

Retrotransposon *Gret1* e a domesticação da uva*

Stela Barros Ribeiro¹, Rhewter Nunes², Isabela Pavanelli de Souza¹, Ivone de Bem Oliveira³,
Lanusse Andrade Fernandes Graziani⁴, Mariana Pires de Campos Telles^{2,5}

¹ Laboratório de Genética e Genômica de Plantas, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO

² Laboratório de Genética & Biodiversidade, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO

³ Blueberry Breeding and Genomics, Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO

⁵ Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO

Autor para correspondência - tellesmpc@gmail.com

Palavras-chave: DNA repetitivo, elementos transponíveis, variação genética, *Vitis vinifera*

* Material didático desenvolvido no contexto do Grupo de Trabalho vinculado ao INCT em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade, apoiado pelo projeto CNPq (Processo nº 402178/2016-5) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FINEG - Chamada nº 07/2014, Processo: nº 201410267001736).



Síndrome da

domesticação - A partir do surgimento da agricultura, espécies perderam algumas de suas características genéticas, morfológicas e comportamentais originais, pouco compatíveis com as necessidades humanas e adquiriram outras características que foram desde então conservadas.

Os elementos transponíveis são segmentos genômicos móveis cujas alterações podem ser transferidas para as futuras gerações, constituindo uma rica fonte de variação genética. Eles são responsáveis pela ocorrência de mutações em vários genes, muitas delas envolvidas com a domesticação de diversas plantas. Na videira (*Vitis vinifera* L.), as principais características da **síndrome da domesticação** incluem o surgimento do hermafroditismo, o aumento do teor de açúcar e a variação da cor das bagas. De acordo com tais características é apresentada uma caracterização do retrotransposon *Gret1*, elemento que altera a expressão de um dos genes responsáveis pela coloração das bagas em uva, chamado *MybA*. Também será discutido o papel dos elementos transponíveis na ampliação da diversidade genética e fenotípica, importantes para os processos de domesticação e evolução das plantas.

Expressão Fenotípica

- Refere-se às propriedades físicas observáveis em um organismo; estas incluem a aparência, o desenvolvimento e comportamento do organismo; Fenótipo.

Recombinação

- Processo pelo qual fragmentos do DNA são clivados e rearranjados para produzir novas combinações genéticas. Este processo cria diversidade genética relativa aos cromossomos, que refletem diferenças nas sequências de DNA de diferentes organismos.

Variabilidade genética

- Diferenças genéticas que ocorrem naturalmente entre organismos da mesma espécie.

Fluxo Gênico

- O movimento de alelos entre populações previamente separadas causadas por acasalamento.

AS MUTAÇÕES E A DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS

Apesar da existência de centenas de espécies de plantas que podem ser utilizadas para a alimentação humana, a civilização moderna depende de apenas algumas dessas espécies para a nutrição. Durante milhares de anos, muitas dessas plantas passaram por um processo de **seleção artificial** não intencional que transformou, na maioria dos casos, ancestrais selvagens em descendentes domesticados de alto rendimento e adaptados às necessidades humanas. A **expressão fenotípica** dessas espécies é controlada por genes que, apesar de serem estáveis, estão sujeitos a mudanças que permanecem no genoma por falhas nos sistemas de reparo durante a replicação do material genético, conhecidas como **mutações**.

Por meio da reprodução dos organismos, os genes, mutantes ou não, podem **recombinar**, dando origem à **variabilidade genética**. A variabilidade é a matéria prima para a seleção, seja ela natural ou artificial. O balanço entre a **seleção natural** e os demais fatores evolutivos como a **deriva genética** e o **fluxo gênico** determinam quais as combinações de genes serão propagadas às populações das diferentes espécies ao longo do tempo na natureza.

Estudos indicam que existiu um período em que a espécie humana realizou uma pressão de seleção nas primeiras plantas que foram cultivadas em função de características mais atrativas. Ao surgir um fenótipo de interesse, resultante de mutação, o homem selecionava, guardava as sementes e posteriormente propagava aquele material, utilizando os demais (aqueles que não possuíam o fenótipo de interesse) apenas para sua alimentação. Nesse caso, de maneira artificial, foi o homem e não a natureza o agente da seleção, marcando o início da domesticação das espécies.

Muitos cientistas acreditam que as mutações que ocorrem em regiões reguladoras de genes estão diretamente relacionadas às mudanças fenotípicas que contribuíram para a domesticação e diversificação em diversas espécies de plantas. Essas mutações podem ter origem por diversos eventos, tais como duplicações no genoma, inserções e deleções de bases, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), inserções de elementos transponíveis ou rearranjos cromossômicos em grande escala.

O QUE SÃO ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS?

Os elementos transponíveis (*Transposable Elements* - TEs) são fragmentos de DNA que têm a capacidade de se mover e ser inserido em novas posições do genoma, muitas vezes fazendo cópias de si mesmo durante esse processo. Quando ativos, devido à sua mobilidade e capacidade de **auto replicação**, os TEs tornam-se abundantes, compondo a maior porção de DNA repetitivo em diversos genomas e sendo responsáveis

Seleção artificial - Uso de metodologias e estratégias para melhoramento genético por meio da seleção de organismos com características desejáveis para se reproduzir; reprodução seletiva para testar a variação genética e covariação em uma população.

Mutações genéticas

- Mudanças em diferentes escalas de uma sequência de ácidos nucleicos. As mutações incluem desde mudanças pequenas, como a substituição de um único nucleotídeo em uma sequência de DNA, até mudanças maiores como alterações na estrutura e número de cromossomos.

Seleção natural

- Mecanismo evolutivo, proposto por Charles Darwin. Em razão dos recursos limitados no ambiente, os organismos com características hereditárias que favoreçam a sobrevivência e reprodução tendem a deixar mais descendentes do que os demais, o que faz com que essas características aumentem em frequência ao longo das gerações.

Deriva Genética

- Flutuações aleatórias no número de variantes genéticas em uma população. A deriva genética ocorre quando a ocorrência de formas variantes do gene, chamadas de alelos, aumentam e diminuem por acaso ao longo do tempo. Essas variações na presença de alelos são medidas como alterações nas frequências alélicas.

Auto replicação

- Processo pelo qual uma molécula de DNA de fita dupla é copiada para produzir duas moléculas de DNA idênticas.



Transposase - É uma enzima codificada por um gene presente em elementos transponíveis da classe II e que catalisa a reação de transposição, movimento do elemento para outra parte do genoma, por um mecanismo de corte e colagem.

Excisar - Cortar ou extrair.

Transcrito - Codificação de uma molécula de RNA a partir de uma molécula de DNA.

Transcriptase Reversa - enzima que polimeriza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA, o oposto do que comumente ocorre nas células.

Círculo rolante - Mecanismo de replicação unidirecional, quando apenas uma das fitas de DNA é usada como molde para formação de diversas cópias de si mesma.



por parte da variabilidade genética observada nos genomas de plantas.

Os TEs foram primeiramente descritos por Barbara McClintock em meados de 1940, durante estudos sobre quebras cromossômicas em milho, que renderam a ela o prêmio Nobel de Fisiologia em 1983. Na época de sua descoberta, os TEs foram nomeados “elementos controladores”, por estarem relacionados a alterações na expressão de genes que estivessem próximos aos locais de inserção dos mesmos. Hoje, sabe-se que eles podem constituir até 80% do DNA genômico de espécies como o milho e têm uma enorme influência na evolução e composição de genomas de plantas e animais.

Os TEs são divididos em duas classes de acordo com os seus mecanismos de replicação e transposição. Os elementos da classe I, também chamados de retrotransposons, utilizam um RNA intermediário cujo **transcrito** é utilizado como molde para um novo DNA, produzido através da atividade de uma **transcriptase reversa**. Após a produção, esse novo DNA é inserido no genoma hospedeiro por meio de uma enzima integrase ou endonuclease (Figura 1A). Esse mecanismo de transposição é também conhecido como *copia-e-cola* (*copy-and-paste*). Cada ciclo de replicação completo produz uma nova cópia, fazendo com que os retrotransposons sejam, muitas vezes, os principais contribuintes para a fração repetitiva em grandes genomas.

Os retrotransposons podem ser divididos em cinco ordens: retrotransposons LTR (*Long Terminal Repeat*), LINEs (*Long interspersed nuclear elements*), DIRs (*Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*), PLEs (*Penelopes*) e SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*). Os elementos da ordem LTR diferem dos demais por possuírem longas sequências de nucleotídeos, chamadas repetições terminais longas (LTRs) em suas duas extremidades (5' e 3'), que flanqueiam genes funcionais. Eles são os elementos encontrados com maior frequência em plantas, representando cerca de 35% das repetições do genoma de arroz, 41% do genoma de uva e 75% do genoma de milho. Tais achados sugerem que há uma correlação positiva entre o tamanho dos genomas e a quantidade de retrotransposons LTR.

Os elementos transponíveis da classe II, também conhecidos como transposons de DNA utilizam uma **transposase** para **excisar** um DNA e inseri-lo em outros locais, processo também conhecido como *cut-and-paste* (Figura 1B). A classe II contém duas subclasses que se distinguem pelo número de cadeias de DNA que são cortadas durante a transposição. A subclasse I compreende os elementos da ordem TIR (*Terminal Inverted Repeats*), caracterizados por suas repetições terminais invertidas de comprimento variável. Os *Helitrons* compreendem a subclasse II dos transposons de DNA, que se diferenciam dos demais quanto ao mecanismo de transposição que ocorre por meio de **círculo rolante**, juntamente com os *Mavericks*, que se movimentam via excisão de uma única fita de DNA seguida de replicação extracromossômica.

ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS SÃO FONTE DE VARIABILIDADE GENÉTICA

As atividades dos TEs nos genomas constituem uma importante fonte de variabilidade genética em plantas. A inserção desses elementos foi responsável pela ocorrência de mutações em 15% dos genes envolvidos com o processo de domesticação e diversificação em diversas plantas como arroz, cevada, morango e tomate. Embora a maior parte das atividades dos TEs não afete os fenótipos das plantas, há vários casos de associação com características relacionadas à domesticação por meio da inserção dessas sequências móveis em genes ou em suas regiões reguladoras. Isso já foi relatado em laranjas, onde a inserção de um retrotransposon no gene que confere a cor da polpa foi responsável pelo surgimento do mutante *Ruby*, dando origem à variedade de frutos com polpa avermelhada, conhecida como *Blood Orange*.

Tanto inserções quanto outros rearranjos estruturais causados pela atividade de TEs podem fornecer uma rica fonte de diversidade fenotípica que pode ter sido selecionada durante o processo de domesticação, seja diretamente, por meio das mutações nos genes, ou indiretamente, por alterações na regulação da expressão gênica. Um dos casos mais famosos envolvendo TEs e domesticação de

plantas é o do milho, organismo no qual estes elementos foram observados pela primeira vez. O gene *tb1*, primeiro relacionado com a domesticação e isolado na espécie, possui a inserção do TE chamado de *Hopscotch*, na região que regula a sua expressão. A transi-

ção da planta teosinto selvagem para o fenótipo de milho atual é controlada, em grande parte, pelo aumento da expressão do gene *tb1*, que codifica proteínas responsáveis por reprimir o crescimento de hastes nas plantas de milho.

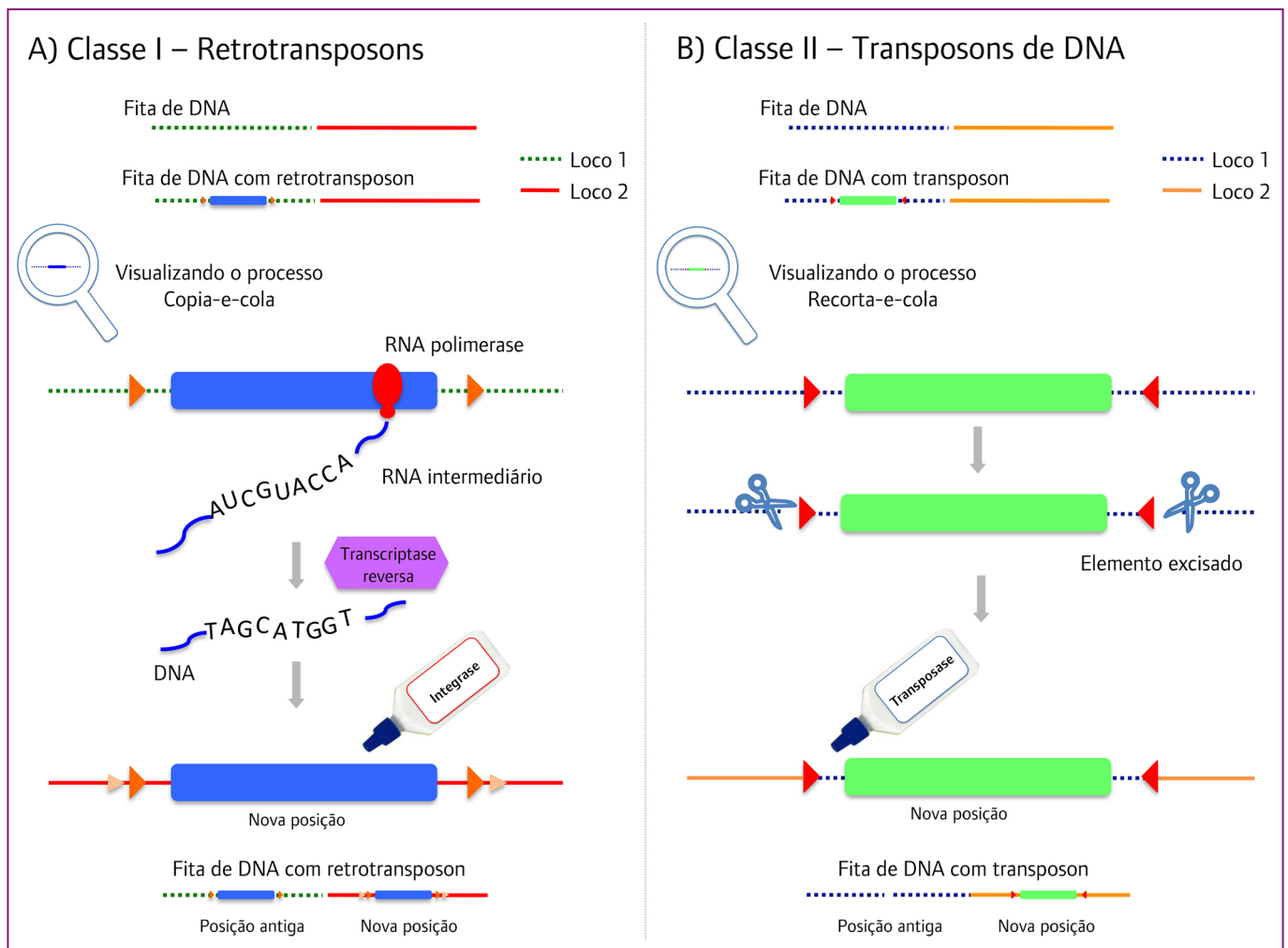


Figura 1. Classes dos elementos transponíveis. **A)** Mecanismo de Transposição “copia-e-cola”, que caracteriza os elementos transponíveis da classe I, também chamados de retrotransposons. **B)** Mecanismo de transposição “corta-e-cola”, que caracteriza os elementos transponíveis da classe II, também chamados de transposons de DNA.

Em uvas, levantamentos realizados acerca da quantidade de TEs no genoma da espécie indicam que esses elementos têm proliferado ativamente durante e após o processo de domesticação, contribuindo para a alta variabilidade genética encontrada no genoma da uva domesticada. Assim, podemos observar que apesar de terem sido considerados por muito tempo **DNA-lixo**, as atividades dos

TEs podem causar importantes modificações fenotípicas. As mutações ocasionadas por estes elementos nos genomas de plantas muitas vezes resultam em mudanças pouco prejudiciais a esses organismos, fazendo com que sejam transmitidas às próximas gerações ao invés de serem neutralizadas e corrigidas pelos sistemas reguladores.

DNA-lixo - Termo utilizado para se referir a DNA genômico que não codifica proteínas, e cuja função, se tiver uma, não é bem compreendida.

O RETROTRANSPONON *GRET1* E A COR DAS BAGAS EM UVA

Acredita-se que a uva tenha sido domesticada inicialmente no sudoeste da Ásia, durante o período Neolítico. Dados genéticos obtidos por meio de estudos que utilizaram marcadores moleculares sugerem também a ocorrência de centros de domesticação na Itália e na região do Mediterrâneo Ocidental. Do ponto de vista arqueológico, a domesticação da videira é um evento difícil de ser documentado devido à dificuldade em discriminar restos de videiras silvestres e domesticadas, que diferem entre si principalmente pelo ponto de vista reprodutivo, sendo as videiras silvestres **dióicas** e **alógamas**, enquanto a maioria das cultivadas é **hermafrodita** e **autógama**.

Vitis vinifera é a espécie de uva mais cultivada no mundo, sendo utilizada principalmente para produção de vinhos. Seus fenótipos incluem diversas cores de baga (preto, cinza, vermelho, rosa e branco), entretanto uma menor diversidade de cores é encontrada nas espécies selvagens. Dentre as 30 espécies de uva nativas da América do Norte, por exemplo, as cascas dos frutos são quase exclusivamente de cor preta com relatos raros de tipos vermelhos ou brancos.

A cor das bagas em uva é determinada pela quantidade de antocianinas na casca das frutas. A síntese de **antocianinas** é controlada por um único **lócus gênico**, encontrado no cromossomo 2 do genoma da uva (o genoma de uva é composto por um total de 19 cromossomos) e constituído por um grupo de três genes. Entre eles encontram-se os fatores de transcrição *VvMybA1* e *VvMybA2*, funcionalmente envolvidos na pigmentação das bagas. Acredita-se que o lócus responsável pela cor das bagas em uva seja um gene relacionado com a domesticação, uma vez que o tamanho, a forma e a cor das bagas são traços fenotípicos, que podem ter sido tradicionalmente selecionados por humanos, ao contrário de características como a forma das sementes que, provavelmente, não foi alvo de pressões seletivas na espécie.

Estudos genéticos sugerem que uma grande proporção das mutações relacionadas à perda de cor em uva é causada pela presença de TEs nos genes. Kobayashi e colaboradores em 2004 foram os primeiros a isolar um TE no genoma da espécie, o chamado *Gret1*, e sugeriram que uma mutação induzida por este elemento no gene *MybA1* poderia estar associada com a perda de pigmentação em algumas cultivares. Considerando como exemplo a variedade *Cabernet* que produz frutos com casca preta, a inserção do *Gret1* ocorreu na região promotora, o que causou a inibição da expressão do gene *MybA1*, dando origem à variedade *Chardonnay*, de bagas brancas (conhecidas por nós como uvas verdes). Um posterior rearranjo no *Gret1* causou uma reversão desse cenário, fazendo com que o gene *MybA1* voltasse a produzir antocianinas, porém em menores concentrações, dando origem a frutos com bagas coloridas, como na variedade *Ruby Okuyama* (Figura 2).

Após a descoberta do elemento *Gret1*, pesquisadores desenvolveram marcadores moleculares do tipo REMAP (*Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*) e IRAP (*Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism*) a partir da sequência completa do retrotransposon *Gret1*. Com esses marcadores, eles estimaram a distribuição do elemento no genoma das variedades estudadas e perceberam que o número de cópias do *Gret1* estava associado à cor dos frutos em uva. Essa informação foi confirmada em 2008, por um estudo onde foram analisadas 22 espécies de uvas selvagens, utilizando marcadores moleculares. Os acessos coloridos e selvagens mostraram um baixo número de cópias de *Gret1* quando comparados às variedades coloridas e domesticadas, enquanto o número de cópias elevado estava presente em acessos brancos de todas as espécies, independentemente do nível de domesticação.

Um modelo que pode explicar esses resultados se dá pela hipótese de que a proliferação do elemento *Gret1* nos genomas de uva aumentou a probabilidade do surgimento de novos fenótipos, gerando a variabilidade necessária para a ocorrência da seleção artificial durante o processo de domesticação da espécie.

Dióicas - Espécies que apresentam indivíduos de sexos diferentes.

Alógama - Realização de fecundação cruzada (que envolve dois indivíduos), preferencialmente.

Hermafrodita - Flores que apresentam tanto órgão masculino quanto feminino.

Autógama - Realização, preferencialmente, de autofecundação (não necessita de outro indivíduo para reprodução).

Antocianinas - Qualquer dos glicosídeos presentes nos pigmentos vermelhos, azuis ou violetas de folhas, frutos ou flores de vegetais.

Lócus gênico - Região genômica que possui genes.



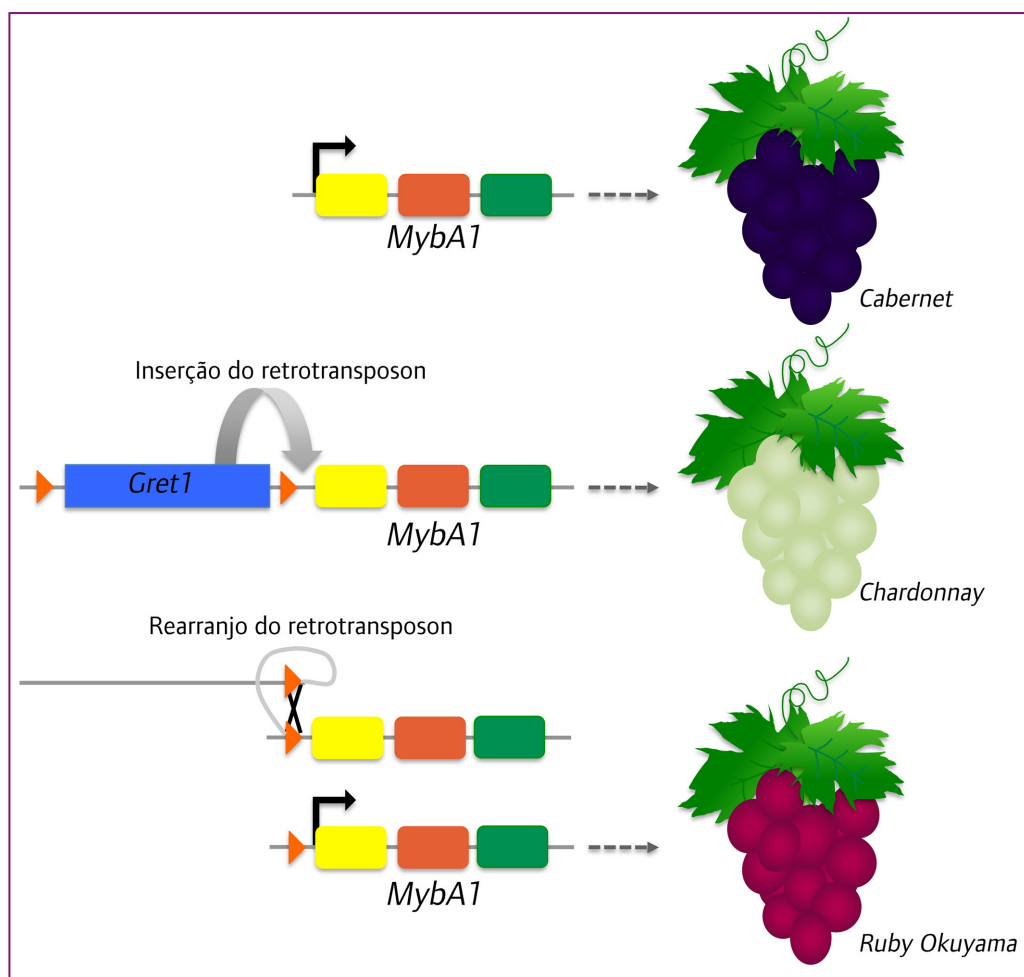


Figura 2.

Esquema de surgimento das uvas com bagas de cor branca (*Chardonnay*) a partir da inserção do retrotransposon *Gret1*, e baga colorida (*Ruby Okuyama*) a partir do rearranjo do *Gret1*, restando apenas a estrutura LTR terminal (representado pelo triângulo laranja).

ESTRUTURA DO RETROTRANSPONON *GRET1*

O *Gret1* é um retrotransposon da ordem LTR e família *Ty3-Gypsy*. Esse elemento contém 10.422 pares de bases (pb), sendo 824 pb de uma LTR na extremidade 5'; 8.774 pb de uma região interna e 824 pb de

uma LTR na extremidade 3'. As sequências das duas regiões LTR diferem em apenas quatro nucleotídeos, sugerindo um evento de inserção relativamente recente. Ele foi detectado, primeiramente no alelo *VvMybA1a* do gene *MybA1*. No alelo *VvMybA1b*, o *Gret1* estava ausente, deixando para trás apenas a estrutura LTR terminal (representado pelo triângulo laranja).

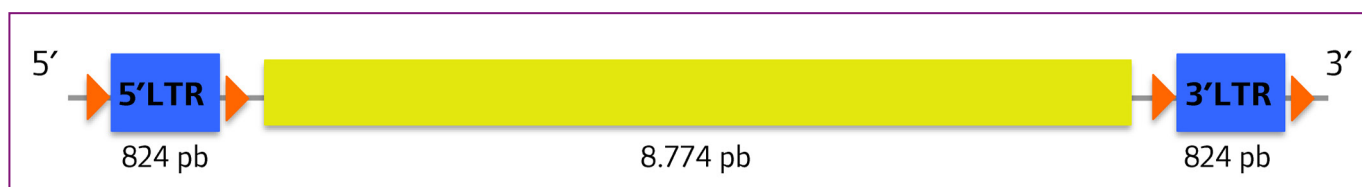


Figura 3.

Estrutura do retrotransposon *Gret1*. As regiões em azul representam as estruturas LTR. Em amarelo está representada a região interna do elemento.

CONCLUSÃO

Os elementos transponíveis são unidades genéticas móveis que exibem ampla diversidade em sua estrutura e mecanismos de replicação. Ocupam uma grande fração de muitos genomas eucarióticos e seu movimento representa um importante fator que molda os genomas dos organismos, em especial o das plantas. Assim, esses elementos podem estar envolvidos no surgimento de novas caracte-

rísticas morfológicas, como é o caso das cores das bagas da videira, além de contribuir como matéria-prima para a evolução, que é a variabilidade genética. Assim, o estudo detalhado dos elementos transponíveis nas diferentes espécies tem contribuído tanto na compreensão do surgimento de diferentes fenótipos e características genômicas quanto para o entendimento da dinâmica evolutiva nos vários grupos taxonômicos.



PARA SABER MAIS

- BARBIERI, R. L.; STUMPE, E. R. T. *Origem e evolução de plantas cultivadas*. 1ª edição. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.
- BENNETZEN, J. L.; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annual review of plant biology*, v. 65, p. 505-530, 2014.
- CADLE-DAVIDSON, M. M.; OWENS, C. L. Genomic amplification of the Gret1 retroelement in white-fruited accessions of wild *Vitis* and interspecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 116, p. 1079-1094, 2008.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B.. O Genoma Dinâmico: Elementos de Transposição. In: *Introdução à genética*. 11a. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. p. 453-475.
- KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, v. 304, n. 5673, p. 982-982, 2004.
- LISCH, D. How important are transposons for plant evolution? *Nature Reviews Genetics*, v. 14, n. 1, p. 49, 2013.
- PEREIRA, H. S.; BARÃO, A.; DELGADO, M.; MORAIS-CECÍLIO, L.; VIEGAS, W.. Genomic analysis of grapevine retrotransposon 1 (Gret1) in *Vitis vinifera*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 111, n. 5, p. 871-878, 2005.