

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/12/2015.

Interação entre o gene *TKN2* (*KNOX-type I*) e o *miR156*
node durante a transição de fase vegetativa para
reprodutiva em tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

Mike Anderson Corazon Guivin

Botucatu

2014

Instituto de Biociências – Seção de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6148 fax 14 3815 3744 posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Interação entre o gene *TKN2* (*KNOX-type I*) e o *miR156*
node durante a transição de fase vegetativa para
reprodutiva em tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

Mestrando: MIKE ANDERSON CORAZON GUIVIN

Orientador: Prof. Dr. FABIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para a obtenção do título de Mestre no
programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas. área de concentração Genética.*

**Botucatu
2014**

*Instituto de Biociências – Seção de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6148 fax 14 3815 3744 posgraduacao@ibb.unesp.br*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fábio T. S. Nogueira por todo o aprendizado, em especial, por ter me ensinado a começar a pensar criticamente como cientista. Agradeço pela orientação e confiança depositada. Sou muito grato por tudo.

Ao professor Dr. Lázaro E. P. Peres ESALQ/USP, pela disponibilidade do material vegetal utilizado no trabalho de mestrado. Agradeço também pela acolhida no Laboratório de Desenvolvimento Vegetal.

Ao programa de Pós-graduação em Genética pela compreensão e apoio para a culminação deste trabalho.

Aos meus pais (Amparo Guivin Pinedo e Exsiquiel Corazon Lopez) e irmãos Fiorella e Fernando por todo o apoio incondicional durante minha escolha em continuar a carreira científica.

Aos amigos do IIAP-SM Geomar, Henry, e Marcos por mostrar interesse e preocupação com o andamento do meu trabalho.

Aos meus parceiros de casa Marcos e James por me apoiar sempre e quando eu precise de ajuda.

Ao meu grande amigo Juan Carlos, pela amizade e apoio incondicional em todo momento.

Aos membros do meu Laboratório do LGMDV: Eder, Gicela, Geraldo, Carlos, Cristiane, Vitor e Debora por todos os momentos gratos e apoio durante a realização do presente trabalho.

Resumo

O desenvolvimento das plantas depende da atividade de um grupo de células em divisão chamado de meristema. Extensas análises genéticas identificaram os principais reguladores do meristema apical vegetativo (SAM), os quais controlam o desenvolvimento de todos os órgãos aéreos. Dentre eles, há um grupo de homeoproteínas denominadas TALE (three-amino-acid-loop-extension); esta família contém os membros KNOTTED-like homeodomain (KNOX) e BELL-like Homeodomain (BELL), que funcionam como homodímeros ou heterodímeros, para regular a expressão de seus genes alvos mediante sua ligação à sequências específicas no DNA. Em plantas com folhas compostas como o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), genes *KNOX* da classe I (*KNOX I*) são expressos no meristema, assim como também em folhas, flores e frutos, sugerindo que eles podem exercer várias funções nestes órgãos. Esta hipótese é corroborada pelos fenótipos intrigantes encontrados em mutantes com ganho de função dos genes *KNOX I*, cuja expressão ectópica afeta a forma da folha, pétala e frutos. Um exemplo é o tomateiro mutante *Mouse ear* (*Me*), que superexpressa o gene *TKN2* (*KNOX I*). Fenótipos semelhantes também foram observados em plantas transgênicas superexpressando o microRNA156 (*miR156*). Os MicroRNAs são uma nova classe de pequenas moléculas de RNA não codantes (20-25 nucleotídeos) que se encontram amplamente distribuídos no genoma de plantas e animais, regulando a expressão de seus genes alvos principalmente ao nível pós-transcricional. O *miR156* regula pós-transcricionalmente membros da família gênica do tipo *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (*SPL* ou *SBP-box*), os quais codificam fatores de transcrição específicos de plantas. Tais genes desempenham papéis importantes em diferentes aspectos do desenvolvimento. Para analisar a possível interação molecular entre o fator de transcrição *TKN2* e a via microRNA156/*SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (*miR156 node*), foi avaliado a expressão do *miR156*, seus alvos (*SBP-box*) e vários genes *downstream* do *miR156 node* em diferentes estágios de desenvolvimento de plantas *Me* homozigotas. Além disso, para avaliar a interação genética entre o gene *TKN2* e *miR156 node*, foi gerado o duplo mutante 156OE/*Me* através do cruzamento de plantas mutantes homozigotas *Me* com plantas transgênicas de

tomateiro que superexpressam o miR156 (denominadas 156OE). Os resultados mostraram que os níveis de expressão dos genes *SlySBPs* (*SlySBP3*, *SlySBP6c* e *CNR*) alvos do miR156 e os genes *MADS-box MACROCALYX* (*MC*) e *FUL1/TDR4*, assim como *FALSIFLORA* (*FA*), genes de identidade no meristema floral, diminuem no ápice vegetativo de plantas mutantes *Me* com 14 DAG (dias após a germinação). Estes dados, aliados com incremento no acúmulo do miR156 e uma redução do miR172, possível alvo direto das *SlySBPs*, sugerem que o fator de transcrição *TKN2* direta ou indiretamente afeta o *miR156 node*. Adicionalmente, os dados fenotípicos do *Me* mostram um atraso significativo no tempo de florescimento, dominância apical reduzida e um maior número de folhas no eixo principal antes de formar o meristema floral, características muito semelhantes com as observadas nas plantas transgênicas 156OE. Além disso, o duplo mutante 156OE/*Me* apresentou fenótipos similares e contrastantes quando comparados com plantas *Me* e transgênicas 156OE. Em conjunto, nossos dados sugerem uma possível interação entre o gene fator de transcrição *TKN2* e o *miR156 node* nos ápices vegetativos, atrasando a transição de fase vegetativa para reprodutiva.

Palavras chaves: *miR156 node*, *SlySBP*, 156OE, *Mouse ear* (*Me*) e 156OE/*Me*, florescimento, Tomateiro.

Abstract

Plant development depends on the activity of a group of dividing cells called meristem. Extensive genetic analyses have identified the major regulators of the shoot apical meristem (SAM), which control the development of all aerial organs. Among them, the three-amino-acid- loop-extension (TALE) class of homeoproteins; this family contains the KNOTTED-like homeodomain (KNOX) and BELL-like Homeodomain (BELL) members, which function as heterodimers or homodimers, to regulate expression of their target genes by binding to specific sequences in DNA. In plants with compound leaves as tomato (*Solanum lycopersicum*), KNOX I are expressed in the meristem, as well as on leaves, flowers and fruits, suggesting that they may play various roles in these organs. This hypothesis is supported by the intriguing phenotypes found in mutants with gain-of function of *KNOX I* genes, whose ectopic expression affects leaf, petal and fruit shape. An example, is the tomato mutant *Mouse ear* (*Me*), which overexpress the gene *TKN2* (*KNOX I*). Similar phenotypes were also observed in transgenic plants overexpressing microRNA156 (miR156). MicroRNAs are a class of small no-coding RNAs (20-25 nucleotides) that are widely distributed in the genome of plants and animals, regulating the expression of their target genes by acting mainly at the post-transcriptional level. miR156 regulated post-transcriptionally most *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (*SPL* or *SBP-box*) genes, which encode plant-specific transcription factors. These genes play important roles in different aspects of development. To examine a possible molecular interaction between *TKN2* transcription factor and microRNA156/*SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* module (*miR156 node*), it was evaluated the expression of miR156, its targets (*SBP-box*) and several genes *downstream* of *miR156 node* in different stages of the development of homozygous *Me* plants. Moreover, to evaluate the genetic interaction between *TKN2* and *miR156 node*, it was generated a 156OE/*Me* double mutant by crossing of *Me* mutant with transgenic plants overexpressing miR156 (called 156OE). The results showed that the expression levels of *SlySBPs* genes (*SlySBP3*, *SlySBP6c* and *CNR*) targets of miR156, and *MADS-box* genes *MACROCALYX* (*MC*) and *FUL1/TDR4*, as *FALSIFLORA*

(*FA*), floral meristem identity genes, decrease in the vegetative apex of *Me* mutant plants 14 DAG (days after germination). These data, combining with an increase of miR156 transcript accumulation and a reduction of miR172, possible direct target of SlySBPs, suggest that the *TKN2* transcription factor, directly or indirectly, affects the *miR156 node*. Additionally, phenotypic data from the *Me* show a significant delay in time to flowering, reduced apical dominance, and a greater number of leaves on the main axis before forming the floral meristem, characteristics very similar to those observed in 156OE transgenic plants. In addition, the 156OE/*Me* double mutant showed similar and contrasting phenotypes when compared with *Me* mutant and 156OE transgenic plant. Together, our data suggest a possible interaction between the *TKN2* transcription factor and *miR156 node* in vegetative apices, delaying the transition from vegetative to reproductive phase in tomato cultivar Micro-Tom.

Keywords: *miR156 node*, *SlySBP*, 156OE, *Mouse ear (Me)* e 156OE/*Me*, Flowering, Tomato.

1. INTRODUÇÃO

A floração é um processo importante que determina a produção de frutos e sementes nas angiospermas (Thouet *et al.*, 2012). Após a transição floral, o meristema apical (SAM) muda de produção de folhas para inflorescências meristemáticas (IM), e inicia o meristema floral (FM) (Thouet *et al.*, 2012), ver figura 01. A transição de fase juvenil vegetativo para reprodutiva é coordenada pela atividade antagonista do microRNA156 (miR156) e microRNA172 (miR172) (Aukerman e Sakai, H. 2003; Lauter *et al.*, 2005; Chuck *et al.*, 2007). Os níveis de expressão do miR156 diminuem com a idade, enquanto o miR172 aumenta; os seus alvos, a família de genes *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL ou *SBP-box*), e a família de genes *APETALA2-like* (AP2-*like*), respectivamente, são expressos em padrões complementares. Estes miRNAs e seus alvos definem um módulo regulatório chamado de *miR156* e *miR172 nodes* (Rubio-Somoza e Weigel, 2011).

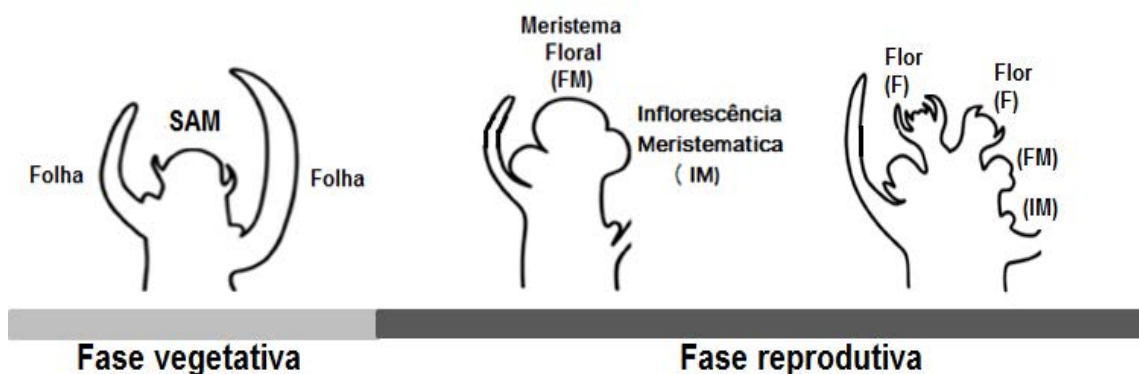


Figura 01. Esquema da transição de fase vegetativa para reprodutiva em plantas (modificado a partir de Smyth, 2006).

Os genes *SPL* ou *SBP-box* foram primeiramente caracterizados como reguladores da expressão de genes do tipo *MADS-box* durante os primeiros estágios do florescimento em *Antirrhinum majus* (Klein *et al.*, 1996). Em *Arabidopsis thaliana* foi confirmado que alguns *AtSPLs* ativam diretamente os membros da família *MADS-box* como *APETALA1* (*AP1*) e *FRUITFULL* (*FUL*), assim como *LEAFY* (*LFY*), genes que tem um papel importante na transição de fase vegetativa para reprodutiva (Wang *et al.*, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2009). Também foi mostrado que os genes *AtSPL9* e *AtSPL10* ativam o miR172; os alvos *AP2-like* deste miRNA também regulam o tempo de florescimento em *Arabidopsis*, onde foi mostrado que plantas que carecem destes genes

apresentam um florescimento precoce, enquanto que as plantas com superexpressão destes genes mostram floração tardia (Aukerman e Sakai, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). Além destes genes, os *FATORES DE RESPOSTA A AUXINA* (ARFs) também poderiam estar relacionados com a transição de fase. Foi demonstrado que plantas de *Arabidopsis* que apresentam elevados níveis de expressão dos genes *ARF3* e *ARF4* entram precocemente na fase reprodutiva (Adenot *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010). A possível conexão das ARFs com o *miR172* node foi apoiada pelo descobrimento que o gene *AP2-like* (alvo do miR172) liga-se diretamente no promotor do gene *ARF3* (Yant *et al.*, 2010).

Tanto em monocotiledôneas como em eudicotiledôneas, os membros específicos da classe de proteínas Knotted1-Like homeobox (KNOX I) e BELL-Like Homeobox (BELL) não só atuam para especificar o destino celular meristemático, mas também regulam a padronização dos tecidos dos entrenós, ramificação da planta e especificação floral durante o desenvolvimento da inflorescência (Hake *et al.*, 2004; Hay e Tsiantis, 2009; Hamant e Pautot, 2010). Em *Arabidopsis* foi demonstrado que as proteínas PENNYWISE (PNY) e POUND-FOOLISH (PNF), da família BELL, regulam a transição de fase vegetativa para a reprodutiva (Hamant e Pautot, 2010). O duplo mutante *pnf/pny* não completa a especificação floral produzindo um fenótipo de não florescimento (Smith *et al.*, 2004; Kanrar *et al.*, 2006; Kanrar *et al.*, 2008). Neste duplo mutante *pny/pny*, os níveis de expressão do miR156 aumentaram (Lal *et al.*, 2011). A expressão ectópica de *ATH1*, outro gene da família BELL, atrasa o florescimento em *Arabidopsis* (Proveniers *et al.*, 2007). Plantas *Lolium perenne* que expressam níveis altos de *ATH1* mostram um fenótipo de florescimento tardio, indicando que a função desta proteína é conservada (Van der Valk *et al.*, 2004). Estes resultados indicam que *ATH1* atua de forma oposta a PNF e PNY durante o desenvolvimento da inflorescência (Rutjens *et al.*, 2009). Baseado em estudos bioquímicos e de alinhamento de sequências, foi demonstrado que as proteínas KNOX I e BELL são associadas com um motivo de ligação semelhante (TGACAG/CT) (Hake *et al.*, 2004). Esta sequência é conservada em quase todos os precursores do miR156 que foram identificados em plantas (Lal *et al.*, 2011). Em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) o mutante dominante *Mouse ear* (Me) que expressa ectopicamente o gene *TKN2* (KNOX I),

apresenta folhas supercompostas, perda de dominância apical, além de modificações na estrutura floral e dos frutos (Parnis *et al.*, 1997). Fenótipos semelhantes também foram observados em plantas transgênicas superexpressando o miR156 (Silva *et al.*, 2014). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo central avaliar a possível interação entre o fator de transcrição *TKN2* (*KNOX 1*) e *miR156 node* na transição de fase vegetativa para a reprodutiva em tomateiro cv Micro-Tom.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

- O fator de transcrição TKN2 (KNOX I) tem um papel central na regulação da transição de fase vegetativa para reprodutiva em tomateiro, ativando direta ou indiretamente, a expressão do miR156, e consequentemente reprimindo a expressão de seus genes-alvos e vários genes *downstream* do *miR156 node*. Além disso, os genes *SlyARF3* e *SlyARF4* também foram desregulados pelo TKN2.