficientes na indução do silenciamento (Thomas *et al.*, 2001). Portanto, possivelmente as linhagens obtidas não apresentavam o silenciamento completo do gene *At1g55430*. Essa hipótese é corroborada pela obtenção da linhagem L13 transformada com a construção para super expressão, mas que pela análise de expressão apresenta um evento de co-supressão. Essa linhagem apresenta um fenótipo muito mais próximo ao fenótipo do mutante *aqt* que qualquer linhagem obtida com a construção RNAi::At1g55430, indicando que o gene *At1g55430* foi mais eficientemente silenciado nesta linhagem. Porém, não podemos descartar a possibilidade de que a co-supressão possa estar ocorrendo também em outros genes da família de *At1g55430* e levando a esse fenótipo mais drástico.

6. Interação entre auxina e lipídios

O crescimento e o desenvolvimento vegetal são mediados pela interação de uma complicada rede de cascatas de sinalização, com cada evento de sinalização envolvendo mais de uma classe de fito-hormônios.

Vários fatores podem atuar em conjunto com a auxina para regular o desenvolvimento das células vasculares. Entre eles estão a citocinina, que atua na formação e/ou manutenção de células procambiais; os genes da família *HD-ZIP III* e os microRNAs, que atuam na regulação da diferenciação de células procambiais em células de xilema e os brassinosteróides que promovem o alongamento de eixo e inibem alongamento radicular em várias espécies vegetais.

Os brassinosteróides (BRs), uma classe especial de esteróides polioxigenados, e a auxina regulam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo divisão e expansão celular, diferenciação vascular, crescimento radicular, e senescência (revisado por Altmann, 1999; Bishop e Yokota, 2001). O fato de que várias respostas induzidas por auxina são aumentadas sinergisticamente por tratamentos com BR sugere uma possível interação entre esses dois hormônios (Nemhauser *et al.*, 2004). Plantas deficientes ou insensíveis aos brassinosteróides em geral apresentam baixa estatura (devido a defeitos na expansão celular), morfologia foliar alterada, redução na fertilidade, atraso na senescência, e desenvolvimento vascular alterado, com aumento na quantidade de floema e diminuição na quantidade de xilema (Nagata *et al.*, 2001; Choe *et al.*, 1999; Szekeres *et al.*, 1996).

Bao *et al.* (2004) mostraram que brassinosteróides (BRs) são necessários para o desenvolvimento das raízes laterais em *Arabidopsis* e que eles atuam sinergisticamente com a auxina para promover a formação das raízes laterais. Os autores mostraram que a percepção de BRs é necessária para a expressão de um promotor induzido por auxina (DR5::GUS) nos ápices das raízes, e que um inibidor do transporte de auxina (NPA) é capaz de reprimir a indução da formação de raízes laterais por BR e a expressão de DR5::GUS. Além disso, a observação de que os BRs regulam o transporte acrópeto de auxina na raiz suporta a hipótese que os BRs promovem o desenvolvimento da raiz lateral pelo aumento do transporte da auxina. Estas observações dão evidências que BR e auxina interagem funcionalmente pelo menos em parte pela regulação de BR do transporte de auxina.

Informações adicionais sobre as interações entre BRs e auxina foram dadas por Goda *et al.* (2004). Através de experimentos de microarranjo os autores estudaram o perfil de transcritos em *Arabidopsis* após 24 horas em resposta a auxina e a BRs. De um total de 637 genes identificados, eles viram que 409 genes eram induzidos por BR e 276 genes por IAA, mostrando assim que esses dois hormônios regularam apenas 48 genes em comum. A observação de que vários genes foram rapidamente induzidos por IAA, e mais lentamente por BR, sugere que eles apresentam funções fisiológicas divergentes. Além disso, a identificação de genes induzidos específicos por IAA e BR pode ajudar a elucidar as ações específicas de cada hormônio. É interessante notar que a sequência TGTCTC, característica dos elementos de resposta a auxina (*AuxRE*), foi encontrada em grande quantidade nas regiões 5' que flanqueavam tanto nos genes induzidos por auxina, quanto nos induzidos por BR. Esta característica poderia então, ser usada para prever as funções de genes desconhecidos e no entendimento das interações entre estes dois hormônios.

Outra possível função para os BRs é regular a diferenciação do procâmbio em xilema através da regulação de membros específicos da família de genes *HD-ZIP III* nas células vasculares (Fukuda, 2004). Foi observado que BRs induzem a expressão de um gene homólogo a *ATHB-8* em células do xilema em *Zinnia elegans* (Ohashi-Ito *et al.*, 2002). Além disto, foi visto que o desenvolvimento do xilema é reduzido em plantas de *Arabidopsis* apresentando deficiência nos níveis de BRs (Choe *et al.*, 1999).

Além de BRs, outros esteróis podem atuar regulando o crescimento e o desenvolvimento vegetal normais, e provavelmente existe uma via de resposta a esteróis independente de BRs. Os esteróis são importantes não apenas como precursores de hormônios esteróis, mas também por serem componentes estruturais de membranas (Bach e Benveniste, 1997). O mutante *hydra1 (hyd1)* apresenta defeitos na divisão e expansão celular e múltiplos MAC (Schrack *et al.*, 2002). Análises mostram que ocorre um bloqueio na biossíntese de esteróis, antes da biossíntese de BRs, e que a aplicação exógena de BRs não é capaz de reverter seu fenótipo, indicando que os esteróis são essenciais para o desenvolvimento (revisado por Clouse, 2002; Fujioka e Yokoda, 2003;

Schaller, 2003). Outro exemplo já discutido é o mutante *cvp1*, onde a descontinuidade vascular é observada como consequência de defeitos na sinalização mediada por esteróis ou na organização da membrana celular (Carland *et al.*, 2002; Diener *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000).

7. Possível função *versus* estrutura protéica de At1g55430

Até o momento, vários indícios apontam para uma possível atuação do gene *At1g55430* na via de sinalização hormonal, provavelmente atuando na percepção de sinais gerados pela auxina. Visando entender de que forma o gene *At1g55430* poderia estar atuando foi feita uma análise de sua estrutura protéica.

Através de análises em bancos de dados, foi visto que o gene *At1g55430* pertence a uma família gênica que apresenta alta homologia de seqüência entre seus membros (figura 12). Uma análise detalhada das seqüências das proteínas codificadas pelos genes desta família revelou que todas elas apresentam apenas o domínio funcional DC1 com um *E-value* significativo (*At1g55380* - *E-value*: 1.4e-39; *At1g55390* - *E-value*: 2.9e-39; *At1g55410* - *E-value*: 1.3e-46; *At1g55420* - *E-value*: 1.6e-38; *At1g55430* - *E-value*: 4.3e-31; *At1g55440* - *E-value*: 2.6e-41; *At5g42280* - *E-value*: 2.5e-38). Este pequeno domínio rico em cisteína e histidinas, encontrado apenas em vegetais, está relacionado com a interação com moléculas tipo o diacilglicerol (DAG) e os ésteres de forbol (análogos do DAG). Ele apresenta um padrão de conservação semelhante ao encontrado no domínio "DAG-PE bind", o qual atua como uma molécula sinalizadora para auxiliar a ativação das proteínas quinase C (PKCs - Protein Kinase C). As PKCs constituem uma família de serina-treonina quinases com importantes funções no controle de processos celulares tais como a proliferação e a diferenciação celular.

Em *Arabidopsis* foram identificadas 142 proteínas apresentando o domínio DC1. O único exemplo de proteína contendo este domínio que já foi parcialmente caracterizada é a "ULI3" (gene *At5g59920*, GenBank accession no. AF321919). A proteína ULI3 é expressa preferencialmente nas camadas celulares externas de em folhas, eixos e flores

(órgãos expostos à luz) e foi localizada no citoplasma, e ligada parcialmente à membrana plasmática das células. Sua ausência em plantas de *Arabidopsis* provoca prejuízos em várias respostas mediadas por UV-B, tais como a inibição reduzida do crescimento do hipocótilo após irradiação com pulsos de UV-B, e a redução da expressão de genes induzidos por UV-B, o que indica que ULI3 representa um componente específico envolvido na transdução de sinal mediado por UV-B (Suesslin e Frohnmeyer, 2003).

A atuação da proteína ULI3 em uma via de transdução de sinal é um forte indício de que proteínas com o domínio DC1 também podem atuar se acoplando a um ligante (DAG, ésteres de forbol, ou outro) presente na membrana celular, e ter um possível papel regulador.

Vários estudos têm mostrado a importância dos fosfolípidios de membrana na formação de mensageiros secundários durante o processo de transdução de sinais em células vegetais (revisado por Meijer e Munnik, 2003). Eles podem ser formados rapidamente em resposta a uma variedade de estímulos pela ativação de quinases e fosfolipases. Além disto, podem ativar enzimas ou recrutar proteínas para membranas através de diferentes domínios de ligação a lipídio (tais como o DAG e DC1), onde o aumento local na concentração, promove interações e pode disparar alterações químicas dentro da célula.

Esta interação proteína-lipídios tem como vantagens possibilitar a rápida propagação espacial de um sinal que é gerado localmente e o fato de ser reversível. Desta forma, as proteínas podem atuar de uma forma transiente devido ao recrutamento reversível de diferentes componentes da via de sinalização. Outra característica interessante da existência de um recrutamento reversível limitado a um local em particular é que a co-localização da proteína e do receptor pode atuar também limitando as vias de sinalização e as respostas resultantes a uma região celular particular (Fivaz e Meyer, 2003).

As fosfolipases têm grande importância no processo de sinalização promovido pelos fosfolípidios (Wang, 2004), pois catalisam a clivagem dos fosfolípidios, levando a liberação de vários mensageiros secundários intracelulares, entre eles o ácido fosfatídico,

o ácido lisofosfatídico, os ácidos graxos livres, o trifosfato de inositol e o diacilglicerol (Wang, 2004).

Existem evidências da atuação dos fosfolípidios no desenvolvimento dos pêlos radiculares. Foi demonstrado que o alvo direto do gene homeobox *GLABRA2*, um componente fundamental para formação do padrão dos pêlos radiculares, é o gene da fosfolipase Df1 (*AtPLDf1*). A redução da expressão desta enzima resulta na formação de tricoblastos com defeitos em sua polaridade, enquanto que a sua super expressão promove a formação de pêlos radiculares ectópicos, nas células que normalmente não produziram pêlos (Ohashi *et al.*, 2003).

Apesar de não estar totalmente elucidado o papel do diacilglicerol na sinalização via fosfolípidios, acredita-se que ele possa servir como um substrato para a formação do ácido fosfatídico, catalisado pela DAG quinase (Wang, 2004). A função do trifosfato de inositol em processos de sinalização em plantas já foi observada, como por exemplo, na diferenciação vascular de mutante *cvp2* (Carland e Nelson, 2004).

Desta forma, a presença do domínio DC1 na proteína AQT, e nos outros membros desta família, pode ser mais uma indicação de sua possível atividade na via de transdução de sinal da auxina. Provavelmente o domínio DC1 presente na proteína AQT propicia sua ligação a algum fosfolípido específico de membrana, influenciando a geração de sinais secundários.

Assim, estas informações associadas aos fenótipos apresentados pelo mutante *aqt*, indicam que a ausência da proteína AQT no mutante estaria prejudicando a percepção dos sinais gerados pela auxina, levando a uma alteração no controle da expressão gênica local e, conseqüentemente, prejudicando as respostas de proteínas celulares específicas que levariam a correta diferenciação e desenvolvimento celular.

Figura 36: Comparação entre os locais de acúmulo de auxina e o padrão de expressão de *At1g55430* em embriões. (I) Representação esquemática da distribuição de auxina durante os diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. Acúmulo de auxina na célula apical após a divisão assimétrica do zigoto (A), nas células derivadas apicais de embrião no estágio de oito células (B), nas células derivadas basais do embrião globular (C), e nos pólos dos cotilédones e radicular de embriões nos estágios cordiforme (D) e torpedo (E). Em azul está representado o local de acúmulo de auxina. Em verde e vermelho estão representadas as localizações dos carreadores de efluxo de auxina PIN7 e PIN1, respectivamente. Em cinza estão representados os tecidos provasculares. Setas verdes e vermelhas representam a direção do transporte de auxina conferida por PIN7 e PIN1, respectivamente. Esquema retirado de Grebe (2004), com modificações. (II) Análise por microscopia de contraste interferencial e epifluorescente de embriões do mutante *agt*. Imagens de epifluorescência mostrando expressão de GFP na região apical de embriões globulares (B), nos pólos que darão origem aos cotilédones, nas extremidades de embriões no início do estágio cordiforme (D), e nos MAC e MAR do embrião no estágio torpedo (F). Para facilitar a visualização imagens de microscopia de contraste interferencial dos mesmos embriões são mostradas em A, C e E, respectivamente.

5. Avaliação do efeito da super expressão e do bloqueio da expressão do gene *At1g55430* em *A. thaliana*

Visando compreender melhor a função do gene *At1g55430* no desenvolvimento de *Arabidopsis* foram obtidas plantas transgênicas com aumento e redução na expressão do gene *At1g55430*. As análises destas plantas indicam que o aumento na expressão é mais danoso para planta, uma vez que estas plantas não se desenvolvem normalmente, em geral não sobrevivendo mais que duas semanas.

Dada a grande dificuldade para obtenção de plantas transformadas com a construção 35S::*At1g55430*, apenas doze linhagens foram obtidas na primeira etapa de seleção e destas, apenas três linhagens eram homozigotas (linhagens L04, L06 e L13). Uma análise fenotípica preliminar das plantas destas linhagens na geração T2 mostrou uma grande diminuição no comprimento das raízes (tamanho final entre 1 e 2 cm), que geralmente formavam tufos, e pequenas alterações na forma da folha e no padrão dos feixes vasculares. A análise de plantas da geração T3 (homozigotas) das linhagens L04 e L06 mostrou que elas apresentam um fenótipo mais severo, com a presença de raízes formando um tufo de cerca de 1-2 cm de comprimento (figura 31) e com apenas 1-2% destas plantas sobrevivendo mais que duas semanas. Foi visto também que as plantas homozigotas da linhagem L13 apresentam um fenótipo compatível com um evento de co-supressão. Experimentos de RT-PCR e *Northern blot* foram usados para comprovar o aumento da expressão do gene endógeno em plântulas das linhagens L04 e L06, e a redução na expressão gênica na linhagem L13.

Como discutido anteriormente, o fenótipo radicular observado nas plantas com aumento da expressão do gene *At1g55430* é semelhante ao observado quando plantas mutantes *agt* foram crescidas em presença de auxina, o que é compatível com uma possível atuação do gene na percepção de sinais gerados pela auxina. Além disso, as alterações na amplitude da resposta aos níveis hormonais endógenos decorrentes do aumento de sua atividade poderia ser um dos fatores responsáveis pela alta letalidade

observada nas plantas transgênicas, uma vez que poderia estar ocasionando problemas na diferenciação e proliferação celular.

Foram obtidas 30 linhagens de plantas transformadas com a construção RNAi::At1g55430 e destas sete eram homozigotas para o inserto. Uma análise fenotípica preliminar em plantas das gerações T2 e T3 destas linhagens mostrou que estas plantas apresentam raízes de comprimentos variados e pequenas alterações a nível vascular em folhas. A redução na expressão do gene endógeno nestas linhagens foi comprovada por experimentos de RT-PCR. No entanto, essa redução na expressão parece não ter sido suficiente para reproduzir os fenótipos observados no mutante *aqt*. A nossa preocupação no momento do desenho da construção do vetor para RNAi foi evitar a presença de regiões que pudessem silenciar os genes parálogos de *At1g55430*. Para isso foi escolhido um fragmento de 176 pb de *At1g55430* que não apresentava nenhuma região com mais de 21 nucleotídeos de identidade com seus parálogos (figura 30). Porém, é conhecido que regiões menores de 400 nucleotídeos são ineficientes na indução do silenciamento (Thomas *et al.*, 2001). Portanto, possivelmente as linhagens obtidas não apresentavam o silenciamento completo do gene *At1g55430*. Essa hipótese é corroborada pela obtenção da linhagem L13 transformada com a construção para super expressão, mas que pela análise de expressão apresenta um evento de co-supressão. Essa linhagem apresenta um fenótipo muito mais próximo ao fenótipo do mutante *aqt* que qualquer linhagem obtida com a construção RNAi::At1g55430, indicando que o gene *At1g55430* foi mais eficientemente silenciado nesta linhagem. Porém, não podemos descartar a possibilidade de que a co-supressão possa estar ocorrendo também em outros genes da família de *At1g55430* e levando a esse fenótipo mais drástico.

6. Interação entre auxina e lipídios

O crescimento e o desenvolvimento vegetal são mediados pela interação de uma complicada rede de cascatas de sinalização, com cada evento de sinalização envolvendo mais de uma classe de fito-hormônios.

Vários fatores podem atuar em conjunto com a auxina para regular o desenvolvimento das células vasculares. Entre eles estão a citocinina, que atua na formação e/ou manutenção de células procambiais; os genes da família *HD-ZIP III* e os microRNAs, que atuam na regulação da diferenciação de células procambiais em células de xilema e os brassinosteróides que promovem o alongamento de eixo e inibem alongamento radicular em várias espécies vegetais.

Os brassinosteróides (BRs), uma classe especial de esteróides polioxigenados, e a auxina regulam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo divisão e expansão celular, diferenciação vascular, crescimento radicular, e senescência (revisado por Altmann, 1999; Bishop e Yokota, 2001). O fato de que várias respostas induzidas por auxina são aumentadas sinergisticamente por tratamentos com BR sugere uma possível interação entre esses dois hormônios (Nemhauser *et al.*, 2004). Plantas deficientes ou insensíveis aos brassinosteróides em geral apresentam baixa estatura (devido a defeitos na expansão celular), morfologia foliar alterada, redução na fertilidade, atraso na senescência, e desenvolvimento vascular alterado, com aumento na quantidade de floema e diminuição na quantidade de xilema (Nagata *et al.*, 2001; Choe *et al.*, 1999; Szekeres *et al.*, 1996).

Bao *et al.* (2004) mostraram que brassinosteróides (BRs) são necessários para o desenvolvimento das raízes laterais em *Arabidopsis* e que eles atuam sinergisticamente com a auxina para promover a formação das raízes laterais. Os autores mostraram que a percepção de BRs é necessária para a expressão de um promotor induzido por auxina (DR5::GUS) nos ápices das raízes, e que um inibidor do transporte de auxina (NPA) é capaz de reprimir a indução da formação de raízes laterais por BR e a expressão de DR5::GUS. Além disso, a observação de que os BRs regulam o transporte acrópeto de auxina na raiz suporta a hipótese que os BRs promovem o desenvolvimento da raiz lateral pelo aumento do transporte da auxina. Estas observações dão evidências que BR e auxina interagem funcionalmente pelo menos em parte pela regulação de BR do transporte de auxina.

Informações adicionais sobre as interações entre BRs e auxina foram dadas por Goda *et al.* (2004). Através de experimentos de microarranjo os autores estudaram o perfil de transcritos em *Arabidopsis* após 24 horas em resposta a auxina e a BRs. De um total de 637 genes identificados, eles viram que 409 genes eram induzidos por BR e 276 genes por IAA, mostrando assim que esses dois hormônios regularam apenas 48 genes em comum. A observação de que vários genes foram rapidamente induzidos por IAA, e mais lentamente por BR, sugere que eles apresentam funções fisiológicas divergentes. Além disso, a identificação de genes induzidos específicos por IAA e BR pode ajudar a elucidar as ações específicas de cada hormônio. É interessante notar que a sequência TGTCTC, característica dos elementos de resposta a auxina (*AuxRE*), foi encontrada em grande quantidade nas regiões 5' que flanqueavam tanto nos genes induzidos por auxina, quanto nos induzidos por BR. Esta característica poderia então, ser usada para prever as funções de genes desconhecidos e no entendimento das interações entre estes dois hormônios.

Outra possível função para os BRs é regular a diferenciação do procâmbio em xilema através da regulação de membros específicos da família de genes *HD-ZIP III* nas células vasculares (Fukuda, 2004). Foi observado que BRs induzem a expressão de um gene homólogo a *ATHB-8* em células do xilema em *Zinnia elegans* (Ohashi-Ito *et al.*, 2002). Além disto, foi visto que o desenvolvimento do xilema é reduzido em plantas de *Arabidopsis* apresentando deficiência nos níveis de BRs (Choe *et al.*, 1999).

Além de BRs, outros esteróis podem atuar regulando o crescimento e o desenvolvimento vegetal normais, e provavelmente existe uma via de resposta a esteróis independente de BRs. Os esteróis são importantes não apenas como precursores de hormônios esteróis, mas também por serem componentes estruturais de membranas (Bach e Benveniste, 1997). O mutante *hydra1 (hyd1)* apresenta defeitos na divisão e expansão celular e múltiplos MAC (Schrick *et al.*, 2002). Análises mostram que ocorre um bloqueio na biossíntese de esteróis, antes da biossíntese de BRs, e que a aplicação exógena de BRs não é capaz de reverter seu fenótipo, indicando que os esteróis são essenciais para o desenvolvimento (revisado por Clouse, 2002; Fujioka e Yokoda, 2003;

Schaller, 2003). Outro exemplo já discutido é o mutante *cvp1*, onde a descontinuidade vascular é observada como consequência de defeitos na sinalização mediada por esteróis ou na organização da membrana celular (Carland *et al.*, 2002; Diener *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2000).

7. Possível função *versus* estrutura protéica de At1g55430

Até o momento, vários indícios apontam para uma possível atuação do gene *At1g55430* na via de sinalização hormonal, provavelmente atuando na percepção de sinais gerados pela auxina. Visando entender de que forma o gene *At1g55430* poderia estar atuando foi feita uma análise de sua estrutura protéica.

Através de análises em bancos de dados, foi visto que o gene *At1g55430* pertence a uma família gênica que apresenta alta homologia de seqüência entre seus membros (figura 12). Uma análise detalhada das seqüências das proteínas codificadas pelos genes desta família revelou que todas elas apresentam apenas o domínio funcional DC1 com um *E-value* significativo (*At1g55380* - *E-value*: 1.4e-39; *At1g55390* - *E-value*: 2.9e-39; *At1g55410* - *E-value*: 1.3e-46; *At1g55420* - *E-value*: 1.6e-38; *At1g55430* - *E-value*: 4.3e-31; *At1g55440* - *E-value*: 2.6e-41; *At5g42280* - *E-value*: 2.5e-38). Este pequeno domínio rico em cisteína e histidinas, encontrado apenas em vegetais, está relacionado com a interação com moléculas tipo o diacilglicerol (DAG) e os ésteres de forbol (análogos do DAG). Ele apresenta um padrão de conservação semelhante ao encontrado no domínio "DAG-PE bind", o qual atua como uma molécula sinalizadora para auxiliar a ativação das proteínas quinase C (PKCs - Protein Kinase C). As PKCs constituem uma família de serina-treonina quinases com importantes funções no controle de processos celulares tais como a proliferação e a diferenciação celular.

Em *Arabidopsis* foram identificadas 142 proteínas apresentando o domínio DC1. O único exemplo de proteína contendo este domínio que já foi parcialmente caracterizada é a "ULI3" (gene *At5g59920*, GenBank accession no. AF321919). A proteína ULI3 é expressa preferencialmente nas camadas celulares externas de em folhas, eixos e flores

(órgãos expostos à luz) e foi localizada no citoplasma, e ligada parcialmente à membrana plasmática das células. Sua ausência em plantas de *Arabidopsis* provoca prejuízos em várias respostas mediadas por UV-B, tais como a inibição reduzida do crescimento do hipocótilo após irradiação com pulsos de UV-B, e a redução da expressão de genes induzidos por UV-B, o que indica que ULI3 representa um componente específico envolvido na transdução de sinal mediado por UV-B (Suesslin e Frohnmeyer, 2003).

A atuação da proteína ULI3 em uma via de transdução de sinal é um forte indício de que proteínas com o domínio DC1 também podem atuar se acoplando a um ligante (DAG, ésteres de forbol, ou outro) presente na membrana celular, e ter um possível papel regulador.

Vários estudos têm mostrado a importância dos fosfolípidios de membrana na formação de mensageiros secundários durante o processo de transdução de sinais em células vegetais (revisado por Meijer e Munnik, 2003). Eles podem ser formados rapidamente em resposta a uma variedade de estímulos pela ativação de quinases e fosfolipases. Além disto, podem ativar enzimas ou recrutar proteínas para membranas através de diferentes domínios de ligação a lipídio (tais como o DAG e DC1), onde o aumento local na concentração, promove interações e pode disparar alterações químicas dentro da célula.

Esta interação proteína-lipídios tem como vantagens possibilitar a rápida propagação espacial de um sinal que é gerado localmente e o fato de ser reversível. Desta forma, as proteínas podem atuar de uma forma transiente devido ao recrutamento reversível de diferentes componentes da via de sinalização. Outra característica interessante da existência de um recrutamento reversível limitado a um local em particular é que a co-localização da proteína e do receptor pode atuar também limitando as vias de sinalização e as respostas resultantes a uma região celular particular (Fivaz e Meyer, 2003).

As fosfolipases têm grande importância no processo de sinalização promovido pelos fosfolípidios (Wang, 2004), pois catalisam a clivagem dos fosfolípidios, levando a liberação de vários mensageiros secundários intracelulares, entre eles o ácido fosfatídico,

o ácido lisofosfatídico, os ácidos graxos livres, o trifosfato de inositol e o diacilglicerol (Wang, 2004).

Existem evidências da atuação dos fosfolípidios no desenvolvimento dos pêlos radiculares. Foi demonstrado que o alvo direto do gene homeobox *GLABRA2*, um componente fundamental para formação do padrão dos pêlos radiculares, é o gene da fosfolipase Df1 (*AtPLDf1*). A redução da expressão desta enzima resulta na formação de tricoblastos com defeitos em sua polaridade, enquanto que a sua super expressão promove a formação de pêlos radiculares ectópicos, nas células que normalmente não produziram pêlos (Ohashi *et al.*, 2003).

Apesar de não estar totalmente elucidado o papel do diacilglicerol na sinalização via fosfolípidios, acredita-se que ele possa servir como um substrato para a formação do ácido fosfatídico, catalisado pela DAG quinase (Wang, 2004). A função do trifosfato de inositol em processos de sinalização em plantas já foi observada, como por exemplo, na diferenciação vascular de mutante *cvp2* (Carland e Nelson, 2004).

Desta forma, a presença do domínio DC1 na proteína AQT, e nos outros membros desta família, pode ser mais uma indicação de sua possível atividade na via de transdução de sinal da auxina. Provavelmente o domínio DC1 presente na proteína AQT propicia sua ligação a algum fosfolípido específico de membrana, influenciando a geração de sinais secundários.

Assim, estas informações associadas aos fenótipos apresentados pelo mutante *aqt*, indicam que a ausência da proteína AQT no mutante estaria prejudicando a percepção dos sinais gerados pela auxina, levando a uma alteração no controle da expressão gênica local e, conseqüentemente, prejudicando as respostas de proteínas celulares específicas que levariam a correta diferenciação e desenvolvimento celular.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com base na análise fenotípica e molecular do mutante *aqt* de *A. thaliana* para o gene *At1g55430* e das plantas transgênicas para ganho de função e silenciamento, assim como resultados prévios de expressão deste gene, nos propomos que a proteína AQT provavelmente atua na percepção de sinais gerados pela auxina. Assim, sua ausência no mutante *aqt* estaria causando prejuízos na percepção destes sinais, o que estaria levando a uma alteração nas respostas celulares específicas e, conseqüentemente, alterando o desenvolvimento normal de vários órgãos.

Entre as características fenotípicas apresentadas pelo mutante *aqt* que indicam uma possível participação do gene *At1g55430* na via de sinalização por auxina estão a má formação dos feixes vasculares em cotilédones e folhas; o aumento no número de folhas da roseta e alteração em sua morfologia; o aumento na quantidade de feixes de xilema e floema em eixos de inflorescência; a redução no tamanho global da planta com eixos de inflorescência curtos; a perda da dominância apical no eixo de inflorescência; o aumento no comprimento e diâmetro da raiz principal; a menor quantidade de raízes laterais completamente desenvolvidas; o aumento no número de camadas celulares nas regiões da periderme e do floema secundário em raízes. Todos estes fenótipos podem ser explicados pela deficiência nas respostas a auxina. Além destas características, o fato de que os sítios de expressão do gene *At1g55430* coincidem com os sítios de síntese e com a rota de transporte de auxina é outra indicação da provável atuação da proteína AQT nesta via de sinalização. Além disso, foi observado que o mutante *aqt* apresenta insensibilidade à auxina no que diz respeito a quebra da dominância apical, bem como uma resposta atípica do sistema radicular quando este também foi exposto a auxina.

É de fundamental importância determinar a localização celular da proteína AQT. Para isto foi obtida uma construção contendo o gene *At1g55430* fusionado a proteína marcadora GFP. Esta construção já foi usada para transformação de plantas de *A. thaliana* e será usada também para transformação de células BY-2 de tabaco. A análise da localização subcelular da proteína de fusão com GFP será feita através de microscopia

confocal. A fluorescência da fusão com a proteína GFP será analisada em plântulas de *Arabidopsis* transformadas e também nos diferentes órgãos de plantas adultas.

Para detectar a existência de um desequilíbrio entre as vias de sinalização que envolvem os hormônios auxina e citocinina no mutante, pode ser usado o sistema de regeneração de tecido *in vitro*, isto porque o balanço entre a aplicação de auxina e citocinina é crucial para regeneração de tecidos em cultura (Skoog e Miller, 1957). Em plantas tipo selvagem espera-se que uma alta relação entre os níveis de auxina e citocinina favoreça a formação de raízes, enquanto que uma baixa relação favoreça a formação do sistema aéreo. Já níveis comparáveis de auxina e citocinina devem resultar no crescimento de tecido indiferenciado (calos). Desta forma, a resposta das plantas mutantes as concentrações hormonais presentes no meio indicará se estas vias de sinalização estão sendo afetadas.

Ainda são necessários experimentos adicionais para averiguar a atuação do gene *At1g55430* no desenvolvimento das raízes laterais. Cruzamentos entre plantas da linhagem *aqt* e mutantes *alf3* e *alf4* poderiam dar indicações adicionais sobre a etapa do desenvolvimento radicular que *AQT* poderia estar atuando.

Também estão sendo feitos cruzamentos entre as plantas *aqt* e plantas portando construções marcadoras para os estágios iniciais do desenvolvimento vascular (*ATHB-8::GUS* - região promotora do gene *ATHB-8* fusionada ao gene GUS), a distribuição de auxina (*DR5::GUS*) e o ciclo celular (*CYC1B::GUS*). Como a construção *ATHB-8::GUS* é usada como um marcador para formação do procâmbio (Kang e Dengler, 2002; Baima *et al.*, 1995), o cruzamento entre plantas *aqt* e plantas contendo esta construção permitirá confirmar se a ausência de expressão de *At1g55430* no mutante está estimulando a proliferação e a diferenciação anormal destas células. Por outro lado, a atividade do promotor sintético DR5, induzido pela auxina, é usada para visualizar a padrão espacial da resposta a auxina e, desta forma, serve como uma medida indireta da distribuição endógena da auxina (Friml *et al.*, 2003). Assim, a indução de DR5 no mutante *aqt*, decorrente do cruzamento entre plantas *aqt* e plantas contendo *DR5::GUS*, permitirá estabelecer uma relação entre a ausência de *aqt* e o acúmulo de auxina. Além disso, o

cruzamento entre plantas *aqt* e plantas contendo a construção CYC1B::GUS será usado para analisar a frequência de divisões celulares em células do procâmbio e nos tecidos adjacentes em folhas em desenvolvimento.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura também poderá ser usada para auxiliar na caracterização das folhas de *Arabidopsis*, evidenciando a morfologia das células epidérmicas presentes em suas superfícies abaxial e adaxial, bem como de estruturas como os tricomas e estômatos. A microscopia eletrônica de varredura também será importante para a melhor caracterização do sistema radicular no mutante *aqt* e nas linhagens com super-expressão e silenciamento do gene *At1g55430*. Este estudo poderá ajudar a identificar possíveis alterações decorrentes da ausência da expressão de *At1g55430* no mutante.

A conclusão dos experimentos em andamento, bem como dos sugeridos, deverá ajudar a elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a proteína AQT atua, incluindo a identificação de proteínas que interagem com ela. A importância da obtenção destes dados reside no fato de que eles poderão evidenciar a importância de uma nova família de proteínas no controle da morfogênese em vegetais cuja função até o momento não foi descrita. Independente da realização dos experimentos supracitados, um artigo com a caracterização preliminar do gene *At1g55430* a partir dos dados expostos nessa tese está sendo redigido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aeschbacher, R. A.; Hauser, M. T.; Feldmann, K. A. e Benfey, P. N.** (1995). The *SABRE* gene is required for normal cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 9 (3): 330-340.
- Aloni, R.; Schwalm, K.; Langhans, M. e Ullrich, C.I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*, 216 (5): 841-853.
- Aloni, R.** (2001). Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *J. Plant Growth Reg.*, 20: 22–34.
- Aloni, R.** (1987). Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 179-204.
- Aloni, R.** (1980). Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta*, 150: 255–263.
- Altmann T.** (1999). Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta*, 208 (1): 1-11.
- Ang, L.H.; Chattopadhyay, S.; Wei, N.; Oyama, T.; Okada, K.; Batschauer, A. e Deng, X.W.** (1998). Molecular interaction between *COP1* and *HY5* defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell.*, 1 (2): 213-222.
- Ang, L.H. e Deng, X.W.** (1994). Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: allele-specific and light-dependent interaction between the *HY5* and *COP1* loci. *Plant Cell*, 6 (5): 613-628.
- Avsian-Kretchmer, O.; Cheng, J.C.; Chen, L.; Moctezuma, E. e Sung, Z.R.** (2002). Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiol.*, 130 (1): 199-209.
- Bach, T. J. e Benveniste, P.** (1997). Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. *Prog Lipid Res.*, 36 (2-3): 197-226.
- Baima, S.; Possenti, M.; Matteucci, A.; Wisman, E.; Altamura, M. M.; Ruberti, I. e Morelli, G.** (2001). The *Arabidopsis* *ATHB-8* HD-Zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.*, 126: 643–655.

- Baima, S.; Nobili, F.; Sessa, G.; Lucchetti, S.; Ruberti, I. e Morelli, G.** (1995). The expression of the *ATHB-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 121: 4171–4182.
- Bangerth, F.** (1994). Response of cytokinin in the xylem exudates of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta*, 194: 439-442.
- Bao, F.; Shen, J.; Brady, S.R.; Muday, G.K.; Asami, T. e Yang, Z.** (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 134 (4): 1624-1631.
- Barton, M. K. e Poethig, R. S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: An analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119: 823–831.
- Baskin, T. I.; Betzner, A. S.; Hoogart, R.; Cork, A. e Williamson, R. E.** (1992). Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 19: 427-437.
- Benfey, P. N. e Schiefelbein, J. W.** (1994). Getting to the root of plant development: The genetics of *Arabidopsis* root formation. *Trends Genet.*, 10: 84–88.
- Benfey, P. N.; Linstead, P. J.; Roberts, K.; Schiefelbein, J. W.; Hauser, M. T. e Aeschbacher, R. A.** (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, 119: 57-70.
- Benková, E.; Michniewicz, M.; Sauer, M.; Teichmann, T.; Seifertova, D.; Jurgens, G. e Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 26 (115): 591-602.
- Bennet, S. R. M.; Alvarez, J.; Bossinger, G. e Smyth, D. R.** (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 8: 505-520.
- Bent, A. F.** (2000). *Arabidopsis* in Plant Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. *Plant Physiol.*, 124: 1540-1547.
- Berleth, T. e Chatfield, S.** (2002). Embryogenesis: Pattern Formation from a single cell. *In: The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologist. Disponível na INTERNET via www.aspb.org/downloads/Arabidopsis. Arquivo consultado em 2003.
- Berleth, T.; Mattsson, J. e Hardtke, C. S.** (2000). Vascular continuity and auxin signals. *TRENDS in Plant Science*, 5 (9): 387-393.

- Berleth, T. e Jürgens, G.** (1993). The role of the *MONOPTEROS* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*, 118:575-587.
- Bernhardt, C.; Lee, M.M.; Gonzalez, A.; Zhang, F.; Lloyd, A. e Schiefelbein, J.** (2003). The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development*, 130 (26): 6431-6439.
- Bhalerao, R. P.; Eklof, J.; Ljung, K.; Marchant, A.; Bennett, M. e Sandberg, G.** (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, 29: 325-332.
- Bishop, G.J. e Yokota, T.** (2001). Plant steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.*, 42 (2): 114-120.
- Blakeslee, J.J.; Bandyopadhyay, A.; Peer, W.A.; Makam, S.N. e Murphy, A.S.** (2004). Relocalization of the *PIN1* auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol.*, 134 (1): 28-31.
- Blilou, I.; Frugier, F.; Folmer, S.; Serralbo, O.; Willemsen, V.; Wolkenfelt, H.; Eloy, N. B.; Ferreira, P. C. G.; Weisbeek, P. e Scheres, B.** (2002). The *Arabidopsis* *HOBBIT* gene encodes a *CDC27* homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev.*, 16: 2566 -2575.
- Boerjan, W.; Cervera, M T .; Delarue, M.; Beeckman, T.; Dewitte, W.; Bellini, C.; Caboche, M.; Van Onckelen, H.; Van Montagu, M. e Inzé, D.** (1995). *Superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell.*, 7(9): 1405-1419.
- Brand, A. H. e Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118: 401-415.
- Byrne, M. E.; Simorowski, J. e Martienssen, R. A.** (2002). *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development*, 129 (8): 1957-1965.
- Candela, H.; Martinez-Laborda, A. e Micol, J. L.** (1999). Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Dev Biol.*, 205 (1): 205-216.
- Cao, X. F.; Linstead, P.; Berger, F.; Kieber, J. e Dolan, L.** (1999). Differential ethylene sensitivity of epidermal cells is involved in the establishment of cell pattern in the *Arabidopsis* root. *Physiol. Plant.* 106: 311-317.
- Carland, F. M. e Nelson, T.** (2004). *Cotyledon vascular pattern2*-mediated inositol (1,4,5) triphosphate signal transduction is essential for closed venation patterns of *Arabidopsis* foliar organs. *Plant Cell.*, 16 (5): 1263-1275.

- Carland, F. M.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yoshida, S. e Nelson, T.** (2002). The identification of *CVP1* reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell*, 14: 2045–2058.
- Carland, F. M.; Berg, B. L.; FitzGerald, J. N. e Jinamornphongs, S.** (1999). Genetic regulation of vascular tissue patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11: 2123–2137.
- Carland, F. M. e McHale, N. A.** (1996). *LOP1*: a gene involved in auxin transport and vascular patterning in *Arabidopsis*. *Development*, 122: 1811-1819.
- Casimiro, I.; Beeckman, T.; Graham, N.; Bhalerao, R.; Zhang, H.; Casero, P.; Sandberg, G. e Bennett, M. J.** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.*, 8: 165–171.
- Casimiro, I.; Marchant, A.; Bhalerao, R. P.; Beeckman, T.; Dhooge, S.; Swarup, R.; Graham, N.; Inzé, D.; Sandberg, G.; Casero, P. J. e Bennett, M.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*, 13: 843–852.
- Casson, S. A. e Lindsey, K.** (2003). Genes and signalling in root development. *New Phytol.*, 158: 11–38.
- Celenza, J. L.; Grisafi, P. L. e Fink, G. R.** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, 9: 2131–2142.
- Charrier, B.; Champion, A.; Henry, Y. e Kreis, M.** (2002). Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.*, 130 (2): 577-590.
- Chattopadhyay, S.; Ang, L.H.; Puente, P.; Deng, X.W. e Wei, N.** (1998). *Arabidopsis* bZIP protein *HY5* directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell.*, 10 (5): 673-683.
- Choe, S.; Dilkes, B. P.; Gregory, B. D.; Ross, A.S.; Yuan, H.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Tanaka, A.; Yoshida, S.; Tax, F.E. e Feldmann, K. A.** (1999). The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.*, 119 (3): 897-907.
- Chuck, G.; Lincoln, C. e Hake, S.** (1996). *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 8(8): 1277-1289.
- Church, G. M. e Gilbert, W.** (1994). Genomics sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 1991-1995.

- Clough, S. J. e Bent, A. F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16 (6): 735–743.
- Clouse, S. D.** (2002). Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell*, 10: 973–982.
- Cluis, C. P.; Mouchel, C. F. e Hardtke, C. S.** (2004). The *Arabidopsis* transcription factor *HY5* integrates light and hormone signaling pathways. *Plant Journal*, 38: 332–347.
- Colon-Carmona, A.; Chen, D. L.; Yeh, K. C. e Abel, S.** (2000). *Aux/IAA* proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol.*, 124: 1728 -1738
- De Smet, I.; Signora, L.; Beeckman, T.; Inze, D.; Foyer, C. H. e Zhang, H.** (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 33 (3): 543–555.
- Dengler, N. G. e Tsukaya, H.** (2001). Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. *Int. J. Plant Sci.*, 162 (3): 459-464.
- Deyholos, M.; Corder, G.; Beebe, D. e Sieburth L.** (2000). The *SCARFACE* gene is required for cotyledon and leaf vein patterning. *Development*, 127: 3205-3213.
- Di Cristina, M.D.; Sessa, G.; Dolan, L.; Linstead, P.; Baima, S.; Ruberti, I. e Morelli, G.** (1996). The *Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2)* is an *HD-Zip* protein required for regulation of root hair development. *Plant J.*, 10: 393-402.
- Di Donato, R. J.; Arbuckle, E.; Buker, S.; Sheets, J.; Tobar, J.; Totong, R.; Grisafi, P.; Fink, G. R. e Celenza, J. L.** (2004) *Arabidopsis ALF4* encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant Journal*, 37: 340–353.
- Di Laurenzio, L.; Wysocka-Diller, J.; Malamy, J.E.; Pysh, L.; Helariutta, Y.; Freshour, G.; Hahn, M.G.; Feldmann, K.A. e Benfey, P.N.** (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, 86 (3): 423-433.
- Diener, A.C.; Li, H.; Zhou, W.; Whoriskey, W.J.; Nes, W.D. e Fink, G.R.** (2000). *Sterol methyltransferase 1* controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*, 12 (6): 853-870.
- Dolan, L. e Roberts, K.** (1995). The development of cell pattern in the root epidermis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 350 (1331): 95-99.

- Dolan, L.; Duckett, C.; Grierson, C.; Linstead, P.; Schneider, K.; Lawson, E.; Dean, C.; Poethig R. S. e Roberts, L.** (1994). Clonal relations and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development*, 120: 2465-2474.
- Dolan, L.; Janmaat, K.; Willemsen, V.; Linstead, P.; Poethig, S.; Roberts, K. e Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119: 71–84.
- Dolan, L. e Poethig, R. S.** (1991). Genetic analysis of leaf development in cotton. *Development Suppl.*, 1: 39-46.
- Dubrovsky, J. G.** (2002). The Development of Lateral Roots. *In: Plant Physiology on line*. Disponível na INTERNET via www.plantphys.net/. Arquivo consultado em 2003.
- Elliott, R. C.; Betzner, A. S.; Huttner, E.; Oakes, M. P.; Tucker, W. Q.; Gerentes, D.; Perez, P. e Smyth, D. R.** (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*, 8 (2): 155-168.
- Emery, J. F.; Floyd, S. K.; Alvarez, J.; Eshed, Y.; Hawker, N. P.; Izhaki, A.; Baum, S. F. e Bowman, J. L.** (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and *KANADI* genes. *Curr. Biol.*, 13: 1768–1774.
- Eshed, Y.; Izhaki, A.; Baum, S. F.; Floyd, S. K. e Bowman, J. L.** (2004). Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by *KANADI* and *YABBY* activities. *Development*, 131 (12): 2997-3006.
- Eshed, Y.; Baum, S.F.; Perea, J.V. e Bowman, J.L.** (2001). Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr Biol.*, 11 (16): 1251-1260.
- Fivaz, M. e Meyer, T.** (2003). Specific localization and timing in neuronal signal transduction mediated by protein-lipid interactions. *Neuron*, 40 (2): 319-330.
- Fleming, A. J.** (2005). Formation of primordia and phyllotaxy. *Curr Opin Plant Biol.*, 8 (1): 53-58.
- Fleming, A. J.** (2003). The molecular regulation of leaf form. *Plant Biol.*, 5: 341-349.
- Friml, J.; Vieten, A.; Sauer, M.; Weijers, D.; Schwarz, H.; Hamann, T.; Offringa, R. e Jurgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 147–153.
- Friml, J.; Wisniewska, J.; Benková, E.; Mendgen, K. e Palme, K.** (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator *PIN3* mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415: 806–809.

- Friml, J. e Palme, K.** (2002). Polar auxin transport - old questions and new concepts? *Plant Mol. Biol.*, 49: 273–284.
- Fujioka, S. e Yokota, T.** (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol.*, 54: 137-164.
- Fukuda, H.** (2004). Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5 (5): 379-391.
- Fukuda, H.** (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell*, 9: 1147–1156.
- Galway, M. E.; Masucci, J. D.; Lloyd, A. M.; Walbot, V.; Davis, R. W. e Schiefelbein, J. W.** (1994). The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev. Biol.*, 166: 740 -754.
- Gälweiler, L.; Juan, C.; Müller, A.; Wisman, E.; Mendgen, K.; Yephremov, A. e Palme K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282: 2226-2230.
- Geldner, N.; Richter, S.; Vieten, A.; Marquardt, S.; Torres-Ruiz, R.A.; Mayer, U. e Jürgens, G.** (2004) Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development*, 131 (2): 389–400.
- Goda, H.; Sawa, S.; Asami, T.; Fujioka, S.; Shimada, Y. e Yoshida, S.** (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 134: 1555–1573.
- Grebe, M.** (2004). Ups and downs of tissue and planar polarity in plants. *Bioessays*, 26: 719-729.
- Grierson, C.; Roberts, K.; Feldman, K. A. e Dolan, L.** (1997). The *COW1* locus of *Arabidopsis* acts after *RHD2*, and in parallel with *RHD3* and *TIP1*, to determine the shape, rate of elongation, and number of root hairs produced from each site of root hair formation. *Plant Physiol.*, 115: 981 -990.
- Hamada, S.; Onouchi, H.; Tanaka, H.; Kudo, M.; Liu, Y.G.; Shibata, D.; MacHida, C. e Machida, Y.** (2000). Mutations in the *WUSCHEL* gene of *Arabidopsis thaliana* result in the development of shoots without juvenile leaves. *Plant J.*, 24 (1): 91-101.
- Hamann, T.; Mayer, U. e Jürgens, G.** (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development*, 126: 1387-1395.

- Hardtke, C. S.; Ckurshumova, W.; Vidaurre, D. P.; Singh, S. A.; Stamatiou, G.; Tiwari, S. B.; Hagen, G.; Guilfoyle, T. J. e Berleth, T.** (2004). Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors *MONOPTEROS* and *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4*. *Development*, 131: 1089–1100.
- Hauser, M-T.; Morikami, A. e Benfey, P. N.** (1995). Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development*, 121: 12237-1252.
- Hawker, N. P. e Bowman, J. L.** (2004). Roles for Class III HD-Zip and KANADI Genes in *Arabidopsis* Root Development. *Plant Physiol.*, 135: 2261–2270.
- Hays, J. B.** (2002). *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair*, 1(8): 579-600.
- Hemerly, A. S.; Ferreira, P.; de Almeida Engler, J.; Van Montagu, M.; Engler, G. e Inze, D.** (1993). *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, 5: 1711-1723.
- Himanen, K.; Vuylsteke, M.; Vanneste, S.; Vercruyssen, S.; Boucheron, E.; Alard, P.; Chriqui, D.; Van Montagu, M.; Inzé, D. e Beeckman T.** (2004). Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 5146–5151.
- Hobbie, L.; McGovern, M.; Hurwitz, L. R.; Pierro, A.; Liu, N. Y.; Bandyopadhyay, A. e Estelle, M.** (2000). The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development*, 127: 23-32.
- Hobbie, L. e Estelle, M.** (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.*, 7: 211–220.
- Holm, M.; Ma, L.G.; Qu, L.J. e Deng, X.W.** (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of *COP1*-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 16 (10): 1247-1259.
- Jack T.** (2001). Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends Plant Sci.* 6(7): 310-316.
- Jang, J.C.; Fujioka, S.; Tasaka, M.; Seto, H.; Takatsuto, S.; Ishii, A.; Aida, M.; Yoshida, S. e Sheen, J.** (2000). A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, 14 (12): 1485-1497.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A. e Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6 (13): 3901-3907.

- Johannesson, H.; Wang, Y.; Hanson, J. e Engstrom, P.** (2003). The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *ATHB5* is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol Biol.*, 51 (5): 719-729.
- Kajiwara, T.; Furutani, M.; Hibara, K. e Tasaka, M.** (2004). The *GURKE* gene encoding an acetyl-CoA carboxylase is required for partitioning the embryo apex into three subregions in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 45 (9): 1122-1128.
- Kang, J. e Dengler, N.** (2004). Vein pattern development in adult leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Int J. Plant Sci.*, 165 (2): 231-242.
- Kang, J. e Dengler, N.** (2002). Cell cycling frequency and expression of the homeobox gene *ATHB-8* during leaf vein development in *Arabidopsis*. *Planta*, 216 (2): 212-219.
- Karimi, M.; Inzé, D. e Depicker, A.** (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *TRENDS in Plant Science*, 7 (5): 193-195.
- Kerstetter, R. A.; Bollman, K.; Taylor, R. A.; Bomblies, K. e Poethig, R. S.** (2001). *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature*, 411: 706-709.
- Kerstetter, R.; Vollbrecht, E.; Lowe, B.; Veit, B.; Yamaguchi, J. e Hake, S.** (1994). Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell*, 6 (12):1877-1887.
- Kieber, J. J.; Rothenberg, M.; Roman, G.; Feldmann, K. A. e Ecker, J. R.** (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the *Raf* family of protein kinases. *Cell*, 72: 427-441.
- Kim, J.; Jung, J. H.; Reyes, J. L.; Kim, Y. S.; Kim, S. Y.; Chung, K. S.; Kim, J. A.; Lee, M.; Lee, Y.; Narry Kim, V.; Chua, N. H. e Park, C.M.** (2005). microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.*, 42 (1): 84-94.
- Kim, G. T.; Tsukaya, H.; Saito, Y. e Uchimiya, H.** (1999). Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (16): 9433-9437.
- Kim, G. T.; Tsukaya, H. e Uchimiya, H.** (1998). The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev.*, 12 (15): 2381-2391.
- Kimbrough, J. M.; Salinas-Mondragon, R.; Boss, W. F.; Brown, C. S. e Sederoff, H. W.** (2004). The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiol.*, 136 (1): 2790-2805.

- King, J. J.; Stimart, D. P.; Fisher, R. H. e Bleecker, A. B.** (1995). A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 7: 2023–2037.
- Klee, H.J.; Horsch, R.B.; Hinchee, M.A.; Hein, M.B. e Hoffman, N.L.** (1987). The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev.*, 1: 86-96.
- Klinge, B.; Uberlacker, B.; Korfhage, C. e Werr, W.** (1996). *ZmHox*: A novel class of maize homeobox genes. *Plant Mol. Biol.*, 30: 439-453.
- Knox, K.; Grierson, C. S. e Leyser, O.** (2003). *AXR3* and *SHY2* interact to regulate root hair development. *Development*, 130: 5769-5777.
- Koch, A. J. e Meinhardt, H.** (1994). Biological pattern-formation: from basic mechanisms to complex structures. *Rev. Modern Physics*, 66: 1481-1507
- Koizumi, K.; Sugitaka, M. e Fukuda, H.** (2000). A series of novel mutants of *A.thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypotesis into question. *Development*, 127: 3197-3204.
- Koncz, C. e Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, 204: 383–396.
- Koo, A. J. K. e Ohlrogge, J. B.** (2002). The Predicted Candidates of *Arabidopsis* Plastid Inner Envelope Membrane Proteins and Their Expression Profiles. *Plant Physiol.*, 130: 823-836.
- Laskowski, M. J.; Williams, M. E.; Nusbaum, H. C. e Sussex, I. M.** (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121: 3303–3310.
- Laux, T. e Jürgens, G.** (1997). Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell*, 9 (7): 989-1000.
- Laux, T.; Mayer, K. F. X.; Berger, J. e Jürgens, G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122: 87-96.
- Lee, M. M. e Schiefelbein, J.** (2002). Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell*, 14 (3): 611-618.
- Lee, M. M. e Schiefelbein, J.** (1999). *WEREWOLF*, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell*, 99 (5): 473-483.

- Leyser, H. M. O. e Furner, I. J.** (1992). Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 116, 397–403.
- Lincoln, C.; Long, J.; Yamaguchi, J.; Serikawa, K. e Hake, S.** (1994). A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, 6 (12): 1859-1876.
- Lincoln, C.; Britton, J. H. e Estelle, M.** (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2: 1071–1080.
- Liu, Y.G.; Mitsukawa, N.; Oosumi, T. e Whittier, R.F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.*, 8 (3): 457-463.
- Ljung, K.; Hull, A.K.; Celenza, J.; Yamada, M.; Estelle, M.; Normanly, J. e Sandberg, G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 17 (4): 1090-1104.
- Long, J. A.; Moan, E. I.; Medford, J. I. e Barton, M. K.** (1996). A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*, 379: 66–69.
- López-Bucio, J.; Cruz-Ramírez, A. e Herrera-Estrella, L.** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 280–287.
- Malamy, J. E. e Benfey, P. N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124: 33–44.
- Marchant, A.; Bhalerao, R.; Casimiro, I.; Eklof, J.; Casero, P. J.; Bennett, M. e Sandberg, G.** (2002). *AUX1* promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*, 14: 589–597.
- Masucci, J. D. e Schiefelbein, J. W.** (1996). Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell*, 8: 1505-1517.
- Masucci, J.D.; Rerie, W.G.; Foreman, D.R.; Zhang, M.; Galway, M.E.; Marks, M.D e Schiefelbein, J.W.** (1996). The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 122: 1253-1260.
- Masucci, J. D. e Schiefelbein, J. W.** (1994). The *rh6* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiol.*, 106 (4): 1335-1346.

- Mattsson, J.; Ckurshumova, W. e Berleth, T.** (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.*, 131: 1327-1339.
- Mattsson, J.; Sung, Z. R. e Berleth, T.** (1999). Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development*, 126: 2979–2991.
- Mayer, U.; Büttner, G. e Jürgens, G.** (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development*, 117: 149–162.
- Mayer, U.; Torres Ruiz, R.A.; Berleth, T.; Misera, S. e Jurgens, G.** (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 353: 402-406.
- McConnell, J. R.; Emery, J.; Eshed, Y.; Bao, N.; Bowman, J. e Barton, M. K.** (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature*, 411: 709-713.
- McConnell, J. R. e Barton, M. K.** (1998). Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development*, 125: 2935-2942.
- Meijer, H.J. e Munnik, T.** (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.*, 54: 265-306.
- Meinhardt, H. e Gierer, A.** (2000). Pattern formation by local selfactivation and lateral inhibition. *BioEssays*, 22: 753-760.
- Meinhardt, H.** (1996). Models of biological pattern formation: common mechanism in plant and animal development. *Int. J. Dev. Biol.*, 40: 123–134.
- Meinke, D. W.** (1992). A homeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science*, 258: 1647-1650.
- Meyerowitz, E. M. e Somerville, C. R.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mirza, J. I.; Olsen, G. M.; Iversen, T-H e Maher, E. P.** (1984). The growth and gravitopic responses of wild-type and auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 60: 516-522.
- Miyawaki, K.; Matsumoto-Kitano, M. e Kakimoto, T.** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.*, 37: 128–138.

- Mizukami, Y. e Fischer, R. L.** (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (2): 942-947.
- Morelle, G.** (1988). A Plasmid Extraction Procedure On Miniprep Scale. *Focus*, 11.
- Muller, A.; Guan, C.; Gälweiler, L.; Tanzler, P.; Huijser, P.; Marchant, A.; Parry, G.; Bennett, M.; Wisman, E. e Palme K.** (1998). *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal*, 17: 6903–6911.
- Murashige, T. e Skoog, F.** (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, 15: 403-406.
- Nagata, N.; Asami, T. e Yoshida, S.** (2001). Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants (*Lepidium sativum*). *Plant Cell Physiol.*, 42: 1006–1011.
- Nelson, T. e Dengler, N.** (1997). Leaf vascular pattern formation. *Plant Cell*, 9: 1121-1135.
- Nemhauser, J. L.; Mockler, T. C. e Chory J.** (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, 2: 1460–1471.
- Ohashi, Y.; Oka, A.; Rodrigues-Pousada, R.; Possenti, M.; Ruberti, I.; Morelli, G. e Aoyama, T.** (2003). Modulation of phospholipid signaling by *GLABRA2* in root-hair pattern formation. *Science*, 300 (5624): 1427-1430.
- Ohashi-Ito, K. e Fukuda, H.** (2003). *HD-Zip III* homeobox genes that include a novel member, *ZeHB-13* (*Zinnia*)/*AtHB-15* (*Arabidopsis*), are involved in xylem pattern formation. *Plant Cell Physiol.*, 44: 1350–1358.
- Ohashi-Ito, K.; Demura, T. e Fukuda, H.** (2002). Promotion of transcript accumulation of novel *Zinnia* immature xylem-specific *HD-Zip III* homeobox genes by brassinosteroids. *Plant Cell Physiol.*, 43 (10): 1146-1153.
- Okada, K.; Ude, J.; Komaki, M. K.; Bell, C. J. e Shimura, Y.** (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*, 3: 677-684.
- Otsuga, D.; DeGuzman, B.; Prigge, M. J.; Drews, G. N. e Clark, S. E.** (2001). *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.*, 25: 223–236.
- Ouellet, F.; Overvoorde, P. J. e Theologis, A.** (2001). *IAA17/AXR3*: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell*, 13: 829–841.

- Oyama, T.; Shimura, Y. e Okada, K.** (1997). The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.*, 11 (22): 2983-2995.
- Parinov, S. e Sundaresan, V.** (2000). Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 157-161.
- Parker, G.; Schofield, R.; Sundberg, B. e Turner, S.** (2003). Isolation of *COV1*, a gene involved in the regulation of vascular patterning in the stem of *Arabidopsis*. *Development*, 130: 2139-2148.
- Payne, C.T.; Zhang, F. e Lloyd, A.M.** (2000). *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics*, 156 (3): 1349-1362.
- Peterson, R. L. e Farquhar, M. L.** (1996). Root hairs: specialised tubular cells extending root surfaces. *Bot. Rev.*, 62: 1-40.
- Pitts, R. J.; Cernac, A. e Estelle, M.** (1998). Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 16 (5): 553-560.
- Poething, C.P. e Aravind, L.** (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci.*, 24 (4): 130-132.
- Poethig, R. S. e Sussex, I. M.** (1985). The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta*, 165:158-169.
- Pozzi, C.; Rossini, L. e Agosti, F.** (2001). Patterns and symmetries in leaf development. *Seminars in Cell e Developmental Biology*, 12: 363:372.
- Prigge, M. J.; Otsuga, D.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R.; Drews, G. N. e Clark, S. E.** (2005). Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in *Arabidopsis* Development. *Plant Cell*, 17 (1): 61-76.
- Przemeck, G. K. H.; Mattsson, J.; Hardtke, C. S.; Sung, Z. R. e Berleth, T.** (1996). Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta*, 200: 229-237.
- Pyo, H.; Demura, T. e Fukuda, H.** (2004). Spatial and temporal tracing of vessel differentiation in young *Arabidopsis* seedlings by the expression of an immature tracheary element-specific promoter. *Plant Cell Physiol.*, 45 (10): 1529-1536.

- Ratcliffe, O. J.; Riechmann, J. L. e Zhang, J. Z.** (2000). *INTERFASCICULAR FIBERLESS1* is the same gene as *REVOLUTA*. *Plant Cell*, 12: 315–317.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. e Eichhorn, S. E.** (1999). O sistema caulinar: estrutura primária e desenvolvimento. In: *Biologia Vegetal*. Sexta edição. Ed. Guanabara Koogan S.A. pp. 587-621.
- Reed, R. C.; Brady, S. R. e Muday, G. K.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 118: 1369-1378.
- Reinhardt, D.** (2003). Vascular patterning: more than just auxin? *Current Biology*, 13: R485-R487.
- Reinhardt, D.; Pesce, E-R.; Stieger, P.; Mandel, T.; Baltensperger, K.; Bennett, M.; Traas, J.; Friml, J. e Kuhlemeier, C.** (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426: 255-260.
- Rigas, S.; Debrosses, G.; Haralampidus, K.; Vicente-Agullo, F.; Feldmann, K. A.; Grabov, A.; Dolan, L. e Hatzopoulos, P.** (2001). *TRH1* encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell*, 13: 139–151
- Ringli, C.; Baumberger, N.; Diet, A.; Frey, B. e Keller, B.** (2002). *ACTIN2* Is Essential for Bulge Site Selection and Tip Growth during Root Hair Development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 129: 1464–1472.
- Romano, C.P.; Hein, M.B. e Klee, H.J.** (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.*, 5 (3): 438-446.
- Sachs, T.** (2000). Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant Cell Physiol.*, 41: 649–656.
- Sachs, T.** (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Dev. Suppl.*, 1:83-93.
- Sachs, T.** (1981). The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Adv. Bot. Res.*, 9: 151-262.
- Saijo, Y.; Sullivan, J.A.; Wang, H.; Yang, J.; Shen, Y.; Rubio, V.; Ma, L.; Hoecker, U. e Deng, X.W.** (2003). The *COP1-SPA1* interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of *HY5* activity. *Genes Dev.*, 17 (21): 2642-2647.
- Sambrook J.; Fritsch E. F. e Maniatis T.** (1989). Molecular cloning – A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Scarpella, E. e Meijer, A. H.** (2004). Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. *New Phytologist*, 164 (2): 209-242
- Scarpella, E.; Francis, P. e Berleth, T.** (2004). Stage-specific markers define early steps of procambium development in *Arabidopsis* leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation. *Development*, 131 (14): 3445-3455.
- Scarpella, E.; Rueb, S. e Meijer, A. H.** (2003). The *RADICLELESS1* gene is required for vascular pattern formation in rice. *Development*, 130: 645-658.
- Schaller, H.** (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res.*, 42 (3): 163-175.
- Scheres, B.; Di Lorenzo, L.; Willemsen, V.; Hauser, M. T.; Janmaat, K.; Weisbeek, P. e Benfey, P. N.** (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121 (1): 53-62.
- Scheres, B.; Wolkenfelt, H.; Willemsen, V.; Terlouw, M.; Lawson, E.; Dean, C. e Weisbeek, P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*, 120: 2475-2487.
- Schiefelbein, J. W.; Masucci, J. D. e Wang, H.** (1997). Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell*, 9: 1089-1098.
- Schiefelbein, J.; Ford, S. K. e Galway, M. E.** (1993). Genetic analysis of root development. *Develop. Biol.*, 4: 23-30.
- Schiefelbein, J.W. e Somerville, C.** (1990). Genetic Control of Root Hair Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2 (3): 235-243.
- Schindler, U.; Beckmann, H. e Cashmore, A. R.** (1993). *HAT3.1*, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J.*, 4: 137-150.
- Schneider, K.; Wells, B.; Dolan, L. e Roberts, K.** (1997). Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. *Development*, 124 (9): 1789-1798.
- Schoof, H.; Lenhard, M.; Haecker, A.; Mayer, K.F.; Jurgens, G. e Laux, T.** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 100: 635-644.

- Schrick, K.; Mayer, U.; Martin, G.; Bellini, C.; Kuhnt, C.; Schmidt, J. e Jurgens, G.** (2002). Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 31 (1): 61-73.
- Schrick, K.; Mayer, U.; Horrichs, A.; Kuhnt, C.; Bellini, C.; Dangl, J.; Schmidt, J. e Jurgens, G.** (2000). *FACKEL* is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.*, 14 (12): 1471-1484.
- Sentoku, N.; Sato, Y. & Matsuoka, M.** (2000). Overexpression of rice *OSH* genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. *Dev. Biol.*, 220: 358-364.
- Sessa, G.; Steindler, C.; Morelli, G. e Ruberti, I.** (1998). The *Arabidopsis* *ATHB-8*, *-9* and *-14* genes are members of a small gene family coding for highly related *HD-ZIP* proteins. *Plant Mol. Biol.*, 38: 609-622.
- Sieburth, L. E.** (1999). Auxin is required for leaf vein pattern in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 121: 1179-1190.
- Siegfried, K. R.; Eshed, Y.; Baum, S. F.; Otsuga, D.; Drews, G. N. e Bowman, J. L.** (1999). Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development*, 126: 4117-4128.
- Skoog, F. e Miller, C.O.** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol.*, 54 (11): 118-130.
- Slater, S.J.; Milano, S.K.; Stagliano, B.A.; Gergich, K.J.; Ho, C.; Mazurek, A.; Taddeo, F.J.; Kelly, M.B.; Yeager, M.D. e Stubbs, C.D.** (1999). Synergistic activation of protein kinase C alpha, -beta I, and -gamma isoforms induced by diacylglycerol and phorbol ester: Roles of membrane association and activating conformational changes. *Biochemistry*, 38 (12): 3804-3815.
- Smith, L. G. e S. Hake.** (1992). The initiation and determination of leaves. *Plant Cell*, 4: 1017-1027.
- Souter, M.; Topping, J.; Pullen, M.; Friml, J.; Palme, K.; Hackett, R.; Grierson, D. e Lindsey, K.** (2002) *hydra* mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell*, 14 (5): 1017-1031.
- Springer, P. S.** (2000). Gene Traps: Tools for Plant Development and Genomics. *Plant Cell*, 12: 1007-1020.
- Steeves, T. A. e Sussex, I. M.** (1989). Patterns in Plant Development. Cambridge University Press: Cambridge, UK.

- Stirnberg, P.; Chatfield, S.P. e Leyser, H.M.** (1999). *AXR1* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 121 (3): 839-847.
- Suesslin, C. e Frohnmeyer, H.** (2003). An *Arabidopsis* mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J.*, 33 (3): 591-601.
- Swarup, R.; Friml, J.; Marchant, A.; Ljung, K.; Sandberg, G.; Palme, K. e Bennett, M.** (2001). Localization of the auxin permease *AUX1* suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes and Development*, 15: 2648–2653.
- Szekeres, M.; Nemeth, K.; Koncz-Kalman, Z.; Mathur, J.; Kauschmann, A.; Altmann, T.; Redei, G.P.; Nagy, F.; Schell, J. e Koncz, C.** (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85 (2): 171–182.
- Szymanski, D. B.; Lloyd, A. M. e Marks, M. D.** (2000). Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 5 (5): 214-219.
- Teale, W. D.; Paponov, I. A.; Ditengou, F. e Palme, K.** (2005). Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant*, 123: 130-138.
- Telfer, A. e Poethig, R. S.** (1994). Leaf development in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz, E. M. e Somerville, C. R. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. p. 379–401.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815.
- Thomas, C.L.; Jones, L.; Baulcombe, D.C. e Maule, A.J.** (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J.*, 25 (4): 417-425.
- Torres-Ruiz, R.A.; Lohner, A. e Jurgens, G.** (1996). The *GURKE* gene is required for normal organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J.*, 10 (6): 1005-1016.
- Tsiantis, M. e Hay, A.** (2003). Comparative plant development: the time of the leaf? *Nature Reviews*, 4: 169-180.
- Tsiantis, M.; Brown, M.I.; Skibinski, G. e Langdale, J.A.** (1999). Disruption of auxin transport is associated with aberrant leaf development in maize. *Plant Physiol.*, 121 (4): 1163-1168.

- Tsuge, T.; Tsukaya, H. e Uchimiya, H.** (1996). Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development*, 122 (5): 1589-600.
- Tsukaya, H.** (2003). Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current opinion in Plant Biology*, 6: 57-62.
- Tsukaya, H.** (2000). The role of meristematic activities in the formation of leaf blades. *J. Plant Res.*, 113: 119-126.
- Tsukaya, H.** (1995). Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledonous plants. *J. Plant Res.*, 108: 407-416.
- Tsukaya, H.; Naito, S.; Rédei, G. P. e Komeda, Y.** (1993). A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development*, 118 (3): 751-764.
- Vollbrecht, E.; Reiser, L. e Hake, S.** (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development*, 127 (14): 3161-3172.
- Wada, T.; Kurata, T.; Tominaga, R.; Koshino-Kimura, Y.; Tachibana, T.; Goto, K.; Marks, M.D.; Shimura, Y. e Okada, K.** (2002). Role of a positive regulator of root hair development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development*, 129 (23): 5409-5419.
- Wada, T.; Tachibana, T.; Shimura, Y. e Okada, K.** (1997). Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a *Myb* homolog, *CPC*. *Science*, 277: 1113-1116.
- Waites, R. e Hudson, A.** (1995). *PHANTASTICA*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development*, 121: 2143-2154.
- Walden, R.** (2002). T-DNA tagging in a Genomics Era. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (3): 143-165.
- Wang, X.** (2004). Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol.*, 7(3): 329-336.
- Wang, M-B e Waterhouse, P. M.** (2001). Application of gene silencing in Plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 146-150.
- Weijers, D. e Jurgens, G.** (2005). Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr Opin Plant Biol.*, 8 (1): 32-37.

- 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. e Waterhouse, A. G.** (2001). Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27 (6): 581-590.
- Wilson, A.; Pickett, F. B.; Turner, J. C. e Estelle, M.** (1990). A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene, and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.*, 222: 377-383.
- Wyrkowska, J. e Fleming, A. J.** (2003). Cell division pattern influences gene expression in the shoot apical meristem. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 5561-5566.
- Ye, Z.H.** (2002). Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 183-202.
- Zhong, R. e Ye, Z-H.** (2004). *amphivasal vascular bundle 1*, a Gain-of-Function Mutation of the *IFL1/REV* Gene, Is Associated with Alterations in the Polarity of Leaves, Stems and Carpels. *Plant and Cell Physiol.*, 45(4): 369-385.
- Zhong, R. e Ye, Z-H.** (1999). *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell*, 11: 2139–2152.
- Zhong, R.; Taylor, J.Ji e Ye, Z.H.** (1999). Transformation of the collateral vascular bundles into amphivasal vascular bundles in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Physiol.*, 120: 53–64.
- Zhong, R.; Taylor, J. J. e Ye, Z-H.** (1997). Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell*, 9: 2159–2170.

Anexos

*Artigos não relacionados ao
trabalho*

Anexo I

Artigo publicado

Effect of *Urtica dioica* agglutinin and *Arabidopsis thaliana* Chia4 chitinase on the protozoan *Phytomonas françai*

Graça Celeste Gomes Rocha^a, Rebecca Nicolich^a, Alexandre Romeiro^b,
Márcia Margis-Pinheiro^a, Márcia Attias^b, Márcio Alves-Ferreira^{a,*}

^a Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Instituto de Biologia, Dept. de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pau Brasil 211, AZ 76, 21944-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 25 March 2003; received in revised form 24 June 2003; accepted 25 June 2003

First published online 30 July 2003

Abstract

The genus *Phytomonas* is responsible for many diseases in different crop plant species. The finding that chitin is an exposed cell surface polysaccharide in *Phytomonas françai* and the observation that chitinases can inhibit fungal growth raises expectations about the potential effect of plant chitinases on the *P. françai* cell membrane surface. The plant chitinases *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and *Arabidopsis thaliana* Chia4 (ATCHIT4) proteins were over-expressed in bacteria and the interaction between these proteins and *P. françai* surface was analyzed by immunocytochemistry. We showed that UDA and ATCHIT4 proteins can interact with surface-exposed chitin from *P. françai*.

© 2003 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

Keywords: Chitinase; Plant defense; Agglutinin; *Arabidopsis thaliana*; *Manihot esculenta*; *Phytomonas françai*

1. Introduction

The empty root is a disease associated with *Phytomonas françai*, a parasite flagellate of the family Trypanosomatidae. It was observed affecting certain cultivars of cassava (*Manihot esculenta*) in the Espírito Santo state of Brazil [1,2]. Usually, the roots of affected plants remain small and slender, containing little or no starch. The above-ground parts of infected plants show chlorosis and decline. The empty root disease can be transmitted by grafting and/or by insect vectors of the *Lincus* or *Ochlerus* genera (Hemiptera Pentatomidae). Diseased plants contain numerous *Phytomonas* in the lacifer ducts but not in the phloem [1]. Another member of the genus (*Phytomonas staheli*) has become one of the most serious pathogens of oil palm and coconut crops in South America. The control

of such diseases has been limited to the elimination of affected plants and the bug responsible for the transmission (*Lincus* sp). This treatment is based on the use of organochlorines that have dangerous cumulative effects and concentrate along the food chains. Its employ in agriculture is therefore forbidden in most of the countries where the disease is rife [3]. Chitin is an important structural component of the cell wall of fungi and of the exoskeleton of many invertebrates, such as insects and nematodes. It has also been demonstrated that the *P. françai* presents chitin exposed in the membrane surface [4]. In this work the authors characterized chitin by its insolubility in hot alkali and chromatographic immobility, as well as by the release of glucosamine on hydrolysis with strong acid and of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) on hydrolysis with chitinase. The presence of chitin was also shown directly by binding of wheat-germ agglutinin (WGA) [4]. Chitin is also present as a structural component of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* [5] and in the cyst wall of *Entamoeba* [6,7]. Chitin may be important in the maintenance of cell integrity by providing protection from mechanical and chemical environmental stress.

* Corresponding author. Tel.: +55 (21) 2562 6380;
Fax: +55 (21) 2590 0111.
E-mail address: alvesfer@biologia.ufrj.br (M. Alves-Ferreira).

Chitinases alone, or acting synergistically with glucanases, can inhibit fungal growth in vitro or in vivo when over-expressed in transgenic plants [8–10]. Two proteins with distinct characteristics of this group might be used against trypanosomatids: the *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and the *Arabidopsis thaliana Chia4* (ATCHIT4). Stinging nettle lectin or UDA is a single-chain protein containing two homologous chitin-binding domains [11,12], which independently bind to *N,N',N''*-triacetylchitotriose or larger oligomers [13,14]. UDA is present in stems and in the outer exodermis cell layer of roots, but it is absent from leaves [12,15,16]. UDA possesses both antifungal and insecticidal activities [15,17]. It exhibits growth-inhibiting activities against several plant pathogenic fungi, which contain chitin in their cell walls [15]. UdaI cDNA comprises an N-terminal signal peptide, two chitin-binding domains, a small hinge region, and a C-terminal chitinase domain [18,19]. The signal peptide, the hinge region, as well as the chitinase domain are processed from the precursor to yield mature UDA. Because of the presence of two chitin-binding domains and the homology of the chitinase domains with the other plant chitinases (45% identity with chitinase domains of plant class I chitinases), the precursor to UDA was classified as a *Chia5* chitinase [20,21].

ATCHIT4 protein contains an N-terminal signal peptide, one chitin-binding domain and one C-terminal chitinase domain separated by a hinge region. Deletions in the catalytic domain, characteristic of all *Chia4* chitinases, are also present. The specific physiological role of ATCHIT4 remains unclear. Apparently, ATCHIT4 is involved in both plant–pathogen interaction and embryo development [22]. ATCHIT4 transcripts are detected in seedpods, but not in roots, inflorescence stems, leaves or flowers of healthy plants. However, analysis of ATCHIT4 transcripts expression showed that this chitinase is involved in a rapid defense response to bacteria, wounding, UV light and salicylic acid treatment [23].

The aim of this work was to characterize the effect of these two plant chitinases against the pathogenic trypanosomatid *P. françai*. For this purpose we over-expressed in *Escherichia coli* the ATCHIT4 and UDA chitinases fused to maltose-binding protein – MBP. We show that both protein fusions interacted with surface carbohydrate residues and were able to trim chitin present on the surface of *P. françai*.

2. Materials and methods

2.1. Cloning procedures, production and purification of fusion proteins

The cDNAs of ATCHIT4 and UdaI were introduced into the polylinker of vector pMAL-2c, downstream from the MalE gene of *E. coli*, resulting in expression of

the target gene product as a fusion to MBP, a water-soluble protein with a molecular mass of 42.7 kDa. The molecular masses of MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 are 82.5 and 72.5 kDa, respectively. Expression of the fusion proteins was induced by growing the bacteria BL21 for further 4 h in the presence of IPTG (isopropylthio- β -galactoside – final concentration 0.0003 mM). After this time, the cells were harvested by centrifugation ($4000 \times g$ for 10 min), and re-suspended in STE buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0) containing 0.1 mg ml^{-1} lysozyme, and incubated on ice for 2 h. Dithiothreitol (final concentration 5 mM) and *N*-laurylsarcosinate (sarcosyl – final concentration 0.5%) were then added [24]. The cells were lysed by cycles of quick freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C. The lysate was centrifuged at $12\,000 \times g$ for 30 min. The supernatant was centrifuged once more at $12\,000 \times g$ for 30 min to minimize clogging of the amylose resin column and Triton X-100 (final concentration 1.5%) was added. An enriched fraction was then obtained through affinity chromatography onto amylose resin, according to the manufacturer's specification (Protein Fusion and Purification System – BioLabs). Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid Protein Assay Reagent kit (Pierce). Purity of the fusion protein was checked by 7.5% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Protein bands were visualized with Coomassie brilliant blue R-250.

Trypsin ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$, 37°C; 1.30 h) was used for cleavage of MBP-UDA. Reaction was stopped by the addition of leupeptin to a final concentration of 1 mM. The samples were analyzed by SDS–PAGE. After cleavage, the UDA protein was purified using affinity chromatography onto amylose resin.

2.2. Chitinase assay

For quantitative assays of chitinase activity, measurements were carried out using chitin (Sigma) as a substrate as described [8,25]. For qualitative assays, the chitinase activity was detected using SDS–PAGE in combination with glycol chitin substrate [26].

2.3. Microorganism

P. françai was maintained by weekly transfer [27]. For the experiments, the cells were grown in Warren's complex medium (37 g l^{-1} brain heart infusion, 10 mg ml^{-1} folic acid and 10 mg ml^{-1} hemin). After 96 h of incubation, the cells were collected by centrifugation ($2000 \times g$) for 10 min at 4°C, and were washed three times in 0.01 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2).

2.4. Binding analysis of protein fusions and *P. françai*

For the experiments, $25 \mu\text{l}$ of PBS containing 1×10^7 protozoa ml^{-1} was placed on a glass slide, air-dried, and

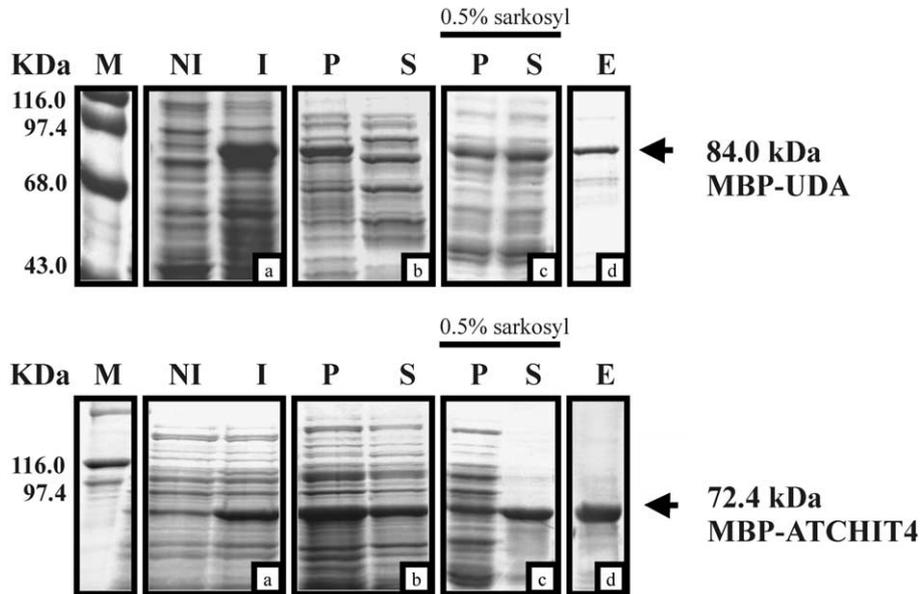


Fig. 1. SDS-PAGE (7.5% acrylamide) analysis: expression and solubilization of MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 fusion proteins. a: Comparison of IPTG-induced *E. coli* clones harboring cDNAs of *uda* or *atchit4*. Cells were harvested just before induction with 0.3 mM IPTG (NI) and 4 h after induction (I). b: Solubilization analysis of the MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 fusion proteins using lysozyme and the freeze–defreeze method. c: Solubilization of the MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 fusion proteins using lysozyme, Sarkosyl and the freeze–defreeze method. After the freeze–defreeze method, the lysate was subjected to centrifugation. d: The proteins MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 were purified by affinity chromatography onto amylose resin after lysis of bacteria. Samples taken of supernatant (S) and insoluble pellets (P). The lane M shows prestained marker with the molecular masses indicated. E, eluate.

fixed in methanol for 10 min at room temperature. Slides were pre-incubated in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h, and then incubated for 1 h at 4°C in a moist chamber in PBS with: 20 µg ml⁻¹ of MBP-UDA, MBP-ATCHIT4 or MBP proteins. As a control for the proteins, cells were incubated with equal volumes of PBS. The slides were washed three times with PBS, incubated first with 25 µl of anti-MBP antibodies for 1 h, and then with PBS containing 1% BSA for 1 h. After that, the slides were incubated with 20 µl of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-rabbit IgG (Sigma) at a concentration of 100 µg ml⁻¹ for 1 h at room temperature. The slides were then washed in PBS, and examined under a fluorescence microscope with standard filter for observing fluorescence from fluorescein (Zeiss Axioplan equipped with epifluorescence).

2.5. FITC/WGA-binding studies

Slides were prepared as described above, and incubated in a moist chamber with any one of the following proteins dissolved in PBS in a final concentration of: 5 µg of chitinase from *Streptomyces griseus* (5 mU – Sigma); 5 µg, 10 µg or 20 µg of MBP-UDA, MBP-ATCHIT4, UDA or MBP proteins, for 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h at 4°C. Control cells were incubated with equal volumes of PBS for similar periods. The slides were washed twice with PBS and incubated with 15 µl of FITC-labeled WGA (Sigma) at a concentration of 0.1 µg ml⁻¹ for 1 h at room temperature. The slides were then washed in PBS, and examined

under a fluorescence microscope with standard filter for observing fluorescence from fluorescein (Zeiss Axioplan equipped with epifluorescence).

2.6. FACS (fluorescent-activated cell sorter) analysis

The protozoa were collected by centrifugation (2000 × g) for 10 min at 4°C, and washed three times in PBS. Cells were fixed in 4% formaldehyde for 30 min at room temperature, washed three times in PBS and re-suspended in 1% BSA in PBS. Experiments were performed with 1 × 10⁷ protozoa ml⁻¹ in PBS incubated with MBP-UDA, MBP-ATCHIT4, UDA or MBP proteins at a final concentration of 20 µg ml⁻¹ for 48 h and 72 h at 37°C. *S. griseus* chitinase was used as positive control. Residues of *N*-acetyl-D-glucosamine on the cell surface of *Phytomonas* were labeled by FITC WGA (Sigma) at a concentration of 10 µg ml⁻¹ for 1 h at room temperature. The cells were washed and re-suspended in PBS. Flow cytometry of *P. francai* treated with proteins was performed on a dual beam instrument (Coulter EPICS® Elite). Positive or negative staining with FITC-WGA was defined as the emission of a level of fluorescence that exceeded or did not exceed, respectively, levels obtained by 99% of the cells from the same starting population when these were incubated only with PBS. Data were analyzed using WinMDI software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Fluorescence levels derived from the FACS analysis were plotted versus cell number.

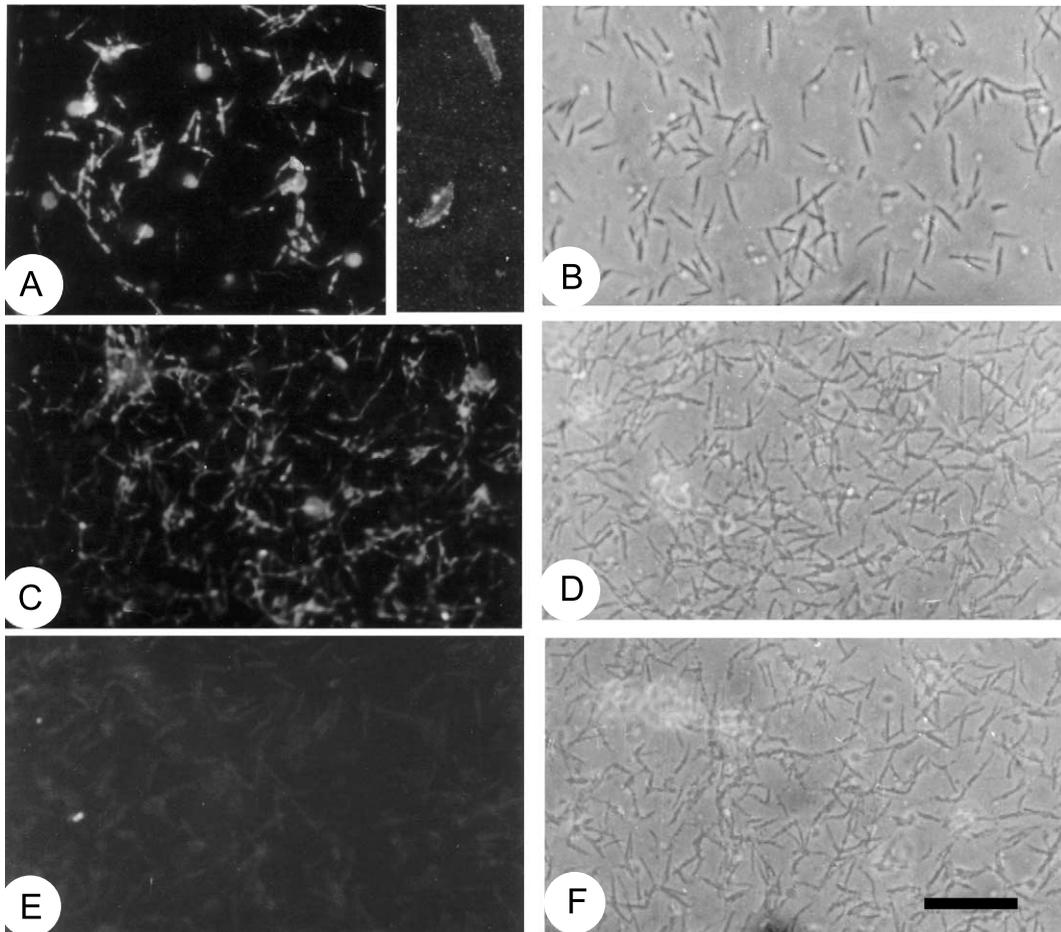


Fig. 2. Binding of MBP-UDA, MBP-ATCHIT4 and MBP to the cell surface of *P. fraga*. Cells were incubated for 1 h with MBP-ATCHIT4 (A), MBP-UDA (C) and MBP (E) proteins and then anti-MBP antibodies were used for the immunolabeling. Visualization was performed using FITC-labeled anti-rabbit IgG. For MBP no labeling was observed. B, D and F: phase-contrast of the same fields shown in A, C and E, respectively. Bar equals 30 μm .

3. Results

3.1. Over-expression and purification of MBP-UDA and MBP-ATCHIT4

Protein fractions analysis showed that the chimeric proteins were localized in the bacterial-insoluble fractions. A standard protocol associated with a sarcosyl and Triton X-100 treatment was used to solubilize the chimeric MBP-ATCHIT4 and MBP-UDA proteins (Fig. 1, top) [24]. An enriched fraction was then obtained after affinity chromatography onto amylose resin (Fig. 1, bottom).

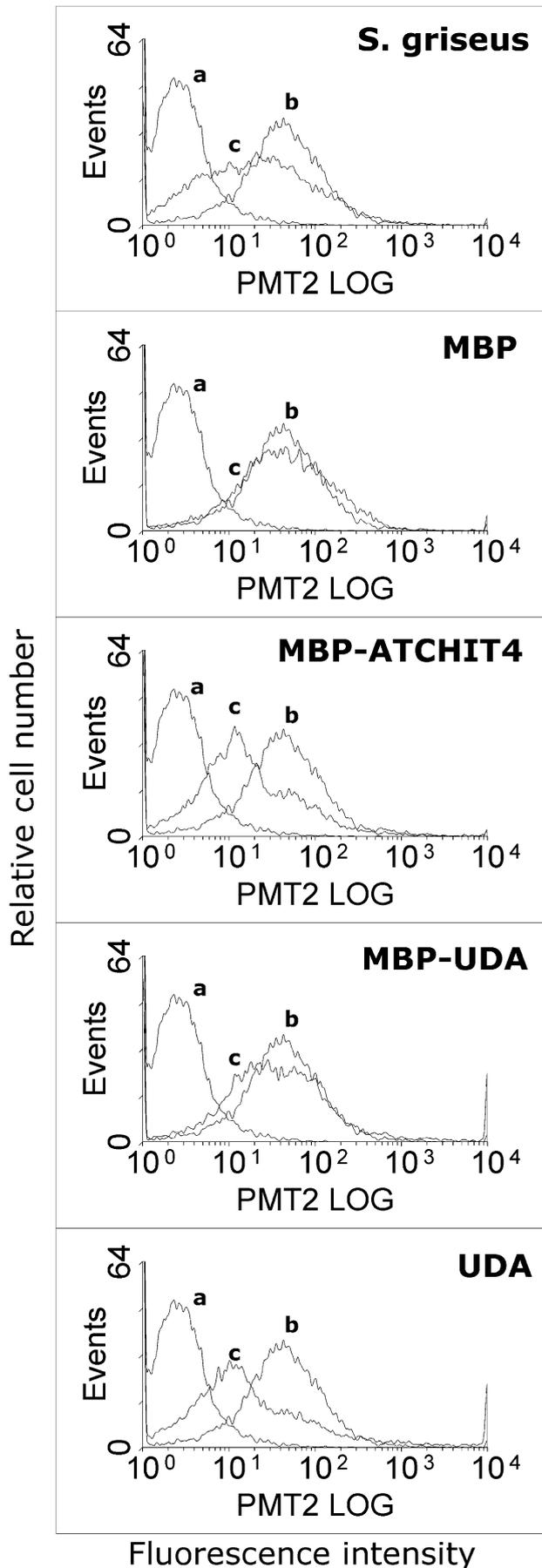
3.2. Functional analysis of the chimeric MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 proteins

Colorimetric assay using chitin as substrate demonstrated that the chimeric MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 displayed chitinase activity. The chitinase activities of MBP-UDA and of MBP-ATCHIT4 were approximately 10–15-fold lower than that of *S. griseus* chitinase. To obtain 1 mU of chitinase activity 2.5 μg , 25.8 μg and 37.7 μg

of *S. griseus* chitinase, MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 are necessary, respectively. Using SDS-PAGE in combination with glycol chitin 0.01% substrate we observed that over-expressed UDA without MBP protein also displays chitinase activity (data not shown). Lysis zones were visualized by UV illumination as non-fluorescent dark bands corresponding to the localization of the UDA in SDS-PAGE in contrast to the fluorescent intact glycol chitin. No lysis zone was observed when MBP protein was used (data not shown).

Immunolabeling assays were performed to check the binding competence of the chimeric proteins to the cell surface of *P. fraga*. After incubation with the chimeric proteins, the cells were incubated with antibodies against MBP protein. These antibodies were obtained from rabbits by inoculation with MBP (LGMV, Departamento de Genética, UFRJ). The cells were finally incubated with FITC-labeled anti-rabbit IgG (Sigma) and were seen by fluorescence microscopy.

Only the cells incubated with MBP-UDA or MBP-ATCHIT4 proteins were labeled. No labeling was observed when the cells were incubated with MBP protein,



indicating a specific interaction between UDA, ATCHIT4 and *P. francai* cell surface (Fig. 2).

In order to check if chimeric proteins were able to trim the chitin present on the surface of the *P. francai*, cells of this protozoan were incubated with MBP-UDA or MBP-ATCHIT4, and then with FITC-labeled WGA. The cells were seen by fluorescence microscopy. The carbohydrate specificity of WGA includes terminal sialic acid, as well as *N*-acetyl- β -D-glucosamine and its β -1,4-linked oligomers [28–30]. After 36–48 h of incubation with MBP-UDA and MBP-ATCHIT4, the fluorescent labeling on the *Phytomonas* cell surface was dramatically reduced compared to that of the controls, indicating a chitinase activity against *P. francai* (data not shown).

FACS analysis of the interaction between chimeric proteins and surface carbohydrate residues of *P. francai* corroborated the microscopic analysis. *P. francai* treated with chimeric proteins for 48 or 72 h, before incubation in FITC-labeled WGA for 1 h, were screened by FACS to isolate cells that bind to FITC-labeled WGA with high affinity. Purified MBP and commercial *S. griseus* chitinase were used as negative and positive controls, respectively. The initial analysis showed that MBP-UDA had lower chitinase activity when compared with the MBP-ATCHIT4. In order to make sure that the UDA chitinase activity had not been inhibited by the presence of MBP protein in the chimeric fusion, MBP was removed from recombinant UDA by trypsin digestion. The purified UDA protein was more effective on the surface of *P. francai*, when compared with MBP-UDA protein (Fig. 3).

4. Discussion

Several experiments have shown the importance of chitinases as defense mechanisms against pathogenic attacks. Their effects on fungi have been well characterized [31–35], but no information was available about the activity of plant chitinase against protozoa. We have shown for the first time that two plant chitinases (ATCHIT4 and UDA) can bind to the cell surface and trim chitin present in a phytopathogenic protozoan, suggesting that plant chitinases may represent a defense mechanism against protozoa attacks in addition to their role against fungal and bacterial infection. However, further studies are necessary to completely understand the mechanisms of plant resistance to phytoprotozoan.

In the present work, we over-expressed UDA and

←

Fig. 3. FACS analysis of the interaction between proteins and surface carbohydrate residues of *P. francai*. Flow cytometric analysis of *P. francai* cells labeled with FITC WGA after treatment with *S. griseus*, MBP, MBP-ATCHIT4, MBP-UDA and UDA proteins for 48 h. Auto-fluorescence inherent to parasites (a); incubation of untreated (b) and protein-treated (c) *Phytomonas*.

ATCHIT4 proteins fused with MBP in *E. coli*. Both chimeric proteins show a lower level of chitinase activity, when compared with commercial chitinase from *S. griseus*. Some factors can be responsible for this low level of chitinase activity: an inadequate folding of the protein during the translation in *E. coli* cytoplasm or in the refolding step through the protein purification, or the use of an inappropriate substrate in the chitinase assay. The presence of MBP protein fused to the chitinases can also be responsible for altering the proteins three-dimensional structure and/or hiding catalytic sites inhibiting the chitinase activity. This outcome was observed when it was compared to the ability of UDA and MBP-UDA to trim chitin on the cell surface of *P. françai*. The UDA protein presented a more pronounced effect on the protozoa when compared with MBP-UDA. As mentioned before, the presence of MBP could explain the lower level of chitinase activity observed in MBP-UDA. However, the binding activity of the chimeric MBP-UDA protein to chitin was not hindered by the presence of MBP. The chimeric protein MBP-ATCHIT4 presents a higher level of activity when compared with MBP-UDA and UDA.

The MBP-UDA and MBP-ATCHIT4 proteins are capable of recognizing and binding to the surface of *Phytomonas*. This effect is not related to MBP because this protein does not bind or trim chitin residues (Figs. 2 and 3). After 1 h of incubation, the chimeric proteins were observed coupled to the *Phytomonas* surface (Fig. 2). When chitinase assay was performed with *Phytomonas* throughout different incubation periods, fluorescence loss increased through time. This observation indicates that the chimeric proteins bind to the surface of *Phytomonas* and their chitinase activity triggers the removal of chitin from the cell surface by progressive trimming. The fluorescent intensity quantification by FACS further supported the fluorescent microscopy analysis.

ATCHIT4 gene was previously characterized by our laboratory [22] and others [23], although no functional assay was performed. We have shown at this time that the ATCHIT4 protein presents chitinase activity. It has been suggested that ATCHIT4 is involved in plant protection and also in embryo development [22]. Ponstein et al. [34] also reported that tobacco chitinase of class IV presents antifungal activity by causing in vitro growth inhibition of *Trichoderma viride* and *Fusarium solani*, by causing lysis of the germ tubes and/or growth inhibition.

Regardless of the genus *Phytomonas* being the causal agent of diseases affecting plants of economic importance, very little attention has been assigned to understand its interaction with plants.

To our knowledge, this is the first report demonstrating the interaction between plant chitinases and chitin chains present in the cell wall of a phytoprotozoan, namely *P. françai*. The identification of plant proteins with activity against *Phytomonas* phytopathogens can provide important clues to understand the interaction between

plant/protozoa and to develop strategies to improve plant resistance against this class of pathogens.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Apoio à Pesquisa (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação José Bonifácio (FUJB). We thank Pedro Persechini for the use of the flow cytometer, Dr. Natasha Raikhel for kindly providing the cDNA *uda1* and Adriana Flores Fusaro for kindly providing the anti-MBP antibodies. We also thank Dr. Celso Vataru Nakamura and Dr. Antônio Solé-Cava for having critically reviewed earlier drafts.

References

- [1] Agrios, G.N. (1997) Plant diseases caused by flagellate protozoa. In: Plant Pathology 4th edn., 16, pp. 599–606. Academic Press, New York.
- [2] Kitajima, E.W., Vainstein, M.H. and Silveira, J.S.M. (1986) Flagellate protozoan associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo State, Brazil. *Phytopathology* 76, 638–642.
- [3] Louise, C., Dollet, M. and Mariau, D. (1986) Research into hartrot coconut, a disease caused by *Phytomonas* (*Trypanosomatidae*), and into its vector *Lincus sp.* (*Pentatomidae*) in Guiana. *Oléagineux* 10, 437–449.
- [4] Nakamura, C.V., Esteves, M.J.G., Andrade, A.F.B., Alviano, C.S., Souza, W. and Angluster, J. (1993) Chitin: a cell-surface component of *Phytomonas françai*. *Parasitol. Res.* 79, 523–526.
- [5] Kneipp, L.F., Andrade, A.F.B., de Souza, W., Angluster, J., Alviano, C.S. and Travassos, L.R. (1998) *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: Expression of chitin at the cell surface. *Exp. Parasitol.* 89, 195–204.
- [6] Arroyo-Begovich, A. and Carabez-Trejo, A. (1982) Location of chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J. Parasitol.* 68, 253–258.
- [7] Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A. and Ruiz-Herrera, J. (1980) Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J. Parasitol.* 66, 735–741.
- [8] Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vögeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22–31.
- [9] Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J. and Broglie, R. (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194–1197.
- [10] Zhu, Q., Maher, E.A., Massoud, S., Dixon, R.A. and Lamb, C.J. (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio-Technology* 12, 807–812.
- [11] Beintema, J.J. and Peumans, W.J. (1992) The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin: a two-domain member of the hevein family. *FEBS Lett.* 299, 131–134.
- [12] Peumans, W.J., De Ley, M. and Broekaert, W.F. (1984) An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Lett.* 177, 99–103.
- [13] Hom, K., Gochin, M., Peumans, W.J. and Shine, N. (1995) Ligand-induced perturbations in *Urtica dioica* agglutinin. *FEBS Lett.* 361, 157–161.

- [14] Shibuya, N., Goldstein, I.J., Shaper, J.A., Peumans, W.J. and Broekaert, W.F. (1986) Carbohydrate binding properties of stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin. Arch. Biochem. Biophys. 249, 215–224.
- [15] Broekaert, W.F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. and Peumans, W.J. (1989) A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. Science 245, 1100–1102.
- [16] Van Damme, E.J.M. and Peumans, W.J. (1987) Isolectin composition of individual clones of *Urtica dioica*: evidence for phenotypic differences. Physiol. Plant. 71, 328–334.
- [17] Huesing, J.E., Murdock, L.L. and Shade, R.E. (1991) Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. Phytochemistry 30, 3565–3568.
- [18] Does, M.P. and Cornelissen, B.J.C. (1999) A chimera of *Urtica dioica* agglutinin and tobacco chitinase displays both agglutination and chitinase activity. Plant Sci. 148, 121–129.
- [19] Lerner, D.R. and Raikhel, N.V. (1992) The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. J. Biol. Chem. 267, 11085–11091.
- [20] Meins Jr., F., Fritig, B., Linthorst, H.J.M., Mikkelsen, J.D., Neuhaus, J.-M. and Ryals, J. (1994) Plant chitinase genes. Plant Mol. Biol. Rep. 12, S22–S28.
- [21] Neuhaus, J.-M., Fritig, B., Linthorst, H.J.M., Meins, F., Mikkelsen, J.D. and Ryals, J. (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. Plant Mol. Biol. Rep. 14, 102–104.
- [22] de Gerhardt, L.B.A., Sachetto-Martins, G., Contarini, M.G., Sandroni, M., Ferreira, R.P., Lima, V.M., Cordeiro, M.C., Oliveira, D.E. and Margis-Pinheiro, M. (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. FEBS Lett. 419, 69–75.
- [23] Passarinho, P.A., Van Hengel, A.J., Fransz, P.F. and de Vries, S.C. (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. Planta 212, 556–567.
- [24] Frangioni, J.V. and Neel, B.N. (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (Pgex) fusion proteins. Anal. Biochem. 210, 179–187.
- [25] Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, I.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217, 959–966.
- [26] Trudel, J. and Asselin, A. (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 178, 352–366.
- [27] Nakamura, C.V., Esteves, M.J.G., Andrade, A.F.B., Alviano, C.S., De Souza, W. and Angluster, J. (1992) Cell surface saccharides in three *Phytomonas* species differing in host specificity. J. Protozool. 39, 303–309.
- [28] Allen, A., Neuberger, A. and Sharon, N. (1973) The purification and specificity of wheat-germ agglutinin. Biochem. J. 131, 155–162.
- [29] Goldstein, I.J., Hammarstrom, S. and Sundblad, G. (1975) Precipitation and carbohydrate-binding specificity studies on wheat germ agglutinin. Biochim. Biophys. Acta 405, 53–61.
- [30] Peters, B.P., Ebisu, S., Goldstein, I.J. and Flashner, M. (1979) Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. Biochemistry 18, 5505–5511.
- [31] Broekaert, W.F., Van Parijs, J., Allen, A.K. and Peumans, W.J. (1988) Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33, 319–331.
- [32] Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinases and β -1,3-glucanase. Plant Physiol. 88, 936–942.
- [33] Melchers, L.S., Sela-Buurlage, M.B., Vloemans, S.A., Woloshuk, C.P., Van Roekel, J.S.C., Pen, J., Van den Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. (1993) Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. Plant Mol. Biol. 21, 583–593.
- [34] Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Sela-Buurlage, M.B., Van Den Elzen, P.J.M., Melchers, L.S. and Cornelissen, B.J.C. (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotina tabacum*) protein with antifungal activity. Plant Physiol. 104, 109–118.
- [35] Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. and Boller, T. (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Nature 324, 265–267.

Anexo II

Artigo aceito para publicação

Genetics and Molecular Biology

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736.

14025-670 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Fone/Fax: 55 16 621-8540

E-mail: gmb.editor@sbg.org.br

Ribeirão Preto, 17 de março de 2005.

Suplemento Especial FOREST

**Ref.: MS2004/407 - IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
HOMEBOX GENES IN EUCALYPTUS**

Prezado Dr. Márcio,

Temos o prazer de informar que seu trabalho acima referenciado foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Biology*.

Como norma da revista, o manuscrito está sendo enviado para uma revisão do texto em inglês, sem ônus para os autores. Essa versão lhe será submetida para revisão final.

Agradecemos sua participação em nossa revista.

Atenciosamente,



Fábio de Melo Sene
Editor

Genetics and Molecular Biology

editor@gmb.org.br

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HOMEBOX GENES IN EUCALYPTUS

Graça Celeste Gomes Rocha^{1,2}, Régis Lopes Corrêa^{1,3}, Anna Cristina Neves Borges²,
Claudio Bustamante Pereira de Sá⁴, Márcio Alves-Ferreira^{2,*}

¹ Both these authors contributed equally to the article

² Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³ Laboratório de Virologia Molecular Vegetal, Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Coordenação de Estatísticas Agropecuárias, Diretoria de Pesquisas, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* Corresponding author: Márcio Alves-Ferreira. E-mail address: alvesfer@biologia.ufrj.br.
Tel: +55 (21) 2562 6380; Fax: +55 (21) 2562-6335

Short title: *Homeobox Gene Family in Eucalyptus*

Keywords: plant development, abiotic stress, eucalyptus, FORESTs, phylogenetic analysis.

Marcio Alves-Ferreira

Departamento de Genética

Lab. Genética Molecular Vegetal

Sala A2 76 - CCS - UFRJ

Cidade Universitária - Ilha do Fundão

21944-970 - Rio de Janeiro - RJ - BRAZIL

Tel: 55 21 2562 6380 Fax: 55 21 2590 0111

email: alvesfer@biologia.ufrj.br

ABSTRACT

Homeobox genes encode transcriptional factors, usually involved in molecular control of plant developmental patterns. They can be divided into several classes according to conserved sequences within the homeobox region and the presence of specific additional sequences. Based on these conserved sequences, we developed a search procedure to identify possible homeobox genes in the *Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium* (FORESTs) database. We were able to identify 50 eucalyptus sequences (EST-contigs) containing the homeodomain sequence. Phylogenetic analysis was applied to these ESTs-contigs and 44 of them were found to have similarities with one of three well-known homeobox classes: *Bell*, *Knox* and *HD-Zip*, and their sub-classes. However, no EST-contig grouped with the fourth important homeobox class, the *PHD*-finger homeobox. On the other hand, two sequences had shown pronounced similarity to the *Arabidopsis thaliana Wuschel* gene, considered an "atypical" homeobox gene. Hierarchical clustering analysis of the expression pattern of these putative eucalyptus homeobox genes revealed the presence of ten distinct expression groups. Combining phylogenetic analysis and expression patterns for some of the eucalyptus genes revealed interesting aspects about some of the potential homeobox genes, which might lead to a better understanding of the eucalyptus biology and to biotechnological applications.

INTRODUCTION

The homeobox is a semi-conserved sequence motif of about 180 base pairs, which was first found in morphogenesis controlling genes of *Drosophila melanogaster*. Homeobox sequences encode 60 amino acid sequences, collectively referred as the homeodomain, which is highly conserved among animal, fungal, and plant proteins. The homeodomain sequences fold into a characteristic DNA-binding structure, composed of three α -helices separated by a loop and a turn (Gehring, 1987; Laughon, 1991; Scott *et al.*, 1989). Homeodomain-containing proteins are basically transcription factors that control many developmental processes and other cellular mechanisms, such as positional information, spatial patterning, cell fate determination and cell differentiation (Lawrence and Morata, 1994).

In plants, homeobox genes are involved in a variety of functions, including developmental programs and response to stress. They are usually divided into four main classes, namely *Knox*, *Bell*, *PHD-finger* and *HD-Zip*, based on some conserved features inside the homeodomain sequence, as well as on the presence of additional sequences outside the domain (Kerstetter *et al.*, 1994). Members of each class show characteristic structural and functional properties and can be further grouped into sub-classes or families (Sessa *et al.*, 1998).

Most of the members of the *Knox* (*Knotted1*-like) gene class are associated with the maintenance and growth of the shoot meristems (Bowman and Eshed, 2000). *Knox* genes harbor a second conserved region just upstream of the homeodomain, the ELK domain, the basis on which they may be classified in two families: *Knox I* and *Knox II* genes (Bharathan *et al.*, 1999). *Knox I* genes, such as *knotted-1* (*kn1*) and *shootmeristemless* (*STM*), are preferentially expressed in shoot and floral meristems (Reiser *et al.*, 2000), while *Knox II* genes seem to have much wider expression domains.

In the *Bell* class genes, the homeodomain is located within the C-terminal third of the protein (Reiser *et al.*, 1995). They usually show regions rich in serine/threonine and proline outside the homeodomain (Quaedvlieg *et al.*, 1995), which may function as transcription-activating domains. The *Bell1* and *ATH1* are examples of *Bell* class genes. They are required for integument development and signal transduction during photomorphogenesis, respectively (Quaedvlieg *et al.*, 1995).

Proteins encoded by both *Knox* and *Bell* genes present a three-amino acid extension in the loop connecting the first and second helices of the homeodomain (Bürglin, 1997). They are thus classified in the TALE (Three Amino acid Loop Extension) super-class (Chan *et al.*, 1998; Bellaoui *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2002).

The Plant Homeodomain (*PHD*) finger genes encode proteins containing a Cys4-His-Cys3 motif, which is thought to bind two zinc ions, even though the space between

the cysteine/histidine residues may be too variable (Aasland *et al.*, 1995). They are frequently associated with chromatin-mediated transcriptional regulation, as in the case of the *Arabidopsis* Pathogenesis-related homeodomain protein (*PRHA*), which regulates elicitor-mediated expression of the parsley pathogenesis-related protein 2 gene (*PR2*) (Korfhage *et al.*, 1994).

The Homeodomain-leucine zipper (*HD-Zip*) gene class encodes to proteins in which the homeodomain is closely associated with a leucine zipper (Sчена and Davis, 1992, 1994). They are separated into four different families (*HD-Zip I, II, III* and *IV*) depending on specific differences of the leucine zipper motif (Chan *et al.*, 1998; Aso *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2001; Ageez *et al.*, 2003). This kind of homeodomain organization is present only in plants and it is speculated that *HD-Zip* genes originated in plant lineage by exon exchange between a homeodomain gene and a leucine zipper containing sequence (Sчена and Davis, 1992). Proteins belonging to *HD-Zip I* and *II* classes are very similar with respect to the architecture of the *HD-Zip* domain (Sessa *et al.*, 1993). On the other hand, *HD-Zip III* proteins present an insertion of four amino acids both between helix 2 and 3 of the homeodomain and between helix 3 and the leucine zipper domain (Baima *et al.*, 1995; Sessa *et al.*, 1998), changing the spacing between the homeodomain and leucine zipper. The *HD-Zip IV* family has a leucine zipper motif separated in two sub-domains by a loop of 10 amino acid residues. Many examples of *HD-Zip* class genes are found in the well-known model plant *Arabidopsis thaliana*, performing a wide array of functions. The *ATHB-1 (HD-Zip I)* gene is associated with leaf development (Aoyama *et al.*, 1995); the *ATHB-2 (HD-Zip II)* protein probably has a role in mediating cell elongation (Carabelli *et al.*, 1996); the *ATHB-8 (HD-Zip III)* protein acts in the differentiation of the vascular system (Baima *et al.*, 1995) and the *ATHB-10 (HD-zip IV)* regulates trichome development and suppresses root hair formation (Di Cristina *et al.*, 1996).

Finally, there are a number of genes that have been recognized as having the homeodomain motif which do not fit in any of these main classes. Examples include the atypical homeobox *Wuschel* gene from *A. thaliana* which is essential for shoot apical meristem formation and maintenance (Mayer *et al.*, 1998).

In this work we searched for potential homeobox genes in the *Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium* (FORESTs) database and used phylogenetic methods to classify those among these well-established groups. We were able to identify 50 high quality assemblies of homeobox genes after an extensive search on the FOREST database. To better understand homeobox gene expression at plant system level and to identify differentially expressed and tissue-specific genes, we conducted a digital expression analysis. By clustering genes according to their relative abundance in the various EST libraries, expression patterns of genes across various tissues were generated

and genes with similar patterns were grouped. This information can be useful in devising strategies for the biotechnological improvement of eucalyptus trees for industrial use and may assist in the study of homeobox in other plant species.

MATERIAL AND METHODS

Databases and procedures for searching eucalyptus homeobox sequences

The primary data used in this work were the so-called EST-contigs sequences, from the FORESTs project database. In the FORESTs project, they have been assembled from approximately 130,000 ESTs obtained in the sequencing of 19 eucalyptus cDNA libraries, corresponding to different tissues and physiological states (Detailed information on cDNA libraries, sequencing, clustering and other features of the FORESTs project may be found in <https://forests.esalq.usp.br/>). Besides eucalyptus EST-contigs, *Arabidopsis thaliana* homeobox sequences, obtained from The National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and from The Institute for Genomic Resources (TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>), were used for comparison.

In any single FORESTs database search, just one target amino acid sequence was compared to all EST-contigs nucleotide sequences in all six frames. This was done with the tBLASTn algorithm (Altschul *et al.*, 1997) implemented in the FORESTs system. In the first search, the target amino-acid sequence was a consensus homeodomain sequence (qrcqyvvgreREELAKQLNLTERQVKVWFQNRRAKxKKdqsrdlekra) generated by the COBBLER program (Henikoff and Henikoff, 1997). The searches were conducted using the TBLASTX algorithm (Altschul *et al.*, 1997) with the BLOSUM60 scoring matrix. Sequences with significant similarity to the COBBLER consensus (E-value of 10^{-5}) were retrieved from the database and were screened for the presence of homeodomain using the InterProScan (Apweiler *et al.*, 2001) and PRODOM (Servant *et al.*, 2002) programs. Sequences that met these criteria were then used as target amino-acid sequences in new searches against the FORESTs database to locate further potential homeobox sequences. In this new round full EST-contigs were the target sequences, and the searches were conducted using the TBLASTX algorithm with the BLOSUM80 scoring matrix. Newly found EST-contigs harboring significant similarity (again E-value of 10^{-5}) to any of the previously found were also investigated using InterProScan and PRODOM programs. This procedure was repeated until no new contigs were found. Finally, sequences from each selected EST-contig were used for BLAST search against Genbank in order to verify its closest sequence deposited in the world data bank.

Phylogenetic and expression analyses

To classify the selected EST-contigs, we first performed a multiple alignment of their homeodomain region using the CLUSTALW program (Higgins *et al.*, 1994). Phylogenetic analysis was conducted using the MEGA 2.1 software (Kumar *et al.*, 2001). Among the various options available, we chose the Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987), derived from a p-distance matrix, and the pair-wise deletion option was adopted, excluding amino acid gaps from the sequence alignment.

The expression analysis used the so-called 'digital northern blot' (Carraro *et al.*, 2001; Lambais, 2001) to represent the expression profile of the potential homeobox genes and to identify differential expression among the diverse eucalyptus tissues/treatments used in the FORESTs project. In this approach, the frequency of reads for each EST-contig in each selected library is computed and then normalized with respect to the number of reads in the library and to the total number of reads in all libraries. The obtained values form a matrix relating contigs and libraries. We then used the Cluster and Tree View programs (Eisen *et al.*, 1998) to determine similarity in gene expression patterns among EST-contigs and among libraries. In both cases, aggregation was made by hierarchical clustering, based on Spearman Rank correlation matrix, and substituting formed clusters by their average pattern. Digital blot matrix was ordered, according to similarities in the patterns of gene expression and displayed as an array, where the normalized number of reads for each EST-contig in each specific library is represented in gray scale.

RESULTS AND DISCUSSION

FORESTs database searches

In order to search for homeobox genes in the Eucalyptus transcriptome, a consensus homeodomain sequence was generated by the COBBLER program and used to screen the FORESTs dataset. The first round of searches in the FORESTs database, using the COBBLER consensus sequence, selected a total of 2336 putative homeobox EST-contigs, but only forty-three were found to have the homeodomain in the inspection using InterProScan and PRODOM programs.

Each of these forty-three ESTs-contigs were used to perform the second round of searches in the FORESTs database in which we found seven additional putative eucalyptus homeobox sequences. An additional search was done using the conserved sequences outside of the homeodomain of the families HD-Zip, Knox, Bell and PHD-finger but no additional EST-contig was found. A total of 50 EST-contigs were found to contain the homeodomain region in the FORESTs database and, considering the extensive searches and distinct methodologies used, we judge that this should be very close to the actual number of homeobox sequences present in the FORESTs database.

Phylogenetics analysis

To be able to identify the phylogenetic groups based on the homeodomain regions of the fifty sequences from the FORESTs database, we aligned and clustered them together with nine *A. thaliana* homeobox genes, whose genetic, biochemical and taxonomic data have been extensively studied in the literature. Those insertions did not change the structure of the phylogenetic tree, since an identical tree can be obtained from the selected EST-contigs alone (data not shown). The alignment of these sequences showed the existence of the highly conserved amino acid residues, including the absolutely conserved Trp-49 and a conserved secondary structure consisting of a helix-loop-helix-turn-helix motif (Figure 1).

The phylogenetic tree shows eight statistically well-supported groups, which were named as *Bell*, *Knox I*, *Knox II*, *HD-Zip I*, *HD-Zip II*, *HD-Zip III*, *HD-Zip IV* and *Wuschel*-like, in agreement with sequence features and the presence of the *A. thaliana* "class marker" genes in each of them (Figure 2). From the 50 EST-contigs encoding to homeobox proteins present in the FOREST databank, 58% of the EST-contigs belong to the HD-Zip class, 16% to the Bell class, 14% to the Knox class and 4% has shown similarity to the unconventional homeobox gene *Wuschel*. Interestingly, our search and analysis did not identify any EST-contig of the *PHD-finger* gene family in the FORESTs

database. This result is surprising since members of PHD-finger gene family have been found in *Arabidopsis* and rice ESTs libraries. To further investigate this issue we searched the FOREST databank for EST-contigs containing a PHD-finger motif. We found 2336 EST-contigs with significant similarity to the PHD-finger COBBLER consensus (YCSVCGKPDDGGELLQCDGCDRWYHQTCCLGPPLIEEPDGKWCYCPKCK), but none of these EST-contigs encoded for homeobox proteins. The misrepresentation of PHD-finger homeobox genes may be due to their atypical sequence features. These genes usually have extremely long transcripts that might impair reverse transcription and/or subsequent cDNA cloning (Alba *et al.*, 2004).

Four of the eucalyptus EST-contigs (EGMCCL1220F10.g, EGEQSL4002E06.g, EGMCFB1096E11.g and EGBMLV3289B05.g) did not cluster to any of these well-defined groups (Figure 2). Blast search against Genbank revealed that the homeodomain region from ungrouped sequences have similarities with other uncharacterized sequences from *A. thaliana* (CAB77810 is the best hit for EGEQSL4002E06 and EGBMLV3289B05; NP_199231 for EGMCCCL1220F10 and AAF16763 for EGMCFB1096E11). To further typify these sequences, a phylogenetic analysis was performed with 97 homeobox sequences from *Arabidopsis* and sequences with significant similarities found in genbank blast search (data not shown). Our results confirmed that contigs EGMCCCL1220F10.g, EGEQSL4002E06.g, EGMCFB1096E11.g and EGBMLV3289B05.g, together with at least 15 sequences from *Arabidopsis*, present a high divergent homeodomain and, thus, were not grouped into one of the traditional plant homeobox families.

Almost all eucalyptus EST-contigs in the *Bell* class showed the conserved sequence "QVSNWFNARVR" in the C-terminal region of the homeodomain (Figure 1). This conserved sequence resulted in good statistical support of this group. *Knox* sequences also show a high level of similarity, especially in helix 3 and in the N-terminal end, and were also well supported as a monophyletic group. The two classes of *Knox* proteins were also easy to distinguish. There is strong support for the *Knox II* group, even though the evidence for *Knox I* group is weaker (Figure 2). The difference in the tightness of associations between the two *Knox* subfamilies was noted before in other plants (Bharathan *et al.*, 1999).

Knox and *Bell* homeobox sequences may be grouped into the TALE superclass. This class is characterized by three extra amino acids between homeodomain helix 1 and helix 2 (Chan *et al.*, 1998; Bellaoui *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2002). However this characteristic three amino acid insertion was not found in two eucalyptus EST-contigs classified as *Bell* (EGQHLV3278D04 and EGABST2040C11) and in one classified as *Knox* (EGCEST6032A06), probably due to incomplete sequencing (Figure 1). Although these two homeodomain families harbor specific structural similarities, our phylogenetics reconstruction revealed only weak statistical support for the TALE super class (Figure 2).

This uncertain evolutionary relationship between TALE members has already been observed in the literature (Bürglin, 1997; Becker *et al.*, 2002).

Our analysis identified twenty-nine potential *HD-Zip* genes from the FORESTs EST-contigs, among which nineteen are *HD-Zip I*, four *HD-Zip II*, three *HD-Zip III* and three *HD-Zip IV* (Figure 2). *HD-Zip I* genes were the least supported clade (53%). Analysis of the conserved amino acids among *HD-Zip* genes (Sakakibara *et al.*, 2001) showed that the *HD-Zip I* family had an evolutionary rate higher than the others after the split of the monocot and eudicot plants. It has been postulated that this higher evolutionary rate in *HD-Zip I* genes is due to the absence of strict interactions with cofactors. Because of that, phylogenetic trees often do not assign the *HD-Zip I* family to a monophyletic group (Sakakibara *et al.*, 2001). On the other hand, the *HD-Zip II*, *HD-Zip III* and *HD-Zip IV* families were highly supported as monophyletic groups (99%, 100% and 99%, respectively). The high similarity of *HD-Zip II* genes corroborates with the hypothesis that they form a specialized and recent group (Chan *et al.*, 1998). All contig sequences grouped with the *HD-Zip III* protein *REVOLUTA*, from *A. thaliana*, showed the characteristic four amino acid insertion between helix 2 and helix 3 (Figure 1).

Two eucalyptus sequences formed a monophyletic group with the *Arabidopsis Wuschel* gene (91%), and were thus called *Wuschel-like* (Figure 2). *Wuschel* have an "atypical" homeodomain sequence that is present only in plants. These "atypical" homeodomain sequences present a four amino acid insertion in the turn of the homeodomain, like *HD-Zip III* proteins. However, the *Wuschel-like* sequences has also an additional insertion of one or two amino acids in the loop region of the homeodomain (Figure 1) (Kamiya *et al.*, 2003). The two FORESTs *Wuschel-like* sequences have structural similarities with this "atypical" group of homeobox genes and may function in analogous biochemical ways (Figure 1).

Expression Pattern

It is already recognized that analysis of gene expression can be performed *in silico*, based on the frequency of sequence tags in cDNA libraries, allowing comparisons of the expression profiles of specific genes in plant tissues (Ewing *et al.*, 1999). This digital expression analysis method has advantages over the conventional microarray approaches in that the liability of the later can be reduced due to cross-hybridization of closely related sequences (Kuo *et al.*, 2002; Lipshutz *et al.*, 1999) and to the development of stable probe secondary structures (Southern *et al.*, 1999).

The Hierarchical Clustering analysis performed over this obtained expression pattern revealed the presence of ten distinct gene expression groups. For each of these

groups we assigned the name of the library for which their components are overrepresented in terms of the normalized number of ESTs (Figure 3). The groups were: dark formed *calli* (group I); dark growing seedlings with three hours of light exposition (group II); roots (group III); leaves damaged by *Thyrinteina* (group IV); stem from drought stress susceptible seedlings (groups V and VI); leaves of Phosphate/Boron deficient plants susceptible to canker and rust (group VII); dark growing seedlings (group VIII); flower buds, flowers and fruits (group IX); and wood (group X). Two of the EST-contigs (EGBGBK1047B10 and EGCCRT6012A08) were not grouped in any of these (Figure 3). Considering the normalized number of reads, we can say that the Eucalyptus homeobox genes are preferentially expressed in six libraries: Dark growing seedlings *E. urophylla* (SL6, 7.93% of total number of reads); stem from frost resistant and susceptible plants (ST7, 7.08%); stem from drought stress susceptible seedlings (ST2, 7%); leaves damaged by *Thyrinteina* for seven days (LV3, 6.67%); stem from drought stress susceptible seedlings (ST6, 6.46%); and flower buds, flowers and fruits (FB1 – 6.29%). The result observed for the libraries ST2, ST6 and FB1 is mainly due to the higher number of different EST-contigs, 16, 19 and 19 respectively. On the other hand, the libraries SL6, ST7 and LV3 have few EST-contigs, 3, 6 and 9 respectively, but they present high expression levels. The high number of reads and EST-contigs associated with abiotic stress (drought stress, frost resistance and susceptibility) suggests that eucalyptus homeobox genes may be important in stress adaptation.

The expression profiles from tissue/treatment libraries were also clustered. EST-contig collections derived from the most similar tissues typically clustered together (Figure 3). This was observed for one of the clusters (a), where all three stem libraries and the wood library are included, representing wood forming tissues. Interestingly, the library of dark growing seedlings of *E. grandis* (SL7) is also part of this cluster. The cluster (b) included almost all the rest of the libraries. The libraries (SL4, CL2, LV1 and BK1) do not have enough homeobox ESTs to sustain any correlation. The comparison of these tissue/treatments libraries did not display any consistent trend.

The gene expression groups III, V and VI (roots and plants under drought stress) showed a high number of EST-contigs whose expression is restricted to one or few libraries, indicating that these homeobox genes might be involved in distinctive aspects related to root development and drought stress adaptation. On the other hand, most of the homeobox genes belonging to group X showed a broader distribution over the libraries. This indicates that homeobox genes of the group X might be involved with more general aspects of plant physiology/development like, for instance, vascular development in different tissues.

HD-Zip genes were the type of homeobox genes most commonly found in the FORESTs database. These homeobox genes are involved in a wide range of process in

plants and are expressed in different organs and developmental stages. Their expression patterns are modified by processes causing developmental responses like light, hormones, stress and wounding (Sчена *et al.*, 1993; Aoyama *et al.*, 1995; Baima *et al.*, 1995; Carabelli *et al.*, 1996; Söderman *et al.*, 1996; Aso *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2001; Ageez *et al.*, 2003). Eucalyptus *HD-Zip I* genes were also present in almost all gene expression groups (Figure 3), but the greatest number of EST-contigs (seven out of 19) were observed in expression groups V and VI (stem from drought stress susceptible seedlings). Three *HD-Zip I* genes from *Arabidopsis* (*athb-6*, *athb-7* and *athb-12*) have their expression induced during drought stress (Söderman *et al.*, 1996; Lee and Chun, 1998), and this same expression pattern was observed for the potential eucalyptus homologous of *athb-7* (EGQHST6232C03) and *athb-12* (EGMCST2237G10 and EGCEST2224H03). The association between drought stress and the expression of those genes provides initial insights about their possible function.

The atypical homeobox *WUSCHEL* gene is essential for shoot apical meristem formation and maintenance in *A. thaliana* (Mayer *et al.*, 1998). Recently it was shown that a *WUSCHEL*-like gene is also involved in rice root apical meristem formation (Kamiya *et al.*, 2003). This contributes to the hypothesis that maintenance of shoot and root apical meristems are regulated by similar processes. The presence of an EST-contig homologous to *WUSCHEL* in the eucalyptus roots indicates that this hypothesis may also be true for tree species (EGEQRT3102D08 - group III, Figure 3). The other eucalyptus *WUSCHEL*-like gene has broader expression domain including floral buds, roots and callus. Interestingly, this EST-contig has a higher degree of similarity with the *Populus tremula* HB2 protein, a protein involved in wood differentiation. *Populus* HB2 protein is expressed in cambial cells, in xylem and phloem cells undergoing radial enlargement (Hertzberg and Olsson, 1998).

CONCLUDING REMARKS

The FORESTs database was searched for homeobox genes and 50 eucalyptus EST-contigs were identified as sharing significant sequence similarity with the homeobox domain. Sequence alignment and phylogenetic studies provided sound basis for classifying 44 of them (88%) into one of three important homeobox groups: *Bell*, *Knox* or *HD-Zip*. Two sequences were found to have similarity with atypical homeobox genes, like the *A. thaliana* *Wuschel* gene. Based on a digital expression analysis we found ten subsets from the 50 EST-contigs with similar expression patterns. Sequence comparison revealed some eucalyptus genes closely related to *A. thaliana* genes involved in the control of developmental programs, as well as in stress response. Our digital expression

analysis facilitated these cross-species comparisons. For instance, we found possible homologous to *athb-7* and *athb-12* that were preferentially expressed in stems of plants under drought stress. Thus, such genes may act as mediators of the plant growth response to limiting water conditions in leaf, stem and other plant organs, like their potential homologous genes do in *A. thaliana*. We also identified numerous homeobox genes associated with biotic stress, wood development, and pathogen responses, which may be valuable in future efforts to elucidate the genetic mechanisms underlying these processes in trees.

Application of biotechnology for tree improvement offers great potential, and transcription factors, such as those encoded by homeobox genes, may play important roles in such improvements. Homeobox genes control multiple biochemical pathways and cellular processes, and several researchers have recently reported progress in identifying homeobox genes in various plant species, including trees (Hertzberg and Olsson, 1998). For instance, wood is made of secondary xylem and many of its features are determined by xylem growth and cell wall biosynthesis in its cells. Identification of genes involved in xylem formation and/or cell wall biosynthesis would lead to studies on their function that can provide mechanisms to manipulate wood features of interest. The same holds for genes involved in stress resistance, growth, reproductive development and other traits important for tree breeding. Thus, the data obtained in the FORESTs project can be very helpful in developing strategies for the biotechnological improvement of eucalyptus trees. Understanding the molecular mechanisms underlying eucalyptus growth, development and stress reactions can provide important insights into tree development and reveal the means by which tree characteristics could be modified for the improvement of their industrial properties.

ACKNOWLEDGMENTS

G. C. G. Rocha is the recipient of a doctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M. Alves-Ferreira is the recipient of a research fellowship from CNPq (307219/2004-6). This work was supported by grants from FAPERJ (PADCT), CNPq (400767/2004-0 and 475666/2004-6) and FORESTs consortium.

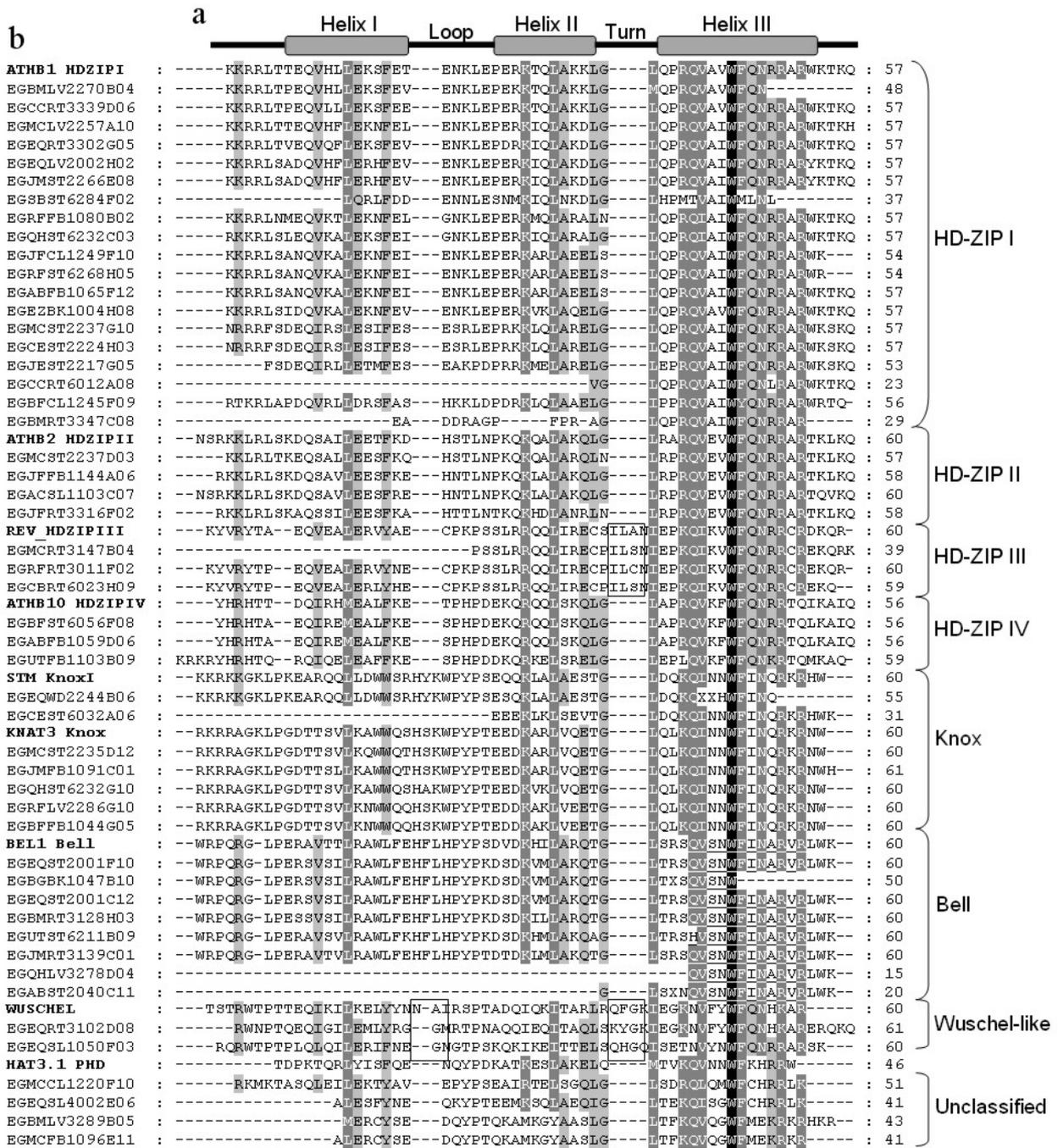


Figure 1: Multiple sequence alignment of 50 FORESTS and nine *Arabidopsis* homeodomain sequences. (a) Schematic diagram illustrating a typical homeobox protein. (b) Black boxes indicate residues that are present in all sequences, while alignments present in more than 60% but less than 100% of the sequences are shaded in gray. Shading was automatically defined, using the GeneDoc program (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>). Residues representing the absolutely conserved Trp-49 are indicated (arrow). The conserved sequence "QVSNWVFQNRBARWKTQ" in the C-terminal region of the Bell class homeodomain is underlined. Open boxes indicate extra amino acid residues present in HD-ZIP III and Wuschel-like proteins. The names of *Arabidopsis* homeodomain sequences are in bold letters.

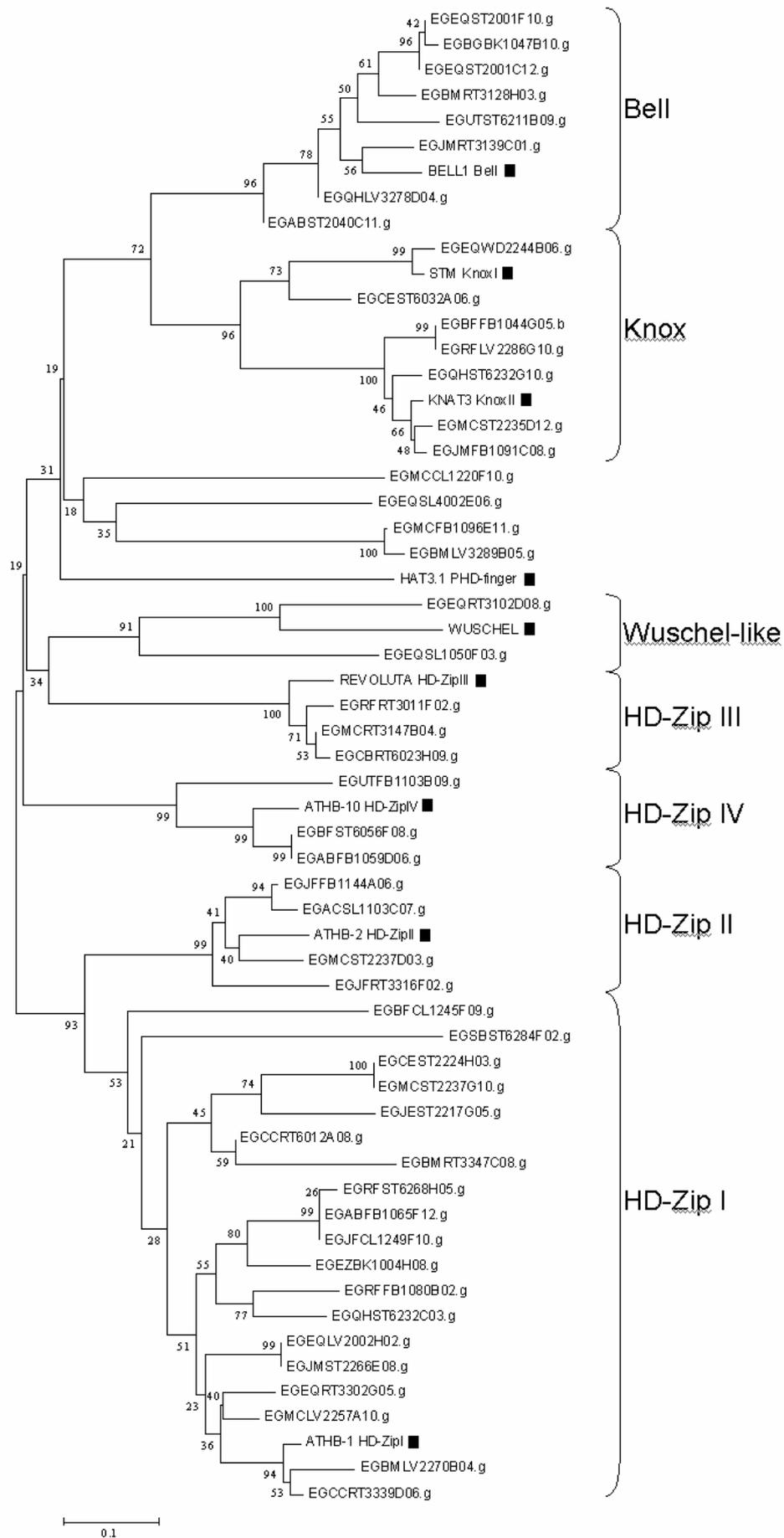


Figure 2: Phylogenetic unrooted tree for the fifty FORESTs contigs and nine *Arabidopsis* genes, based on the amino acid sequences corresponding to homeodomain region, aligned with ClustalW. In phylogenetic tree construction, we chose the Neighbor-joining, p-distance and pair-wise deletion options, and ran 1000 bootstrap replications. Seven major homeobox groups are identified in the tree. Arabidopsis homeobox proteins are indicated by solid black boxes. Arabidopsis sequences were obtained from the GenBank database under the following accession numbers: Arabidopsis thaliana homeodomain protein (BEL1), AT5G41410; SHOOT MERISTEMLESS (STM), AT1G62360; homeobox protein knotted-1 like 3 (KNAT3), AT5G25220; homeobox protein HAT3.1 (HAT3.1), AT3G19510; WUSCHEL (WUS), AT2G17950; Revoluta (REV), AT5G60690; homeobox-leucine zipper protein 10 (ATHB-10), AT1G79840; homeodomain-leucine zipper protein 2 (ATHB-2), AJ431183; homeobox-leucine zipper protein 1 (ATHB-1), AT3G01470.

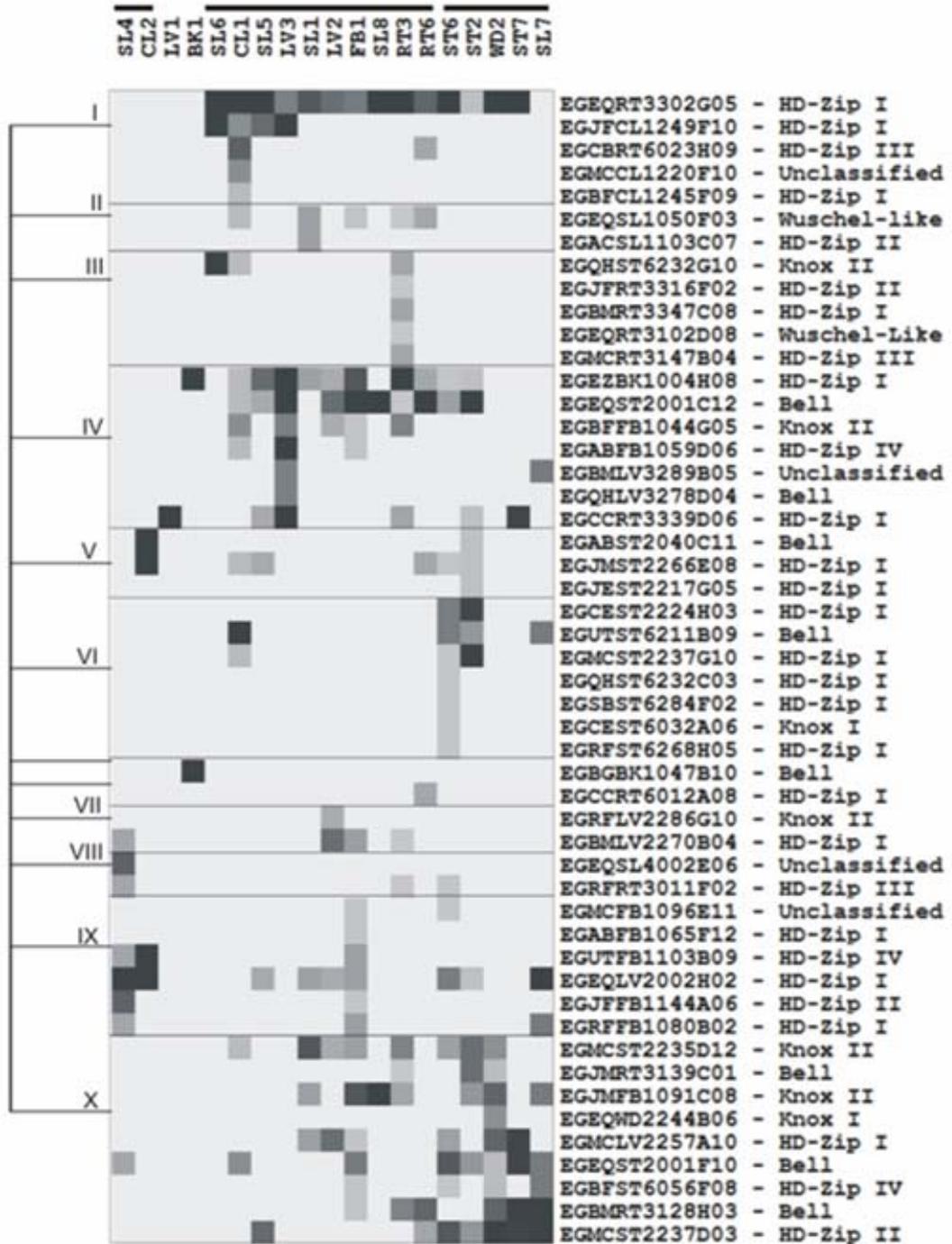
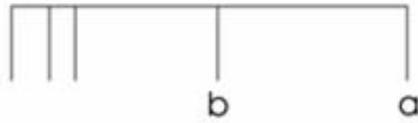


Figure 3: Digital northern blot representing the expression profile of the potential eucalyptus homeobox genes. The normalized number of reads for each EST-contig in each specific library is represented in gray scale. The different EST-contigs are represented by the rows, while the libraries are represented by the columns. Hierarchical clustering method was used to group homeobox genes with similar expression patterns, resulting in ten expression groups. EST-contig collections were also clustered (bars and the letters **a** and **b** above the draw). The expression groups are indicated by roman numerals to the left of the array: I - *E. grandis* dark formed calli (**CL1**); II - *E. grandis* dark growing seedlings with three hours of light exposition (**SL1**); III- roots from developing plants (**RT3**); IV- leaves damaged by *Thyrinteina* for seven days (**LV3**); V- stem from drought stress susceptible seedlings prepared with 0.6 to 2.0 kb DNA fragments (**ST2**); VI- stem from drought stress susceptible seedlings prepared with 0.8 to 3.0 kb DNA fragments with 0.8 to 3.0 kb(**ST6**); VII- leaves of Phosphate/Boron deficient plants susceptible to canker and rust (**LV2**); VIII- *E. globulus* dark growing seedlings (**SL4**); IX- Flower buds, flowers and fruits (**FB1**); and X- *E. grandis* wood (**WD2**).

REFERENCES

- Aasland R, Gibson TJ and Stewart AF (1995) The PHD-finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biotechnol* 20:56-59.
- Ageez A, Matsunaga S, Uchida W, Sugiyama R, Kazama Y and Kawano S (2003) Isolation and characterization of two homeodomain leucine zipper genes from the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genes Genet Syst* 78(5):353-3561.
- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JK, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM and Giovannoni J (2004) ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* 39(5): 697-714.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.
- Aoyama T, Dong CH, Wu Y, Carabelli M, Sessa G, Ruberti I, Morelli G and Chua NH (1995) Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator *Athb-1* alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* 7(11):1773-1785.
- Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Birney E, Biswas M, Bucher P, Cerutti L, Corpet F, Croning MDR, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Gouzy J, Hermjakob H, Hulo N, Jonassen I, Kahn D, Kanapin A, Karavidopoulou Y, Lopez R, Marx B, Mulder NJ, Oinn TM, Pagni M, Servant F, Sigrist CJA and Zdobnov EM (2001) The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res* 29(1):37-40.
- Aso K, Kato M, Banks JA and Hasebe M (1999) Characterization of homeodomain-leucine zipper genes in the fern *Ceratopteris richardii* and the evolution of the homeodomain-leucine zipper gene family in vascular plants. *Mol Biol Evol* 16(4):544-552
- Baima S, Nobili F, Sessa G, Lucchetti S, Ruberti I and Morelli G (1995) The expression of the *ATHB-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121:4171-4182
- Becker A, Bey M, Bürglin TR, Saedler H and Theissen G (2002) Ancestry and diversity of BEL1-like homeobox genes revealed by gymnosperm (*Gnetum gnemon*) homologs. *Dev Genes Evol* 212(9):452-457.
- Bellaoui M, Pidkowich MS, Samach A, Kushalappa K, Kohalmi SE, Modrusan Z, Crosby WL and Haughn GW (2001) The *Arabidopsis* BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell* 13:2455-2470.
- Bharathan G, Janssen B, Kellogg E and Sinha N (1999) Phylogenetic relationships and evolution of the KNOTTED class of plant homeodomain proteins. *Mol Biol Evol* 16(4):553-563.

- Bowman JL and Eshed Y (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci* 5(3):110–115.
- Bürglin TR (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, IROQUOIS, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucl Acids Res* 25(21):4173–4180.
- Carabelli M, Morelli G, Whitelam G and Ruberti I (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(8):3530-3535.
- Carraro DM, Lambais MR and Carrer H (2001) *In silico* characterization and expression analyses of sugarcane putative sucrose non-fermenting-1 (SNF1) related kinases. *Genet Mol Biol* 24(1-4):35-41
- Chan RL, Gago GM, Palena CM and Gonzalez DH (1998) Homeoboxes in plant development. *Biochim Biophys Acta* 1442:1-19.
- Di Cristina M, Sessa G, Dolan L, Linstead P, Baima S, Rubert I and Morelli G (1996) The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J* 10 (3):393-402.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25):14863-8.
- Ewing RM, Kahla AB, Poirot O, Lopez F, Audic S and Claverie J-M (1999) Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res* 9: 950-959.
- Gehring WJ (1987) Homeoboxes in the study of development. *Science* 236(4806):1245–1252.
- Henikoff S and Henikoff JG (1997) Embedding strategies for effective use of information from multiple sequence alignments. *Protein Sci* 6:698-705.
- Hertzberg M and Olsson O (1998) Molecular characterization of a novel plant homeobox gene expressed in the maturing xylem zone of *Populus tremula x tremuloides*. *Plant J* 16(3):285-295.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Ingram GC, Boisnard-Lorig C, Dumas C and Rogowsky PM (2000) Expression patterns of genes encoding HD-Zip IV homeo domain proteins define specific domains in maize embryos and meristems. *Plant J* 22(5):401 – 414.
- Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y and Matsuoka M (2003) Isolation and characterization of rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed

- in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J* 35:429-441.
- Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, Veit B, Yamaguchi J and Hake S (1994) Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* 6(12):1877-1887.
- Korfhage U, Trezzini GF, Meier I, Hahlbrock K and Somssich IE (1994) Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* 6(5):695-708.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB and Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17(12):1244-5.
- Kuo WP, Jenssen TK, Butte AJ, Ohno-Machado L and Kohane, IS (2002) Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18(3):405-12.
- Lambais MR (2001) *In silico* differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. *Genet Mol Biol* 24(1-4):103-111.
- Laughon A (1991) DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* 30(48):11357-11367.
- Lawrence PA and Morata G (1994) Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 78(2):181-189.
- Lee YH and Chun JY (1998) A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol Biol* 37(2):377-384.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR and Lockhart DJ (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21:20-4.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G and Laux T (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95(6):805-815.
- Quaedvlieg N, Dockx J, Rook F, Weisbeek P and Smeekens S (1995) The homeobox gene *ATH1* of *Arabidopsis* is derepressed in the photomorphogenic mutants *cop1* and *Det1*. *Plant Cell* 7(1):117-129.
- Reiser L, Sanchez-Baracaldo P and Hake S (2000) Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Mol Biol* 42:151-166.
- Reiser L, Modrusan Z, Margossian L, Samach A, Ohad N, Haughn GW and Fischer RL (1995) The *BELL1* gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. *Cell* 83(5):735-742.

- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sakakibara K, Nishiyama T, Kato M and Hasebe M (2001) Isolation of homeodomain-leucine zipper genes from the moss *Physcomitrella patens* and the evolution of homeodomain-leucine zipper genes in land plants. *Mol Biol Evol* 18(4):491-502.
- Schena M and Davis RW (1994) Structure of homeobox-leucine zipper genes suggest a model for the evolution of gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(18):8393-8397.
- Schena M, Lloyd AM and Davis RW (1993) The HAT4 gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes Dev* 7(3):367-79.
- Schena M and Davis RW (1992) HD-Zip proteins: members of an *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(9):3894-3898.
- Scott MP, Tamkun JW and Hartzell GW (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989(1):25-48.
- Servant F, Bru C, Carrère S, Courcelle E, Gouzy J, Peyruc D and Kahn D (2002) ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Brief Bioinform* 3:246-251.
- Sessa G, Steindler C, Morelli G and Ruberti I (1998) The *Arabidopsis* *ATHB-8*, *-9* and *-14* genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Mol Biol* 38:609-622.
- Sessa G, Morelli G and Ruberti I (1993) The *ATHB-1* and *-2* HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J* 12(9):3507-3517.
- Söderman E, Mattsson J and Engström P (1996) The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J* 10(2):375-381
- Southern E, Mir K and Shchepinov M (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* 21(1):5-9.