

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Departamento de Genética**

**Debora Brussolo Bidoia**

**Geração e caracterização de plantas transgênicas de tomateiro cv. Micro Tom  
superexpressando o precursor do microRNA159.**

Botucatu, SP, Brasil 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Bidoia, Debora.

Geração e caracterização de plantas transgênicas de tomateiro cv. Micro Tom superexpressando o precursor do microRNA159 / Debora Bidoia. - Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Capes: 20203004

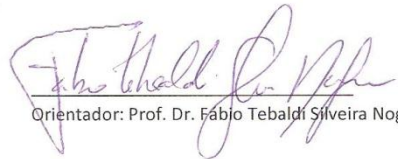
1. Giberelina. 2. Plantas - Reguladores. 3. Plantas - Desenvolvimento. 4.  
Plantas transgênicas. 5. Acido ribonucleico.

Palavras-chave: Desenvolvimento vegetal; Giberelina; MicroRNA; Procera.

Debora Brussolo Bidoia

**Geração e caracterização de plantas transgênicas de tomateiro cv. Micro Tom  
superexpressando o precursor do microRNA159.**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho" do Campus de Botucatu para obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas na área de  
Biotecnologia.



Orientador: Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Botucatu 2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus e Santa Rita pela proteção e por iluminarem meu caminho até aqui.

À minha família: meu pai, minha mãe, meu irmão e meus avós pelo apoio e suporte, confiança, compreensão e principalmente pelo amor e carinho. A minha maior gratidão a meus pais, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todos os desafios e a quem eu devo toda a minha trajetória até aqui e daqui em diante. Vocês são meus maiores exemplos. Muito obrigada!

Às minha amigas Luana, Flávia, Maria Lígia e Esther com quem eu pude viver momentos incríveis e inesquecíveis durante a graduação. Pelas alegrias divididas e pelas dificuldades superadas juntas e acima de tudo pela amizade que levamos em frente.

Aos meus colegas de laboratório Cris, Gisela, Victor pela parceria e convivência. Ao Eder por se fazer sempre disponível quando precisei, pela ajuda e dedicação para com a realização do meu projeto e formação, pela confiança, paciência e parceria.

E, finalmente ao meu orientador prof. Fábio Tebaldi por me acolher em seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança, por todo aprendizado pessoal e científico. E, principalmente, por ter proporcionado a oportunidade de conhecer, com toda sabedoria e dedicação que recebi da sua parte, uma área da Biologia pela qual descobri verdadeiro fascínio.

## RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs regulatórios (20-22 nt) requeridos em vários aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo o estabelecimento da dorsoventralidade foliar, desenvolvimento do sistema vascular, desenvolvimento do sistema radicular lateral, dentre outros. A maioria desses processos tem sido extensivamente investigada em plantas-modelo tais como arábido, embora estudos em plantas de importância econômica sejam ainda incipientes. Neste trabalho foram geradas plantas transgênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom superexpressando o precursor do microRNA159. Um dos alvos do miR159 é o gene *GAMYB*, o qual codifica um fator de transcrição implicado em processos de transdução de sinal dos hormônios giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA). Tais hormônios estão envolvidos com a formação da arquitetura vegetativa em várias espécies. Embora vários estudos venham sendo realizados com o intuito de elucidar o papel do gene *GAMYB* em processos fisiológicos tais como indução na expressão de enzimas hidrolíticas necessárias para germinação e ativação da expressão gênica durante o desenvolvimento do endosperma, o papel da via genética miR159/*GAMYB* na formação de órgãos vegetativos e reprodutivos ainda necessita ser investigado. Portanto, as plantas transgênicas de *S. lycopersicum* MT geradas nesse trabalho podem auxiliar no estudo do papel do miR159 na formação da arquitetura vegetativa e formação de frutos de tomateiro.

## ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory RNAs (20-27 nt) required in many aspects of plant development, including establishment of leaf patterning, vascular system and lateral root development, among others. Most of these processes have been extensively studied in model plants such as *Arabidopsis*, although studies on economically important crops, such as tomato, are still incipient. In this work, we generated transgenic *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom plants overexpressing the microRNA159 precursor. Targets of miR159 include *GAMYB* genes, which encode transcription factors involved in gibberellin (GA) and abscisic acid (ABA) signaling during plant reproductive and vegetative development . Although some studies have investigated the roles of miR159 and *GAMYB* genes in the induction in the expression of hydrolytic enzymes necessary for germination and the activation of gene expression during endosperm development, the role of the genetic pathway miR159/*GAMYB* in the formation of vegetative tissues still needs to be investigated. Therefore, the transgenic plants generated in this study may help to elucidate the role (s) of miR159 and *GAMYB* genes in the formation of vegetative architecture in tomato.

## Sumário

1. Introdução .....	12
1.1- MicroRNAs e arquitetura vegetal.....	12
1.2 Interação GA, <i>GAMYB</i> e sua regulação via miRNAs.....	13
1.3 Alguns aspectos genéticos e moleculares relacionados à formação, desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos.....	15
1.4. Uso do tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) como planta modelo em estudos genéticos. ....	16
2. Objetivo geral .....	16
3. Materiais e Métodos .....	16
Bioinformática: microRNA159 em tomateiro .....	16
Construção do cassete de expressão pDB159 para transformação genética.....	17
Extração de DNA plasmidial de E.coli .....	18
Análise RT-PCR semi-quantitativo .....	19
Cultivos, transformação genética e regeneração de plantas de tomateiro. ....	21
4. Resultados e Conclusão .....	22
4.1 Resultados.....	22
Análise da expressão do microRNA159 e do gene-alvo LeGAMYB1 em plantas de tomateiro cv. Micro-Tom em comparação com o mutante procera. ....	22
Caracterização genotípica das plantas transgênicas .....	23
Análise do acúmulo de transcritos via RT-qPCR.....	23
Caracterização fenotípica das plantas transgênicas contendo o transgene p35S:: <i>SlyMIR159</i> .....	24
4.2 Conclusão.....	25
5. Referências Bibliográficas.....	27

## 1. Introdução

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codantes endógenos (20-22 nt). Sua biossíntese é iniciada pela transcrição do gene *MIR* via RNA Polimerase II (RNA Pol II). O transcrito primário, ou precursor (pri-miRNA), é um RNA longo de fita-simples e poliadenilado que forma uma estrutura secundária do tipo “*hairpin*” ou grampo. O pri-miRNA é processado via ação de diferentes enzimas, tais como a enzima RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), e gera o precursor intermediário ou pre-miRNA (VAUCHERET, 2006). O pre-miRNA é clivado novamente pela enzima DCL1, resultando em um duplex imperfeito de RNA (20-22 nt), o que contém tanto o miRNA maduro, quanto sua fita complementar, denominado miRNA\*. Esse duplex de RNA é metilado pela enzima HEN1 (YANG et al., 2006) e o miRNA maduro é posteriormente incorporado ao complexo proteico RISC que contém a enzima ARGONAUTA (AGO1), a qual é responsável por “guiar” o miRNA maduro, clivando mRNAs específicos ou promovendo a repressão da tradução de genes-alvo (VOINNET, 2009).

MicroRNAs e outros RNAs regulatórios desempenham papel crucial em diversos processos biológicos em plantas, incluindo desenvolvimento (NOGUEIRA et al., 2007), sinalização via fitohormônios (ACHARD et al., 2004; MALLORY; BARTEL; BARTEL, 2005) e resposta a estresses bióticos e abióticos (LU et al., 2005). Desde que os miRNAs foram descritos, primeiro em animais e posteriormente em plantas (LEE et al., 1993; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; REINHART et al. 2002), vários avanços foram feitos visando o melhor entendimento da sua biogênese, modo de ação e efeitos biológicos, inclusive em plantas. Tais avanços vêm mostrando a importância dos miRNAs e outros RNAs regulatórios em diversos processos biológicos em plantas, incluindo desenvolvimento. MiRNAs estão imersos em complexas vias que incluem fatores de transcrição (LIU; CHEN, 2009). Transcritos dos FTs do tipo *HD-ZIP III*, são alvos dos microRNAs miR165 e miR166 (JUAREZ et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2007; 2009), enquanto os FTs *CUC1*, 2 e 3 são alvos do microRNA miR164 (LAUFS et al., 2004). Alguns membros da família de FTs do tipo TCP em *Arabidopsis*, homólogos ao gene *tb1*, são regulados pós-transcricionalmente pelo microRNA 319/JAW (KOYAMA et al., 2007).

### 1.1- MicroRNAs e arquitetura vegetal

A determinação da arquitetura vegetal vegetativa se dá através da relação entre dominância apical e brotação lateral. A dominância apical é o fenômeno em que, na maioria das espécies vegetais, o meristema apical inibe a brotação lateral (SHIMIZU-SATU & MORI 2001). A formação de gemas axilares/laterais, bem como sua posterior brotação (ramificação), é um fator primordial no que diz respeito à determinação da arquitetura vegetativa. A capacidade de formação e desenvolvimento de ramos laterais afetam tanto a biomassa foliar como o número de inflorescências (DOUST, 2007). A ramificação é definida como a organização tridimensional do corpo da planta, incluindo padrão de brotação lateral, forma e posição das folhas e órgãos florais (REINHARDT; KUHLEMEIER, 2002).



A transição do estágio dormente para o estágio ativo de desenvolvimento de gemas laterais constitui um fenômeno altamente complexo e coordenado, e inclui uma rede de interação entre uma série de fatores, como a alteração na produção e percepção de fitohormônios, tais como a auxina e a citocinina (SHIMIZU-SATO; MORI, 2001), giberelina (RIEU et al., 2008), estrigolactonas (BREWER et al., 2009), resposta a fatores ambientais – temperatura e luminosidade (CHAO, 2007) e modificações na expressão de determinados genes (SCHMITZ & THERES, 2005; DOUST, 2007).

Nos últimos anos, vários genes vêm sendo pesquisados e descritos devido à sua importância na formação de gemas laterais e sua posterior brotação (SCHMITZ & THERES, 2005; DOUST, 2007). Por exemplo, membros da classe III de fatores de transcrição do tipo *HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIPIII) REVOLUTA*, *PHABULOSA* e *PHAVOLUTA* controlam a formação do meristema apical e lateral (EMERY et al., 2003). Durante o estabelecimento dorso-ventral da folha, por exemplo, miR166 restringe o acúmulo de transcritos dos genes *HD-ZIPIII* na face superior (adaxial) dos primórdios foliares em desenvolvimento. Essa regulação espacial dos transcritos dos genes *HD-ZIPIII* é um fator-chave para o desenvolvimento da lâmina foliar em milho e *Arabidopsis* (NOGUEIRA et al., 2007; CHITWOOD et al., 2009). Genes do tipo *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* são regulados por membro da família do miRNA164 e desempenham papel importante na formação dos limites entre o meristema apical e primórdios foliares, o que é um pré-requisito para a identidade e formação da gema lateral (LAUFS et al., 2004). O aumento no nível de transcritos do gene *teosinte branched1 (tb1)*, um dos membros “fundadores” da família de fatores de transcrição do tipo *TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, e PCF)* (CUBAS et al., 1999), regulados pelo miRNA319, na gema axilar é associado com a redução da ramificação lateral em milho e arroz (TAKEDA et al., 2003). A perda do sítio de regulação pelo miR319 e o conseqüente aumento do nível de transcritos de seus alvos *TCP* induz a geração de folhas simples em *Solanum lycopersicum* (ORI et al., 2007), espécie que sabidamente possui folhas compostas.

## 1.2 Interação GA, *GAMYB* e sua regulação via miRNAs

O ácido giberélico (GA), quando biologicamente ativo, é um importante regulador associado a uma série de fatores relacionados ao crescimento e desenvolvimento, incluindo germinação de sementes, alongamento do caule, expansão de folha, início do desenvolvimento floral e de sementes (GOCAL et al., 2001; YAMAGUCHI, 2008). O início do desenvolvimento de frutos também é um processo dependente da ação de GAs em tomateiro (JONG et al., 2009). Serrani et al (2007) demonstra que a aplicação de GA em tomateiro induz o desenvolvimento do fruto. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos sobre o papel molecular da sinalização de GA. Uma abordagem alternativa para a compreensão de transdução de sinal GA tem envolvido estudos funcionais, em particular com células de aleurona de cereais. Estes estudos têm identificado um número de passos iniciais de sinalização de GA que precedem a expressão de enzimas hidrolíticas tais como a alfa-amilase. Esses passos envolvem, por exemplo, a proteína G-heterotrimerica (JONES et al., 1998; UEGUCHI-TANAKA et al., 2000) e cGMP (PENSON et al., 1996).

Os genes *GAMYB* ou *GAMYB-like* são fatores de transcrição implicados em processos de transdução de sinal de GA (WOODGER et al., 2003) e foram primeiramente identificados como reguladores positivos da sinalização de GA em células de aleurona de

cevada (GUBLER et al., 1995). Desde então, tem-se estudado o papel de genes *GAMYB-like* em uma série de processos fisiológicos de extrema importância, dentre os quais destaca-se a atuação do *GAMYB* na indução da expressão de genes codificantes de enzimas hidrolíticas que são necessárias para a germinação (GUBLER et al. 1997). Também já foi demonstrado, em arroz, que o *GAMYB* é expresso nas anteras de cereais, e que sua expressão é mais acentuada em células do tapete das anteras e também é induzida por ação de GA (MURRAY et al., 2003; AYA et al., 2009), além de seu envolvimento no processo de apoptose de células do tapete de anteras e células de aleurona (TSUJI et al., 2006; AYA et al., 2009). Kaneko et al (2004) descreveram que a mutação de perda de função do gene *OsGAMYB* tem por consequência defeitos no alongamento de entrenós e no desenvolvimento das anteras e de pólen. Desta forma, fica claro que o *GAMYB* possui múltiplos papéis significativos na cascata de sinalização por GA (GOCAL et al 2001 ). Isso se deve também à interação deste com outros genes que também são regulados por GA. Um exemplo interessante é o que ocorre com as proteínas repressoras com domínio do tipo DELLA, as quais são ativas na ausência de GA. Esse fato tem por consequência o bloqueio de genes induzidos por esse fitormônio (GUBLER et al. 2002 ).

O *GAMYB* está entre os genes com expressão bloqueada na presença de proteínas com domínio do tipo DELLA. Contudo, evidências indicam que o *GAMYB* não é alvo direto de proteínas com domínio DELLA (SUN E GUBLER, 2004). Em tomateiro, o mutante natural *procera* (*pro*) possui mutação pontual no gene *SIGAI* (*Solanum lycopersicum GA insensitive*), um repressor de crescimento tipo DELLA. A mutação *SIGAI* foi identificada como forte candidata à geração do fenótipo *pro* (BASSEL et al., 2008), no qual a estrutura do vegetal é extremamente modificada quando comparada ao selvagem, apresentando um crescimento rápido, e menos brotação lateral, além de uma alta tendência de formar frutos partenocárpicos. Tal como esperado, o gene *LeGAMYBI* é induzido em tecidos foliares do mutante *pro* quando comparado ao tomateiro MT (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012).

Os genes *GAMYB* ou *GAMYB-like*, como já exposto acima, codificam para fatores de transcrição e atuam em uma série de processos fisiológicos em diferentes órgãos vegetais. Também se enquadra dentro do grupo de genes que sofrem regulação pós-transcricional via microRNAs, visto que o gene *GAMYB* é alvo do miRNA miR159 (TSUJI et al., 2006). O miR159 reprime a expressão de genes conservados *GAMYB-like*, implicados na sinalização de GA em anteras e sementes (ALONSO-PERAL et al., 2010). Reyes e Chua (2007) mostraram em *Arabidopsis* que o ácido abscísico (ABA) induz a produção de miR159 para regular a expressão de genes *GAMYB-like* na germinação de sementes sob condições de estresse hídrico.

A expressão do miR159 em gemas axilares já foi demonstrado por experimentos de hibridização *in situ*, sugerindo que este possui um papel importante nos processos de diferenciação destes tecidos (VÁLÓCZI, 2006). Além disso, trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou, em cana-de-açúcar (*Saccharum sp*), a regulação do gene *SsGAMYB*, pelo menos em parte, pelo SsmiR159 no desenvolvimento de gemas laterais (Ortiz-Morea et al, 2013). A maioria das sequências identificadas do SsmiR159 foram provenientes de bibliotecas de pequenos RNAs expressos em gemas inativas; isso, aliado ao fato de seu acúmulo ser profundamente reduzido nas gemas em desenvolvimento, sugere que o gene *SsGAMYB* é predominantemente regulado em gemas inativas pelo SsmiR159 (Ortiz-Morea, 2011; Ortiz-Morea et al, 2013). Adicionalmente, com a utilização do promotor do gene *GAMYBI* de tomateiro (*LeGAMYBI*), fusionado ao gene repórter da

enzima  $\beta$ - Glucuronidase (GUS), foi demonstrado que o *LeGAMYB1* é expresso em gemas axilares de tomateiro (GONG E BEWLEY 2010).

Com base em todas as informações anteriormente levantadas sobre a atuação do *GAMYB* em diversos processos fisiológicos em plantas, sua correlação negativa com o miR159, e obviamente ao fato de ambos serem expressos em gemas axilares, levanta-se a hipótese da possível contribuição dessa via de regulação no desenvolvimento de órgãos laterais e, por consequência, sobre a participação desta mesma via na determinação da arquitetura vegetativa e na formação de frutos.

### **1.3 Alguns aspectos genéticos e moleculares relacionados à formação, desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos.**

Apesar de frutos secos e deiscentes representarem a maioria dos frutos das espécies vegetais, os estudos de desenvolvimento de fruto são focados, principalmente, em espécies de frutos carnosos devido a sua importância para a dieta humana. Ênfase tem sido dada, em particular, ao tomateiro como sistema para análises genéticas e moleculares do desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos, (Giovannoni, 2001).

O desenvolvimento do fruto de tomateiro pode ser dividido em etapas com características distintas: No primeiro estágio, é determinada a identidade dos verticilos florais com consequente estabelecimento da arquitetura floral, a qual será responsável pela estrutura final do fruto. Em seguida, inicia-se um período de intensa divisão celular seguido por uma fase de rápida expansão celular que culmina em extensivo aumento no tamanho do fruto. O último estágio é o amadurecimento, no qual ocorre uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas responsáveis pela produção do fruto maduro.

Nos últimos anos, houve um avanço na caracterização das vias genéticas que controlam o amadurecimento desta espécie modelo. A identificação de genes tais como *MADS-RIN* (Vrebalov et al., 2002) e *COLORLESS NON RIPENING (CNR)* (Manning et al., 2006) mostrou a existência de rotas independentes ao fitohormônio etileno, as quais são capazes de regular o processo de amadurecimento. Diferentemente do amadurecimento, as etapas iniciais e intermediárias do desenvolvimento do fruto são pouco compreendidas quanto à regulação gênica.

Recentemente, foi demonstrado que o perfil de expressão de pequenos RNAs (principalmente microRNAs) apresenta mudanças acompanhando os diferentes estágios do desenvolvimento do fruto de tomateiro (Mohorianu et al., 2011,) inclusive do miR159 (Zuo, 2012). Tais resultados sugerem que estes pequenos RNAs não codantes apresentam funções regulatórias no desenvolvimento do fruto, além da atuação em diferentes órgãos como já citado acima.

Vários genes regulatórios codificantes de FTs tem sido associados a características singulares do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro. Um exemplo notável é a regulação gênica negativa exercida pelo miR156 sobre os FTs do tipo *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING-LIKE PROTEINS (SPLs)* (Chen et al. 2010). A descrição desta família de fatores de transcrição em uma espécie de fruto carnosos mostrou a existência de um novo papel regulatório para esses genes, diferentemente do que já havia sido descrito para as espécies modelo *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Schwab et al., 2005; Xie; Wu; Xiong, 2006).

Genes regulatórios envolvidos no desenvolvimento floral foram recrutados para novas funções modulando o amadurecimento tanto em frutos secos como em carnosos durante o curso da evolução de angiospermas (Leseberg et al., 2008). Embora existam vários trabalhos relatando os genes e as vias genéticas implicadas no desenvolvimento do fruto de tomateiro, pouco se sabe sobre as vias genéticas que podem afetar a formação e desenvolvimento de frutos envolvendo o miR159 e seus alvos.

#### **1.4. Uso do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) como planta modelo em estudos genéticos.**

Além de sua importância econômica, o tomateiro tem sido utilizado como planta-modelo em diversos estudos genéticos e moleculares relacionados ao desenvolvimento vegetal. Em particular, a cultivar Micro-Tom (MT) tem sido bastante utilizada para tais estudos, além de ser considerado um modelo para estudos de genômica funcional baseado em transformação genética (DAN et al., 2006; SUN et al., 2006). O MT possui características comparáveis as de *Arabidopsis thaliana*, como crescimento determinado e curto ciclo de vida, sendo adequado para experimentos envolvendo mutagêneses em larga escala, cruzamentos com mutantes (MEISSNER et al., 1997; PINO-NUNES et al., 2008) e produção de plantas transgênicas (MEISSNER et al., 1997; MATHEWS et al., 2003).

Vários genes regulatórios codificantes de FTs tem sido associados a características singulares do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro. Seu hábito de crescimento do tipo simpodial, além da presença de frutos carnosos, requer um controle específico de diversos aspectos do desenvolvimento (LOZANO et al., 2009) e essas características fazem do tomateiro Micro Tom, um modelo notável para o presente projeto.

## **2. Objetivo geral**

O objetivo geral do projeto foi gerar plantas transgênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) Cv. MT superexpressando o miR159 a partir da fusão do promotor CaMV35S (35S) com o precursor do miR159 de tomateiro (*SIMIR159*), por nós identificado. Com a geração da planta transgênica será possível avaliar, fenotipicamente, o padrão de desenvolvimento de frutos e de brotação lateral. Também será avaliado o padrão de expressão de genes-alvo para o miR159 nas plantas transgênicas.

## **3. Materiais e Métodos**

### Bioinformática: microRNA159 em tomateiro

Em *Arabidopsis* existe um clado de, aproximadamente, sete genes *GAMYB-like* intimamente relacionados, os quais são potenciais alvos de três diferentes genes *MIR159* (Rhoades et al., 2002), dentre eles o *MIR159a* é a forma predominante (Fahlgren et al., 2007). A partir dessa informação, foi usada a ferramenta de BLAST do site específico para tomateiro, Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/>) para encontrar a sequência do miR159 maduro (Figura 2a). Como resultado do BLAST, foi identificada a sequência do *locus* correspondente ao *SIMIR159* (Figura 2a), precursor do miR159, o que indicou a

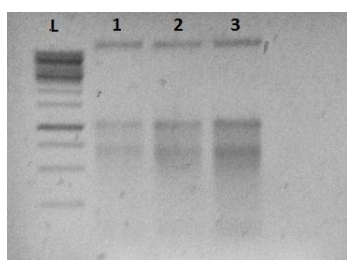
presença desse microRNA também em tomateiro. Foi usada a mesma ferramenta para encontrar os possíveis alvos do miR159, dentre eles foi também confirmado o gene *GAMYB-like* como alvo presente em tomateiro.

### Construção do cassete de expressão *pDB159* para transformação genética

Inicialmente, foi realizada a extração de DNA genômico de folhas jovens de tomateiro MT seguindo o método CTAB descrito por DOYLE; DOYLE, 1987 (Figura 1). O DNA extraído foi utilizado para amplificação via PCR do locus do *SIMIR159* (Figura 2). Para tanto foram desenhados os seguintes iniciadores:

Primer F – *SIMIR159* F CACCGGATCCACCCCTCTCCTCCATCATT

Primer R: *SIMIR159* R 5' GCACAAAGATCAAGAATCAAGA 3' (Tm 58°C)



**Figura 1:** Gel da extração de DNA de genômico de tomateiro MT. L: 1 kb plus DNA ladder. 1, 2, 3: amostras de folhas jovens. As amostras foram posteriormente tratadas com RNase para remoção das banda de RNA que aparecem na foto.

(A)

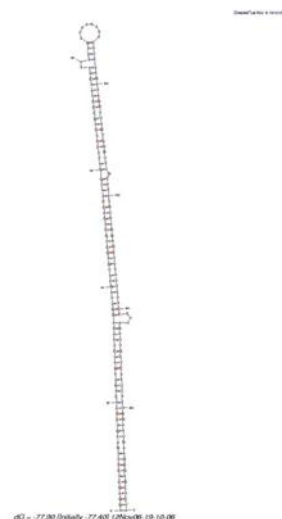
>SL2.40ch03:61785401-61787100

```

ACCCCTCTCCTCCATCATTCTCACTTCTCTCATTCTCTAGCTCATCTACCAAAGTTATTTGGTTTCTATTT
TCAACAAAATAGGTCCTAAATTTTTTTCTCTTTGAAATATATAGATAGATCCAAACTCATGTGAGTT
TTTGTATCTTCATTTTGGGAAGTATTAGTATAAGATTAGGGTTTTTGTACATATGTTGACTTGATATTA
TTTTATGTTATGGGAGTGGAGCTCCTGAAGTCCAACAGAAAGATCTAACAGGTTAGATTGAGCTGCT
GACCTATGGATTCTCAGCCCTATCTATTATGATTTCAAACATATAGATAGGTTTGTGGGTTTGCATAT
GTCAGGAGCTTTATTTTACCCTTGTGTTGATCATTTTGGATGAAGGGAGCTCTACATTCACTTCTCT
TACTAGTTAATCTATGTTGGTAAATTAATCTACTCATATTACTTTAGATCTAGTTTCTTAGATTTTATA
ATCTAGATGTAGATCTTATTTCTATTCTAGCTACTGTTCAAATATACATATATATGATTTGGATA
AATTTTAAAAATTTTATGTTGTTTAAATAGATCTGATTTCTCTATTTCCAGGCTTCTGAAGAAATGTT
GGATTTAGATTTGGGTTTGAAGTGTTCAGCGCAGCTTTATCGTTTGTAGATTTGAGTTGTGGAAG
ATAATATTTAGAACTGAATTTTACAGTTGTGAAATGGGAAATACTGTTTGTGTTTACTTTTGA
CTACATTTACAGTTACATTTACGTATTTATCAAGTGTGACATATTAGTTTGTAAATAAAATAAAGTG
AAATTCATTAATTTTATTAATCTTTTTCTATTAGGTTAAGAGTCTAGGTTATTGATAGCTACTTCT
GATTCCTGATCTTTGTGCT

```

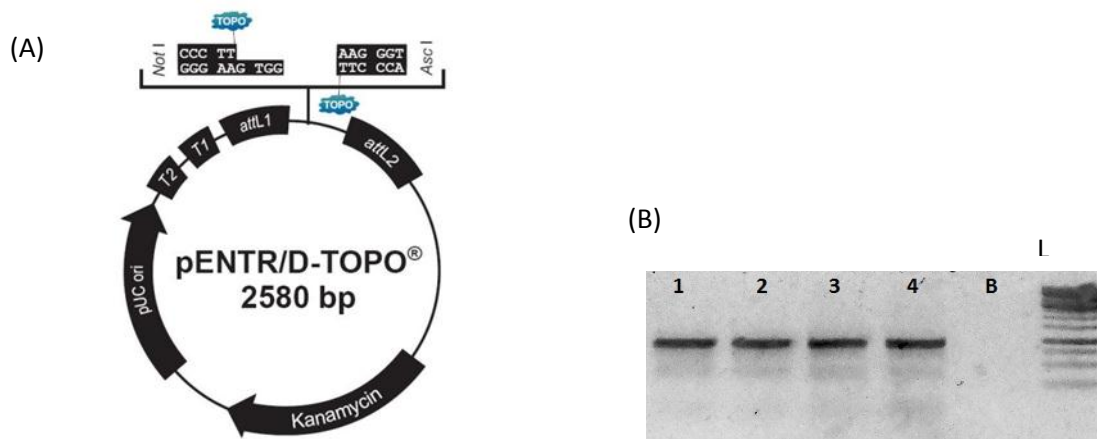
(B)



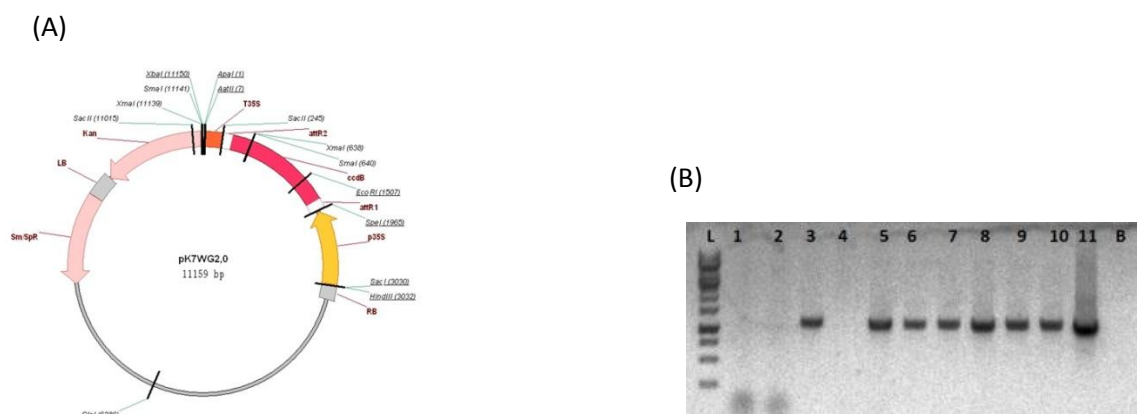
**Figura 2.** (A) Locus correspondente ao *SIMIR159* que contém o *pré-SIMIR159* ( em cinza). Iniciadores específicos (em azul) serão utilizados para obter o amplicon do *SIMIR159*, o qual contém o miR159 maduro (vermelho). (B) Estrutura secundária do *pré-SIMIR159* obtida pelo programa mFOLD (ZUKER, 2003)

Os amplicons gerados foram inseridos em vetor de clonagem (pENTR/D-TOPO Invitrogen) (Figura 3A e B) para sequenciamento. Uma vez confirmado a integridade da sequência, foi realizado a recombinação para o vetor de destino (pk7WG2), *in frame* com o

promotor CamV35S já presente no vetor, através do sistema Gateway (Invitrogen) de superexpressão, de acordo com as instruções do fabricante. O vetor de destino (pk7WG2), contendo o inserto, foi utilizado para transformar *E.coli* e colônias recombinantes foram selecionadas através de PCR utilizando os iniciadores *forward* do promotor CamV35S e *reverse* para o locus *SIMIR159* (Figura 4 A e B).



**Figura 3:** (A) Vetor topo que foi utilizado para sub-clonagem e sequenciamento do amplicon. (B) Gel das colônias positivas de *E. coli* contendo o vetor pENTR com a construção *p35S::SIMIR159*. L: 1 kb plus DNA ladder.



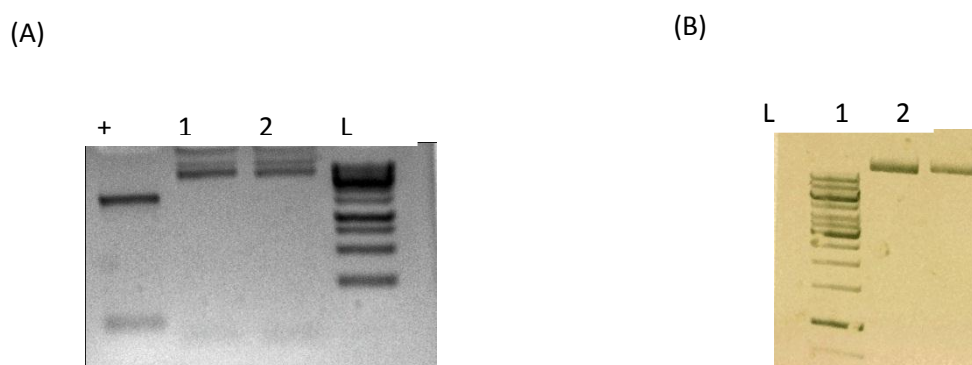
**Figura 4:** (A) Vetor de recombinação pk7WG2. (B) Gel das colônias de *E.coli* contendo o vetor pDB159. 1, 2, 4: colônias negativas; 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: colônias positivas. B: branco. L: 1 kb plus DNA ladder.

Em seguida o vetor de destino pk7WG2 das colônias positivas para a construção *pDB159* foi inserido, via eletroporação, em *Agrobacterium tumefaciens* cepa *LBA4404* para posterior transformação genética das plantas. Todos as extrações de DNA plasmidial, tanto de *E.coli* quanto de *Agrobacterium tumefaciens*, foram feitas seguindo o protocolo abaixo.

#### Extração de DNA plasmidial de *E.coli*

Colônias isoladas foram crescidas a 37°C em meio LB com os antibióticos adequados, sob agitação de 180 rpm durante 16-18 horas. Cultura bacteriana foi centrifugada a 12000 rpm e as células ressuspensas em 75µL de Buffer TE (10mM Tris-HCl; pH 8,0; 1mM EDTA; 0,1N NaOH; 0,5% SDS), sendo posteriormente incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. Após, foi adicionado 150µL de acetato de potássio 3M (pH 5,2)

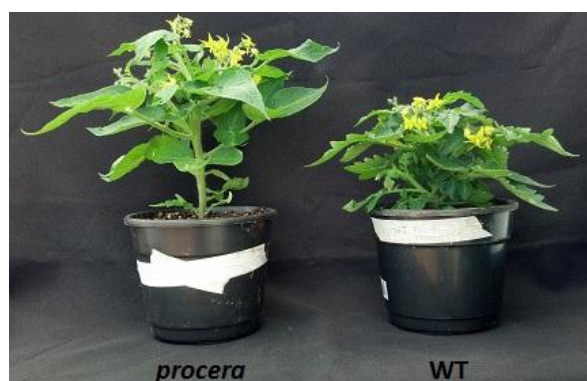
e levado ao vórtex por alguns segundos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos, coletou-se o sobrenadante onde foi adicionado 1 $\mu$ L de RNase (10 U/ $\mu$ L) e incubado a 37°C por 20 minutos. O plasmídeo foi precipitado em 800 $\mu$ L de etanol 100% gelado (-20°C) levando ao vórtex por alguns segundos e centrifugando a 12000 rpm por 5 minutos. O pellet formado foi lavado com 500 $\mu$ L de etanol 70% gelado (-20°C) e centrifugado a 12000 rpm por 2 minutos. O *pellet* foi colocado para secar a 37°C por 15 minutos e ressuspensão em 20 $\mu$ L de água ultra pura estéril livre de DNase. Todas as centrifugações foram realizadas à temperatura ambiente. Feita a quantificação o plasmídeo será armazenado a -20°C (Figura 5).



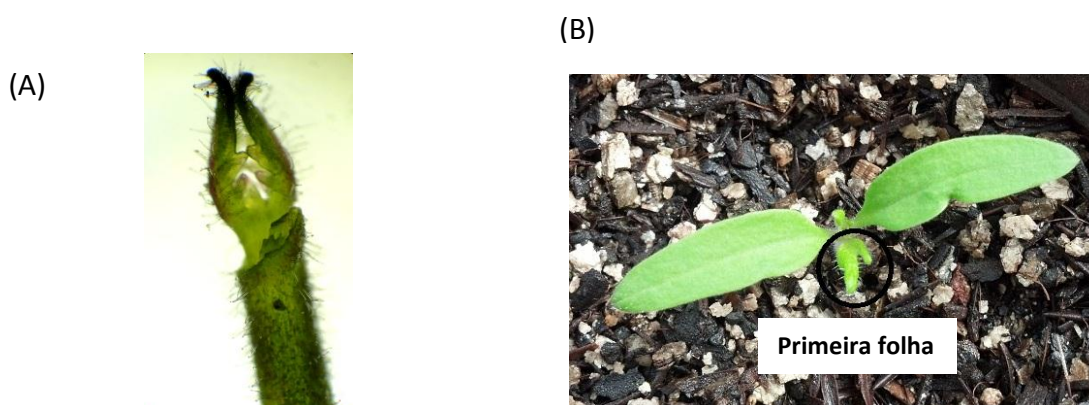
**Figura 5:** (A) Gel do DNA plasmidial de *E. coli* (vetor pENTR + *p35S::SIMIR159*). +: controle positivo. (B) Gel do DNA plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 (vetor pDB159). L: 1 kb plus DNA ladder.

#### Análise RT-PCR semi-quantitativo

Foi realizada análise de expressão, via RT-PCR, do microRNA159 e do gene *LeGAMYB1* em plantas de tomateiro cv. Micro-Tom selvagem (WT) em comparação com o mutante *procera* (Figura 6) no mesmo *background* genético. Essa análise foi realizada com intuito de avaliar o padrão de expressão, tanto do gene *LeGAMYB1* quanto do miR159, em uma planta com resposta constitutiva à GA – mutante *procera* (ver acima). As análises foram feitas em amostras do ápice vegetativo (meristema apical + primórdios foliares) e da primeira folha verdadeira (Figura 7).



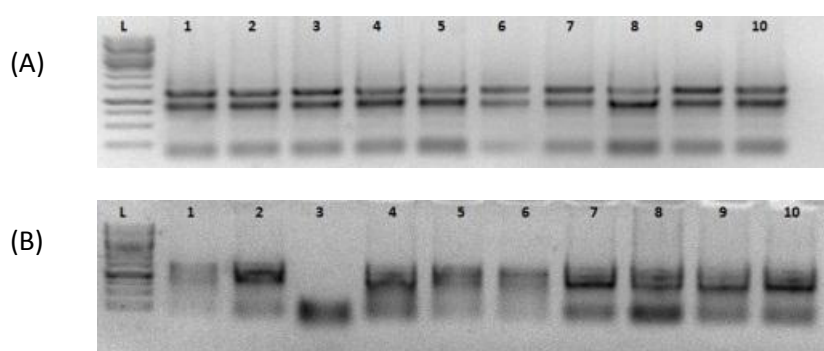
**Figura 6:** Plantas de tomateiro Cv. Micro-Tom do tipo selvagem (WT) – à direita – e mutante (*procera*) – à esquerda.



**Figura 7:** (A) ápice vegetativo de tomateiro cv. Micro-Tom (B) primeira folha verdadeira de tomateiro cv. Micro-Tom

- *Extração de RNA*

O isolamento de RNA total das diferentes amostras foi feito seguindo as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 1  $\mu$ l de DNaseI Amplification Grade (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico das amostras. Em seguida, a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 130V (Figura 8). A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento Thermo NanoDrop 2000 (Uniscience). Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de PCR usando iniciadores específicos para um gene endógeno (Tubulina, número de acesso DQ205342.1). (Figura 8)



**Figura 8:** (A) Extração de RNA de folha jovem de tomateiro MT. 1, 2, 3, 4, 5: amostras WT. 6, 7, 8, 9, 10: amostras *procera* (B) Extração de RNA de ápice vegetativo de tomateiro MT. 1, 2, 3, 4, 5: amostras WT. 6, 7, 8, 9, 10: amostras *procera*. L: 1 kb plus DNA ladder.

- *Síntese de cDNA via pulsed stem-loop RT-PCR*

O RNA total, tratado com enzima DNase I tal como descrito anteriormente, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA por Pulsed RT-PCR (Figura 9) Varkonyi-



Gasic et al., 2007). O cDNA gerado foi utilizado para análise do *SlmiR159* e do *LeGAMYB1* nos órgãos citados anteriormente no mutante *procera*, em comparação ao MT selvagem. Para tanto foram utilizados os seguintes iniciadores:

**1- qLeGAMYB1F:** ACTCCTCTTCAGAGCCCACA

**2- qLeGAMYB1R:** AATGAAGGAAGAGCCGAATG

**3- Iniciadores RT– stem loop:**

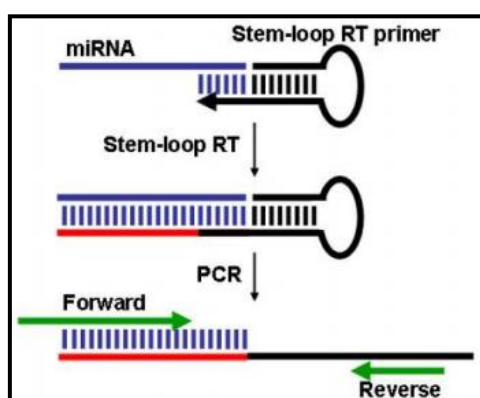
**qmiRNA159** GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATAC

**4- Iniciadores específicos para amplificação da seqüência madura de miRNAs:**

**qmiRNA159 Direto** GCGGCGTTGGATTGAAGGG

**qReverso Universal Reverso** GTGCAGGGTCCGAGG

Tal metodologia é utilizada com eficiência em tomateiro quando acoplada ao PCR quantitativo para avaliar o acúmulo de microRNAs (Feng et al., 2009).



**Figura 9:** Esquema do pulsed stem-loop RT-PCR retirado de (Varkonyi-Gasic et al., 2007). Iniciadores específicos stem-loop anelam na porção 3' das moléculas de miRNA maduro, iniciando sua transcrição reversa. Posteriormente, o miRNA maduro é amplificado utilizando-se iniciador direto específico e um iniciador reverso universal

- *Análise semi-quantitativa via RT-PCR*

Previamente à análise de expressão, a quantidade de cDNA utilizada em cada reação de PCR foi normalizada utilizando-se iniciadores específicos para o gene codificador de *tubulina* em tomate. Reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo cDNA das amostras ; 2,5µl de tampão Taq KCl 10x; 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM; 0,625µl de dNTPMix10mM; 1µl de cada iniciador a 10µM e 1.5U de *Taq DNA Polymerase*. As reações foram conduzidas a 94°C/2 minutos, seguidos de “n” ciclos de 94°C/20 segundos, 58°C/30 segundos, 72°C/40 segundos, finalizando com uma extensão final a 72°C/10 minutos. A reação de PCR RT negativo (RT-), ou seja, sem cDNA, foi realizada para garantir a ausência de contaminação com DNA genômico. O produto da PCR foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5%, em tampão de corrida TAE 1X, sob tensão constante de 100V.

*Cultivos, transformação genética e regeneração de plantas de tomateiro.*

Tanto o cultivo como a transformação e regeneração de plantas foram realizados com a colaboração do grupo do Professor Dr. Lázaro E. P. Peres, do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. O protocolo utilizado foi o desenvolvido pelo seu grupo de pesquisa e está descrito em Pino-Nunes et al., (2009). O uso de tomateiro MT e pré-

incubação com *Naphthalene acetic acid* (NAA), seguido da regeneração em 6-Benzilaminopurina (6-BAP), resulta em alta frequência de transformação, próximo de 40%. O procedimento de obtenção das plantas transgênicas levou aproximadamente 60 dias desde a infecção com *Agrobacterium* até a aclimatização das mesmas em casa de vegetação.

A transformação foi realizada para um total de 60 placas, cada uma contendo 25 explantes. Foram regenerados 50 explantes nos frascos (Figura 10).



**Figura 10:** Acompanhamento do desenvolvimento de plantas transformadas com a construção pDB159 após 35 dias de co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*.

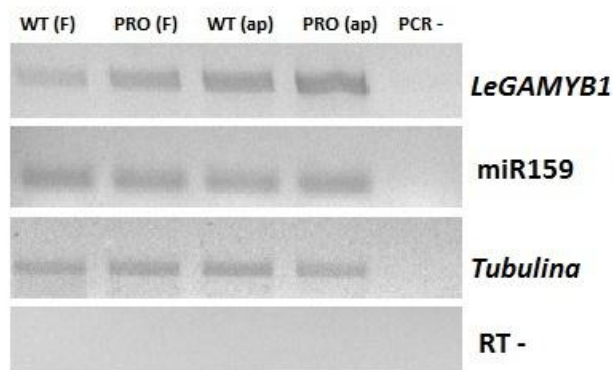
## 4. Resultados e Conclusão

### 4.1 Resultados

#### Análise da expressão do microRNA159 e do gene-alvo *LeGAMYB1* em plantas de tomateiro cv. Micro-Tom em comparação com o mutante *procera*.

Os dados da análise de expressão do gene *LeGAMYB1* confirmaram o que foi mostrado em LOMBARDI-CRESTANA (2012), ou seja, a expressão desse gene se mostrou aumentada no mutante *procera* (Figura 11). Esse fato deve-se, possivelmente, ao fato de que as proteínas com domínio tipo DELLA estarem reprimidas, devido à mutação pontual no gene *SIGAI* (*Solanum lycopersicum* GA insensitive), um repressor de crescimento tipo DELLA (BASSEL et al., 2008). O *GAMYB* está entre os genes com expressão bloqueada na presença de proteínas com domínio do tipo DELLA (SUN E GUBLER, 2004). Uma vez que essa proteína encontra-se reprimida o *LeGAMYB1* estaria, supostamente, em alta expressão nesse mutante.

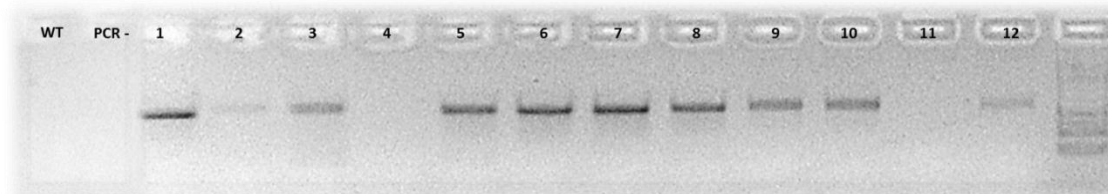
A análise do RT-PCR semi-quantitativo do microRNA159 não mostrou diferença de expressão entre o tomateiro MT e o mutante *procera*, em ambos os tecidos avaliados (Figura 11). Em mutantes de *arabidopsis gal-3*, que é deficiente em GA, com a falta das proteínas *DELLA GAI* e *RGA* (*gal-3 gai-t6 rga-24* mostrou-se que não houve diferença no acúmulo de transcritos do miR159 em comparação ao selvagem (ACHARD, 2004)



**Figura 11:** Análise via Steem-loop RT-PCR do micro RNA159 e do gene *LeGAMYB1* em amostras de folha (F) do selvagem e do mutante *procera* – WT (F) e PRO (F) respectivamente- e amostras de ápice vegetativo (ap) do selvagem e do mutante *procera* – WT (ap) e PRO (ap) respectivamente.

### Caracterização genotípica das plantas transgênicas

Após a transformação, as plantas T1 (primeira geração de transformantes) regeneradas *in vitro* foram transferidas para aclimação em casa-de-vegetação na UNESP-Botucatu para aclimação e caracterização fenotípica e molecular. Foram coletadas folhas de todas os eventos de transformação e realizada extração de DNA genômico seguindo o método CTAB descrito por DOYLE; DOYLE, 1987. A qualidade do DNA extraído foi avaliada realizando PCR com iniciadores referentes ao gene. Foi realizado, posteriormente, PCR com iniciadores específicos do transgene (Figura 12). O iniciador direto se anela no promotor CaMV35S enquanto que o iniciador reverso no final do lócus *SIMIR159*.



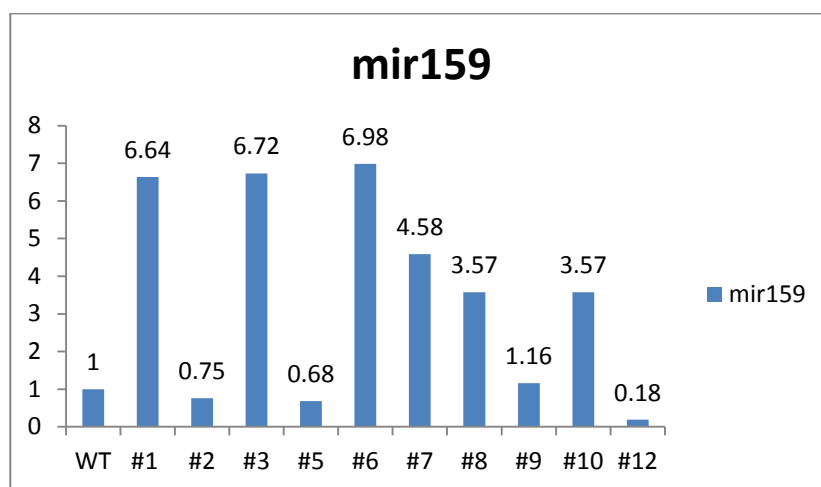
**Figura 12:** Análise genômica dos 12 eventos transgênicos obtidos. A banda corresponde ao *amplicon* gerado pelo iniciador direto posicionado no promotor 35S e o iniciador reverso no final da sequência correspondente a *MIR159*. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12: eventos positivos. 4 e 11: eventos negativos.

### Análise do acúmulo de transcritos via RT-qPCR

Iniciadores específicos foram desenhados baseados nas sequências identificadas, levando em consideração características como Tm (Temperatura de *melting*), a formação de dímeros (*cross-dimers* e *self-dimers*) e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*), analisadas no software *Beacon designer* (<http://www.premierbiosoft.com>). No caso dos genes-alvo, os iniciadores foram localizados flanqueando o sitio de reconhecimento do miR159. Desta forma, garantiu-se que apenas transcritos não clivados fossem amplificados.

Material de tecido foliar de plantas MT de dez eventos transgênicos (1,2,3,5,6,7,8,9,10,12), foram avaliados em relação ao acúmulo de transcritos do miR159 e do gene alvo *GAMYBI* (dado não mostrado) por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Utilizou-se tecidos de folhas como material vegetal para extração de

RNA total e posterior síntese de cDNA pelo método pulsed RT-PCR. Como controles, foram usadas plantas selvagens crescidas nas mesmas condições.



**Figura 13:** RT-qPCR mostrando o acúmulo dos transcritos miR159 nos diferentes eventos de transformação. **WT-** plantas MTe #, diferentes eventos de transformação. O nível do transcrito é representado no eixo Y como uma razão (expressão relativa) do valor da expressão do miR159 pelo valor da expressão do gene normalizador Tubulina. No eixo X estão representadas os eventos de transformação avaliados.

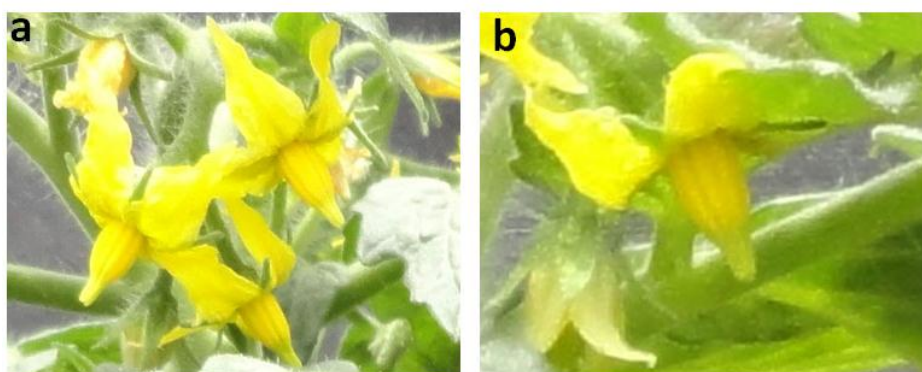
O gráfico (Figura 13) indica a análise quantitativa da expressão via RT-qPCR das amostras indicadas anteriormente. Nota-se no que a expressão das amostras 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12 (eventos positivos – Figura 13) para o miRNA159. As amostras 1, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 mostraram expressão aumentada do miRNA159 quando comparadas com o selvagem (WT), atestando a funcionalidade do cassete de expressão 35S:miRNA. Já o gráfico. Em relação á análise quantitativa via RT-qPCR do gene alvo *LeGAMYB1* não foi possível tirar conclusão significativa (dados não mostrados).

#### Caracterização fenotípica das plantas transgênicas contendo o transgene p35S::SlyMIR159

Os eventos que apresentaram expressão aumentada do miR159 as plantas apresentaram frutos partenocárpicos (Figura 14). A análise de expressão mostrou que alguns eventos de transformação não apresentaram expressão acentuada do miR159, ainda que a presença do transgene tenha sido confirmada. Portanto, estes eventos foram descartados. No entanto, nos eventos onde houve aumento de expressão do transgene, as plantas apresentaram formação de frutos paternocárpicos (Figura 14). Ainda que os eventos gerados no presente trabalho tenham sido analisados na geração inicial de transformação (transformante 0 ou T0), não foram observados os fenótipos encontrados nas flores de arabis que superexpressam o miR159 (Figura 15). Porém, não houve formação de sementes nos respectivos frutos dos tomateiros, ou seja, os frutos foram partenocárpicos.



**Figura 14** - Comparação entre três eventos *p35S:SlyMIR159* gerados e o cultivar selvagem evidenciando a presença de frutos paternocárpicos. MT planta de tomateiro não transformada. # evento de transformação.



**Figura 15** - Comparação morfológica entre (a) flores MT e (b) flores provenientes de transgênico contendo o cassete de expressão *p35S:SlyMIR159*, evidenciando nenhuma diferença morfológica aparente.

## 4.2 Conclusão

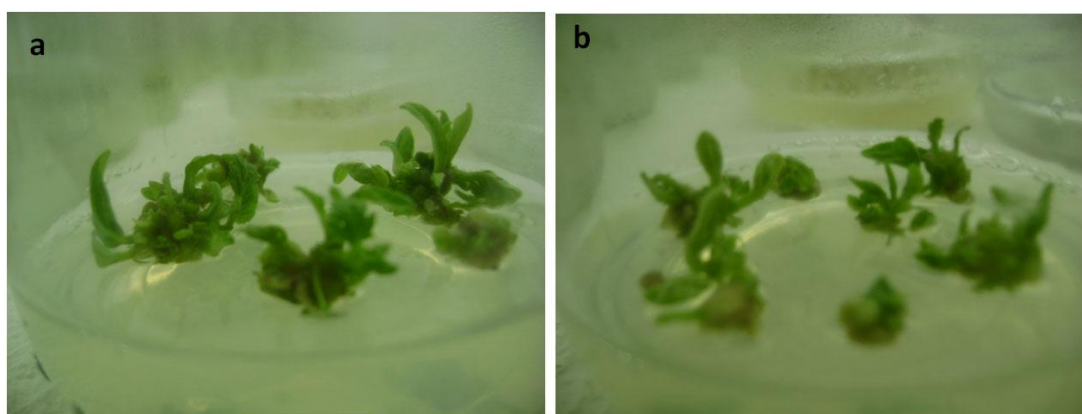
Os membros da família miR159 são já conhecidos como reguladores de fatores de transcrição codificados pelos genes *MYB* ou *GAMYB-like*, os quais respondem ao fitohormônio giberelina (GA) (Gubler et al., 1995). Plantas transgênicas de arábidoopsis que superexpressam o miR159 apresentaram atraso no tempo de florescimento e anteras defeituosas (Achard et al., 2004). Porém, devido às características do desenvolvimento de arábidoopsis, tais como: sensibilidade ao fotoperíodo, crescimento monopodial, fruto pequeno e seco (silíqua), ainda permanecem algumas perguntas à serem respondidas

relacionadas às vias orquestradas pelo miR159 em outros aspectos do desenvolvimento vegetal.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que, em cana-de-açúcar, o padrão de expressão do miR159 é elevado em gemas laterais inativas, enquanto os níveis de transcritos do *SsGAMYB* (Ortiz-Morea et al 2013) é pouco detectado. A expressão do gene *SsGAMYB* é aumentada durante o desenvolvimento da gema, provavelmente, em resposta à diminuição do miR159 (Ortiz-Morea et al 2013). Porém, embora seja um dado importante, não há outros dados na literatura correlacionando o papel funcional do miR159 à brotação lateral.

Os resultados da análise de acúmulos de transcritos do miR159, via RT-qPCR, neste trabalho mostram que a maior parte dos eventos transgênicos gerados tinham o cassete de expressão *p35S::SIMIR159* funcional, evidenciado pela expressão aumentada do miR159. Apesar de não ter sido observada diferença entre os fenótipos das flores do MT e dos eventos gerados o fato de os frutos não apresentarem sementes pode corroborar com o dado de Archard, et. al (2004) que mostrou que em plantas transgênicas de arabis que superexpressam o *MIR159*, produzem silíquas não viáveis e não possuem a capacidade de liberar pólen.

Para avaliar de maneira mais detalhada o papel do miR159 no desenvolvimento floral e conseqüentemente no desenvolvimento de fruto, plantas *p35S::SlyMIR159* de tomateiro estão sendo novamente geradas (Figura 16a), em conjunto com plantas contendo o vetor pK7WG2 que serão utilizadas como controle negativo nos experimentos (Figura 16b).



**Figura 16** – Explantes de tomateiro em fase de regeneração *in vitro* transformados com (a) *p35S::SlyMIR159* e (b) controle com o vetor pK7WG2 “vazio” para utilizar como controle nas análises a serem realizadas.

Nos novos eventos que estão sendo gerados, análises anatômicas das flores em diferentes estádios de desenvolvimento serão realizadas e deverão contribuir para a caracterização fenotípica dos órgãos reprodutivos. Também será avaliada a expressão de genes selecionados visando correlacionar os dados anatômicos e morfológicos com dados moleculares.

Como mencionado anteriormente, a análise da expressão do gene *GAMYB1* não gerou conclusão significativa. O miRNA159 tem como alvo de silenciamento o gene *LeGAMYB1*, porém o silenciamento por microRNAs pode acontecer de duas maneiras: através da clivagem do gene alvo, o que resultaria diminuição da expressão do gene alvo ou

através do impedimento da tradução, uma vez que acoplado ao gene alvo, o miRNA (aderido ao complexo RISC) impede a passagem do complexo ribossomal no processo de tradução (Li et al, 2014). Dessa maneira não haveria uma diminuição da expressão de transcritos do gene alvo, mas uma diminuição da proteína traduzida por esse gene alvo. Novas análises a partir de proteínas do gene GAMYB e a partir da construção de outro cassete de expressão utilizando o gene GAMYB serão realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular e Desenvolvimento Vegetal, dando continuidade ao trabalho.

## 5. Referências Bibliográficas

ACHARD, P. HERR, A.; BAULCOMBE, D. C.; HARBERD, N. P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, Cambridge, v. 131, n. 14, p. 3357-3365, Jul 2004.

ADVANCE, T. Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues, 2, 140-151. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02766.x. (2006).

ALONSO-PEREAL, M.; LI, J.; LI, Y.; ALLEN, R.; SCHNIPPENKOETTER, W.; OHMS, S.; WHITE, R.; MILLAR, A. The microRNA159-regulated *GAMYB-like* genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis* *Plant Physiology*, 154, p. 757 (2010).

AYA, K.; UEGUCHI-TANAKA, M.; KONDO, M.; HAMADA, K.; YANO, K.; NISHIMURA, M.; MATSUOKA, M. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of *GAMYB*. *Plant Cell* 21: 1453–1472 (2009).

BASSEL, G. W., MULLEN, R. T., E BEWLEY, J. D. (2008) Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*. 59, n. 3, pp. 585–593.

BREWER, P.; DUN, E.; FERGUSON, B.; RAMEAU, C.; BEVERIDGE, C. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 150, n. 1, p. 482-493 (2009).

CHAO, W.S.; FOLEY, M.E.; HORVATH, D.P. & ANDERSON, J.V. Signals Regulating Dormancy in Vegetative Buds. *Developmental Biology* (2007).

CHEN, X. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Palo Alto, v. 25, p. 21-44, 2009.

CUBAS, P.; LAUTER, N.; DOEBLE, J.; COEN, E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant Journal*, Oxford, v. 18, n. 2, p. 215-222 (1999).

DAN, Y.H.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.L.; ARMSTRONG, C.L. MicroTom-a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Reports*, New York, v. 25, n. 5, p. 432-441, May 2006

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of

fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, n. 1, p. 11-15 (1987).

DIAZ, I.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; ABRAHAM, Z.; MARTINEZ, M.; ISABEL- LAMONEDA, I.; CARBONERO, P. The *GAMYB* protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *Plant Journal*, 29, p. 453–464 (2002).

DOUST, A. Grass architecture: genetic and environmental control of branching. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, p. 21-25 (2007).

EMERY, J.; FLOYD, S.; ALVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N.; IZHAKI, A.; BAUM, S.; BOWMAN, J. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class *IIIHD-ZIP* and *KANADI* genes. *Current Biology*, Davis, 13, n. 20, p. 1768-1774 (2003).

FAHLGREN N, HOWELL MD, KASSCHAU KD, CHAPMAN EJ, SULLIVAN CM, CUMBIE JS, GIVAN SA, LAW TF, GRANT SR, DANGL JL, et al. Highthroughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* 2: e219. (2007)

FENG, J.; WANG, K.; LIU, X.; CHEN, S.; CHEN, J. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. *Gene* , 437, n. 1/2, p. 14-21 (2009).

GOCAL, G.F.W.; SHELDON, C.C.; GUBLER, F.; MORITZ, T.; BAGNALL, D.J.; MACMILLAN, C.P.; LI, S.F. et al. *GAMYB-like* Genes , Flowering , and Gibberellin Signaling in *Arabidopsis* 1. *Society*, 127 p. 1682-1693 (2001).

GONG, X.; BEWLEY, J.D. A *GAMYB-like* gene in tomato and its expression during seed germination. *Planta*, 563-572. doi:10.1007/s00425-008-0759-4 (2008).

GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, J.; JACOBSEN, J. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for *Myb* transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* , 7 p. 1879-1891 (1995).

GUBLER, F.; WATTS, R.J.; KALLA, R.; MATTHEWS, P.; KEYS, M.; & JOHN, V. Cloning of a Rice cDNA Encoding a Transcription Factor Homologous to Barley *GAMYB*. *Plant Cell*, 38(3), 362-365 (1997).

GUBLER, F.; CHANDLER, P.M.; WHITE, R.G.; LLEWELLYN, D.J.; AND JACOBSEN, J.V. Gibberellin signaling in barley aleurone cells: Control of *SLN1* and *GAMYB* expression. *Plant Physiology*, 129, p. 191–200 (2002).

HEDLEY, P.E.; RUSSELL, J.R.; JORGENSEN, L.; GORDON, S.; MORRIS, J.A.; HACKETT, C.A.; CARDLE, L. et al. Candidate genes associated with bud dormancy release in blackcurrant ( *Ribes nigrum* L .). *BMC Plant Biology*, 10, p. 1-13 (2010).

JIMÉNEZ, S.; LI, Z.; REIGHARD, G.L.; BIELENBERG D.G. Identification of genes associated with growth cessation and bud dormancy entrance using a dormancy-incapable tree mutant. *BMC Plant Biology*, v.10, p. 1471-2229 (2010).



JONES, H.D.; SMITH, S.J.; DESIKAN, R.; PLAKIDOU-DYMOCK, S.; LOVEGROVE, A.; HOOLEY, R. Heterotrimeric G Proteins Are Implicated in Gibberellin Induction of  $\alpha$ -Amylase Gene Expression in Wild Oat Aleurone. *The Plant Cell*, v. 10, p. 245–253, February 1998.

JONG, M.D.; MARIANI, C. & VRIEZEN, W.H. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Access*, 60(5), 1523-1532. doi:10.1093/jxb/erp094 (2009).

JUAREZ, M.; KUI, J.; THOMAS, J.; HELLER, B.; TIMMERMANS, M. MicroRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, 428, p. 84-88 (2004).

KANEKO, M.; INUKAI, Y.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ITOH H.; IZAWA T.; KOBAYASHI Y.; HATTORI T.; MIYAO A.; HIROCHIKA H.; ASHIKARI, M. et al. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair  $\alpha$ -amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell*, 16, p. 33–44 (2004).

KARNOVSK.MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 27, n. 2, p. A137-&, 1965

KOYAMA, T.; FURUTANI, M.; TASAKA, M.; OHME-TAKAGI, M. *TCP* transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, p. 473–484 (2007).

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, n. 5543, p. 853-858 (2001).

LAUFS, P.; PEAUCELLE, A.; MORIN, H.; TRAAS, J. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development*, 131, p. 4311-4322 (2004).

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C-elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 5, p. 843-854 (1993).

LI, J.; REICHEL, M.; MILLAR, A. Determinants beyond both complementarity and cleavage govern MicroR159 efficacy in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 10 (3):e1004232. doi:10.1371/journal.pgen.1004232 (2014).

LIU, Q.; CHEN, Y. Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384, n. 1, p. 1-5. (2009).

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25, n. 4, p. 402-408 (2001).

LOMBARDI-CRESTANA, S.; DA SILVA AZEVEDO, M.; SILVA, G.F.; PINO, L.E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FIGUEIRA, A.; NOGUEIRA, F.T.S.; PERES, L.E. The tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) natural genetic variation Rg1 and the DELLA mutant procerca control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. *Journal Experimental Botany*. 2012 Sep;63(15):5689-703. doi: 10.1093/jxb/ers221. Epub 2012 Aug 21.

LOZANO, R.; GIMENEZ, E.; CARA, B.; CAPEL, J.; ANGOSTO, T. Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, Washington, v. 53, n. 8-10, p. 1635-1648, 2009

LU, S.F.; SUN, Y.H.; SHI, R.; CLARK, C.; LI, L.G.; CHIANG, V.L. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, Rockville, v. 17, n. 8, p. 2186-2203, Aug 2005.

MALLORY, A.C.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1360-1375, May 2005.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S.K.; CALDWELL, C.G.; LIU, X.L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D.K.; MENASCO, D.J.; WAGONER, W.; LIGHTNER, J.; WAGNER, D.R. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell*, Rockville, v. 15, n. 8, p. 1689-1703, Aug 2003.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. *Plant Journal*, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, Dec 1997.

MOUNET, F.; MOING, A.; GARCIA, V.; PETIT, J.; MAUCORT, M.; DEBORDE, C.;

BERNILLON, S.; LE GALL, G.; COLQUHOUN, I.; DEFERNEZ, M.; GIRAUDELL, J. L.; ROLIN, D.; ROTHAN, C.; LEMAIRE-CHAMLEY, M. L. Gene and Metabolite

Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development.

*Plant Physiology*, 149, n. 3, p. 1505-1528 (2009).

MURRAY, F.; KALLA, R.; JACOBSEN, J.; and GUBLER, F. (2003). A role for HvGAMYB in anther development. *Plant J*. 33: 481–491.

NAVARRO, L. DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINET, O.; JONES, J. D. G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, Washington, v. 312, n. 5772, p. 436-439, Apr 21 2006.

NOGUEIRA, F.; MADI, S.; CHITWOOD, D.H.; JUAREZ, M.T.; TIMMERMANS M.C. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Development*, 21, p. 750-755 (2007).

NOGUEIRA, F.; CHITWOOD, D.H.; MADI, S.; OOHTSU, K.; SCHNABLE, P.S.; SCANLON, M.J.; TIMMERMANS, M.C.P. Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *Plos Genetics*, 5, n. 1, p. 1-8 (2009).

ORI, N.; COHEN, A.R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J.P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature Genetics*, New York, v. 39, n. 6, p. 787-791, Jun 2007.

ORTIZ-MOREA, F.A. Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo (2010).

PENSON, S.P.; SCHUURINK, RC; FATH, A.; GUBLER, F.; JACOBSEN, J.V.; JONES, R.L. cGMP 1s Required for Gibberellic Acid-Induced Gene

Expression in Barley Aleurone. *The Plant Cell*, v. 8, p. 2325-2333, December 1996.

PINO-NUNES, L.; FIGUEIRA, A.V.; TULMANN NETO, A.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F.A.; SILVA, J.A.; BERNARDI, W.F.; PERES, L.E.P. Induced Mutagenesis And Natural Genetic Variation In Tomato'micro-Tom'. 2008. *Acta Horticulturae*, The Hague, P.63-72.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. *Plant Methods*, 6 (2010).

REINHARDT, D.; KUHLEMEIER, C. Plant architecture. *Embo Reports*, v. 3, n. 9, p. 846-851 (2002).

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. Prediction of MicroRNAs in plants (vol 16, pg 1616, 2002). *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 17, p. 2313-2313, Sep 1 2002.

REYES, J.; CHUA, N. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 49, n. 4, p. 592-606 (2007).

RIECHMANN J.L.; HEARD J.; MARTIN G.; REUBER L.; JIANG C.; KEDDIE J.; ADAM L.; PINEDA O.; RATCLIFFE O.J.; SAMAHA R.R. et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105–2110 (2010).

RIEU, I.; RUIZ RIVERO, O.; FERNANDEZ GARCIA, N.; GRIFFITHS, J.; POWERS, S. J.; GONG, F.; LINHARTOVA, T.; ERIKSSON, S.; NILSSON, O.; THOMAS, S.G. The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *The Plant Journal*, 53, n. 3, p. 488-504 (2008).

SACKS, E.J.; GERHARDT, L.M.; GRAHAM, E.B.; JACOBS, J.; THORRUP, T.A.; STCLAIR, D.A. Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L-peruvianum* (L.) Mill. *Annals of Botany*, 80, n. 4, p. 469-477 (1997).

SERRANI, J.C.; SANJUAN R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCI, L. & SANJUA, R. Gibberellin Regulation of Fruit Set and Growth. *Plant Physiology*, 145(1): 246-257. doi:10.1104/pp.107.098335 (2007).

SHIMIZU-SATO, S.; MORI, H. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, 127, n. 4, p. 1405 (2001).

SCHMITZ, G.; THEREZ, K. Shoot and inflorescence branching. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, n. 5, p. 506-511 (2005).

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, Kyoto, v. 47, n. 3, p. 426-431, Mar 2006

TAKEDA, T.; SUWA, Y.; SUZUKI, M.; KITANO, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M.; UEGUCHI, C. The *OsTb1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant Journal*, 33, n. 3, p. 513-520 (2003).

TSUJI, H.; AYA, K.; UEGUCHI TANAKA, M.; SHIMADA, Y.; NAKAZONO, M.; WATANABE, R.; NISHIZAWA, N.; GOMI, K.; SHIMADA, A.; KITANO, H. *GAMYB* controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *The Plant Journal*, 47, n. 3, p. 427-444 (2006).

UEGUCHI-TANAKA, M.; FUJISAWA, Y.; KOBAYASHI, M.; ASHIKARI, M.; IWASAKI, Y.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Rice dwarf mutant d1, which is defective in the a subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. 11638–11643 u *PNAS*, v. 97, no. 21, p. 11638–11643, October, 2000.

VÁLÓCZI, A.; VÁRALLYAY, É.; KAUPPINEN, S.; BURGÁN, J.; HAVELDA, Z. Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *The Plant Journal*, 47: 140–151. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02766.x (2006).

VAUCHERET, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 7, p. 759-771, Apr 1 2006.

ZHANG, X.; ZOU, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; HAN, Q.; HU, T.; XU, X.; LIU, H.; LI, H.; YE, Z. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. *FEBS letters*, Amsterdam, ;585(2):435-9. v.585,n. 2, p. 435-439, 2010.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 2003, 31(13):3406-3415.

YAMAUCHI Y.; TAKEDA-KAMIYA N.; HANADA A.; OGAWA M.; KUWAHARA A.; SEO M.; KAMIYA Y.; YAMAGUCHI S. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiology* 48:555–561. doi:10.1093/pcp/pcm023 (2007).

YAMAGUCHI, A.; WU, M.F.; YANG, L.; WU, G.; POETHIG, R.S.; WAGNER, D. The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental Cell*, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 268-278, Aug 18 2009.

WOODGER, F.; MILLAR, A.; MURRAY, F.; JACOBSEN, J.; GUBLER, F. The role of *GAMYB* transcription factors in GA-regulated gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, n. 2, p. 176-184 (2003).

XIE, K.; WU, C.; XIONG, L. Genomic organization, differential expression, and interaction of *SQUAMOSA* promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology*, 142, p. 280-293 (2006).