UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANA CAROLINA VIEIRA ZAKIR PEREIRA

Análise funcional do fator de transcrição *DREB6A* de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pela superexpressão em *Arabidopsis thaliana*

Piracicaba

2014

ANA CAROLINA VIEIRA ZAKIR PEREIRA

Análise funcional do fator de transcrição *DREB6A* de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pela superexpressão em *Arabidopsis thaliana*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Dra. Danielle Gregório Gomes Caldas AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Pereira, Ana Carolina Vieira Zakir

Análise funcional do fator de transcrição *DREB6A* de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pela superexpressão em *Arabidpsis thaliana* / Ana Carolina Vieira Zakir Pereira; orientadora Danielle Gregório Gomes Caldas. - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011.-- Piracicaba, 2014. 177 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Estresse abiótico 2. Expressão gênica 3. Fatores de transcrição 4. Plantas transgênicas 5. Proteínas de fluorescência verde 6. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 602.6:582.683.2

DEDICO

Ao meu esposo Luiz Fernando Pereira, pela paciência, carinho, amor e dedicação por ser a pessoa que mais me incentiva, meu companheiro em todos os momentos que tem me apoiado e me ajudado a alcançar os meus objetivos. Todo esforço e dedicação não fariam sentido para mim se você não estivesse ao meu lado.

Aos meus pais, Samir Alfredo Zakir e Ozana Bernardete Vieira, aos meus irmãos, Nelson Augusto Vieira Junior e Bianca Vieira Zakir, ao meu sogro, Joel de Almeida Pereira, a minha sogra, Aparecida Manzano Pereira, a minhas cunhadas, Edna Marcia Pereira, Kelli Lidiana Marques Vieira, Rosânia Valois Pereira, Rosilene Manzano Feitosa, Sônia Manzano Marssola, aos meus cunhados, Joel Carlos Pereira, Sergio dos Anjos Feitosa, Vitor Marssola e aos meus sobrinhos, Amanda Valois Pereira, Guilherme Manzano Feitosa, Juliana Manzano Feitosa, Luiza Valois Pereira, Mariana Manzano Pereira Ribeiro, Tiago Pereira, Vitor Marssola Júnior pelo carinho e amor que proporcionaram ao longo da minha Jornada, por acreditar que seria possível a conclusão de mais uma etapa para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

OFEREÇO

A todos aqueles que se dedicam a pesquisa em genética, aplicada ao desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, visando à melhoria das condições de cultivo e a tolerância aos estresses bióticos e abióticos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, pelo cuidado, pelo amor com que tem me conduzido dia após dia, pela capacitação para o desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade que me deu de conviver com pessoas que ajudaram nesse processo de desenvolvimento profissional.

A Dra. Danielle Gregório Gomes Caldas pela orientação, profissionalismo e amizade, por me permitir a realização deste trabalho e por ter contribuído para a o meu crescimento pessoal e profissional.

A Prof^a. Dra. Siu Mui Tsai pela orientação, suporte, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelos conselhos que me ajudaram nesse processo de construção do conhecimento.

A Universidade de São Paulo, ao Centro de Energia de Nuclear na Agricultura e ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP por terem oferecido a estrutura necessária à realização deste trabalho e pelas oportunidades concedidas durante o Mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de Mestrado.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Celular e Molecular: Fábio Duarte, Wagner Picinini e José Elias Gomes que me apoiaram na realização do trabalho e pelos conhecimentos adquiridos durante esses dois anos de convivência.

A Ludmila Barrios de Campos pela amizade e por ajudar a solucionar problemas cotidianos, pelas risadas e momentos de descontração.

Em especial para os meus colegas do grupo do feijão: Milena Moura de Araújo Biazuzo, Gustavo Henrique Recchia, Ana Luiza Ahern Beraldo, Enéas Ricardo Könzen, Aline Borges, e Fernanda Cassieri, que me acolheram e me ajudaram na construção do conhecimento, pelos momentos agradáveis e divertidos que passamos.

Aos meus colegas de laboratório: Beatriz Maria Ferrari, Fabiana de Souza Cannavan, Fernanda Nakamura, Andressa Venturini, Caio Augusto Yoshiura, Marcela Arnaldo, Marina Dellias, Aline da França, Maria Júlia de Lima Brossi, Lucas William Mendes, Lucas Palma, Rosineide Souza, Clóvis Daniel Borges, Denis Göss e Acácio Aparecido Navarrete, pela convivência diária.

A todos os funcionários do serviço de Pós-graduação do Cena/USP pelo apoio.

A todos os funcionários da biblioteca do CENA/USP, em especial a Marília, pela correção.

"A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio."

(Martin Luther King).

RESUMO

ZAKIR-PEREIRA, A. C. V. Análise funcional do fator de transcrição *DREB6A* de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pela superexpressão em *Arabidopsis thaliana.* 2014. 177 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Estresses abióticos como seca, alta salinidade e baixas temperaturas, afetam o crescimento e a produtividade em culturas de interesse comercial como o feijoeiro comum. Proteínas DREB (Dehydration Responsive Element Binding) são fatores de transcrição que regulam genes específicos envolvidos na tolerância ao estresse abiótico. Para determinar como as plantas toleram condições ambientais adversas, variedades tolerantes, biologia molecular e bioinformática podem ser aplicadas para identificar e caracterizar genes que controlam mecanismos de adaptação a estresses. Baseado nas informações disponíveis nos bancos de dados públicos, a sequência da Orf completa do gene Phvul.009G029600.1| PACid:27146455 contendo 1062 pb foi encontrada e usada para o desenho dos primers e para o sequenciamento. A nova sequência é muito similar ao AtRAP2.4 e foi nomeada como PvDREB6A, segundo a análise filogenética. Ferramentas de predição mostraram que a sequência apresenta 354 aminoácidos e possui uma cópia do domínio AP2, que se dobra em uma estrutura com três β -folhas e uma α -hélice apresentando resíduos importantes e motivos específicos de reconhecimento e de ligação ao DNA. Além disso, um peptídeo trânsito foi detectado na porção N-terminal com um sítio de clivagem no resíduo 52. A interação deste fator de transcrição com seu domínio de ligação ao DNA foi validada por Electro Mobility Shift Assay (EMSA). A localização subcelular da proteína foi realizada e expressão da Green Fluorescent Proteín (GFP) foi detectada no núcleo. A transformação genética para a superexpressão do gene PvDREB6A em plantas de Arabidopsis thaliana Columbia-0 e mutantes nocaute para o gene AtRAP2.4 (Salk_020767C) foi realizada. Quatro eventos com cópia única e melhor expressão do gene PvDREB6A denominados Col-0/pFEC2.1 #1, Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, Salk_020767C/ pFEC2.1 #19.7 e Salk_020767C/ pFEC2.1 #23.7, foram selecionados. O evento Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 mostrou melhor expressão do gene PvDREB6A e foi visualizado sob luz UV. A análise funcional revelou que as plantas transgênicas submetidas ao déficit hídrico, à alta salinidade e ao frio, apresentaram maior taxa de sobrevivência. Plantas transgênicas superexpressando o gene PvDREB6A apresentaram menor taxa de desidratação e de vazamento de eletrólitos quando submetidas a estresses abióticos. Uma análise da expressão de genes relacionados à tolerância foi conduzida. A quantificação revelou que a expressão de 18 genes: AtDC1.2, AtUSP, AtKIN1, AtERF69, AtGolS3, AtMT2A, AtCAP160, AtNTR1.7, AtGPR7, AtPDC2, AtLTI78, AtCOR15a, AtCOR15b, AtCOR47, AtCOR413, AtLEA6, AtLEA9 e AtLEA14, relacionados a tolerância a seca, sal e frio foram up-regulated devido à superexpressão do gene PvDREB6A de feijoeiro nas plantas transgênicas.

Palavras-chave: Feijão comum. Análise *in sílico*. Mutante nulo. Superexpressão. Localização subcelular. RT-qPCR.

ABSTRACT

ZAKIR-PEREIRA, A. C. V. Functional analysis of the transcription factor DREB6A from common bean (Phaseolus vulgaris L.) by overexpression in *Arabidopsis thaliana*. 2014. 177 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Abiotic stresses like drought, high salinity and low temperatures affect growth and productivity in crops of economic interest such as common bean. DREB (Dehydration Responsive Element Binding) proteins are transcription factors that activate specific genes involved in tolerance to abiotic stress. To generate new information on the research for drought and other abiotic stresses, tolerant varieties, molecular biology and bioinformatics can be applied to identify and characterize genes that control plant defense and adaptation mechanisms to water deprivation, to excessive salt and to high/low temperature. Based on public databases, a common bean DREB sequence was found and an in silico study was carried out. A complete Orf sequence Phvul.009G029600.1 |PACid:27146455 containing 1062 bp was found and used for primer design and sequencing. The new sequence was very similar to AtRAP2.4 and named as PvDREB6A, according to phylogenetic analysis. Prediction tools showed that the deduced 354 aa sequence has one copy of the AP2 domain, folding in a three β -sheets and one α -helix structure, and presenting important residues and motifs for DNA contacting and binding specificity. In addition, a chloroplast transit peptide was detected at the N-terminal region with cleavage site in the 52 residue. Binding activity of this transcription factor was validated by Electro Mobility Shift Assay (EMSA). Subcellular localization was verified by transient expression of PvDREB6A::GFP in Nicotiana benthamiana and the expression of GFP was detected at the nucleus. Genetic transformation for overexpression of *PvDREB6A* gene in *Arabidopsis thaliana* wild type and knockout mutant for AtRAP2.4 gene was conducted. Four single copy events with better expression of named Col-0/pFEC2.1 #1, Salk 020767C/pFEC2.1 the PvDREB6A #13.1, Salk_020767C/pFEC2.1 #19.7 and Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 were selected. The event Salk 020767C/pFEC2.1 #23.7 showed the best expression of *PvDREB6A* and was visualized under UV light. Functional analysis, revealed that transgenic plants under water deficit, high salt, and cold showed higher survival rate. Transgenic plants overexpressing the PvDREB6A exhibited lower water loss rate and electrolyte leakage rate under abiotic stress. A gene expression analysis with tolerant-related genes was conduted. The quantification revealed that 18 genes, AtDC1.2, AtUSP, AtKIN1, AtERF69, AtGolS3, AtMT2A, AtCAP160, AtNTR1.7, AtGPR7, AtPDC2, AtLTI78, AtCOR15a, AtCOR15b, AtCOR47, AtCOR413, AtLEA6, AtLEA9 e AtLEA14, related to drought, salt and cold tolerance, were up-regulated due to the overexpression of *PvDREB6A* from common bean in the transgenic plants.

Key-words: Commom bean. In silico analysis. Knockout mutant. Overexpression. Subcellular localization. RT-qPCR.

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1.2 Importância econômica do feijoeiro comum	20
1.1.3 Feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) e estresse abiótico	21
1.2 Mecanismos de regulação da expressão gênica por fatores de transcrição	23
1.2.1 Domínio funcional AP2 e os genes DREB	24
1.2.2 Tolerância ao estresse abiótico através da superexpressão dos genes DREB	26
1.3 Mecanismos de aquisição de tolerância ao déficit hídrico	28
1.4 O uso de mutantes para realização de estudos funcionais em plantas	35
1.5 Transformação genética de plantas	36
Referências	38
2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FATO	OR DE
TRANSCRIÇÃO <i>PvDREB6A</i> DE FELIOEIRO	
2.1 Introducão	
2.2 Material e Métodos	
2.2.1 Análises <i>in sílico</i>	
2.2.2 Material vegetal	
2.2.3 Desenho de primers para isolamento da <i>Orf PvDREB6A</i>	
2.2.4 Extração de RNA total e Síntese de cDNA	55
2.2.5 RT-PCR para isolamento da <i>Orf PvDREB6A</i>	55
2.2.6 Clonagem de produtos no pENTR/D-TOPO [®] e transformação de células de <i>Esc</i>	cherichia
coli (E coli)	56
2.2.7 Construção dos vetores de transformação	
2.2.8 Sequenciamento dos produtos clonados	58
2.2.9 Ensaio para expressão heteróloga da proteína	
2.2.10 Ensaio EMSA (<i>Electro Mobility Shift Assay</i>)	60
2.2.11 Transformação de Agrobacterium com os vetores pFEC3.1 e pFEC3.2 por	
2.2.12 Localização subcelular da proteína	
2.3 Resultados e Discussão	
2.3.1 Identificação, nomenclatura e análises <i>in silico</i> do gene <i>PvDREB6A</i>	64
2.3.2 Isolamento e clonagem da Orf PvDREB6A no vetor pENTER/D-TOPO [®]	67
2.3.3 Transformação e indução da expressão da proteína PvDREB6A em <i>E.coli</i>	69
2.3.4 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)	70
2.3.5 Localização subcelular da proteína DREB6A	71
2.4 Conclusões	73
Referências	74
3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO CENE <i>D</i> "D <i>RERA</i> DE EFILOFIE	20 DUD
S CARACIERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE <i>I VDREDOA</i> DE FEIJUEIR MEIO DA SUIDEDEVIDESSÃO EM Arabidonsis thaliana	70
νιειό σα συι εκελι κεσσαύ ενι <i>Αιαυμυρις ιπαπαπα</i>	17 Q1
3.1 Mituuyau	01 82
3.2 I Vetores	0J 83
3.2.1 VOULS	0J 82
3.2.2 internation of the sector $3.2.3$ Extraction de DNA	0J Q1
3.2.5 Entração dos primers	04 Q/I
2.2.5 DCD para confirmar a incorrão do T. DNA pas plantas mutantas	04 Q5
5.2.5 I CK para communar a mserção do I-DINA nas plantas mutantes	05

SUMÁRIO

3.2.6 Construção do vetor de transformação para superexpressão do gene PvDREB6A pelo 3.2.8 Transformação de Agrobacterium tumefaciens LBA4404 com a construção 3.2.10.1 Extração de DNA genômico das plantas transgênicas e quantificação90 3.2.10.2 PCR do gene PvDREB6A e do gene Egfp em transformantes putativos das gerações T1. T2 e T3......90 3.2.10.5 Análise da expressão de genes de referência em plantas de Arabidopsis thaliana 3.2.10.6 Análise da expressão do gene PvDREB6A nas plantas transgênicas por 3.3.2 Construção do vetor de transformação para a superexpressão do gene PvDREB6A em 3.3.3 Obtenção de plantas transgênicas de arabidopsis do tipo selvagem (Col-0) e mutante (Salk_020767C) superexpressando o gene PvDREB6A100 3.3.4.1 Análise dos transformantes putativos nas gerações T1, T2 e T3 por PCR......102 3.3.4.2 Ensaio para determinar o número de cópias do gene PvDREB6A nas plantas 3.3.4.3 Análise da expressão dos genes de referência em plantas de arabidopsis do tipo 3.3.4.4 Análise da expressão do gene PvDREB6A nas plantas transgênicas por 3.3.4.5 Expressão da proteína GFP no evento de transformação #23.7 da planta 3.3.5.4.1 Avaliação da taxa de desidratação......126

4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERECIAL DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS DE Arabidopsis SUPEREXPRESSANDO O GENE PvDREB6A DE FEIJOEIRO......137 4.2 Material e Métodos......141 4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....141 4.2.4 Escolha dos genes de referência que possuem maior estabilidade quando plantas de 4.2.5 Análise da expressão dos 20 genes envolvidos na tolerância à seca por 4.3.1 Análise da expressão de genes envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas superexpressando o gene PvDREB6A......145 4.3.1.9 Modelo proposto de regulação na célula pela indução da expressão dos 18 genes

1 INTRODUÇÃO

Estresses abióticos como déficit hídrico, baixa ou alta temperatura e o estresse salino são caracterizados condições ambientais adversas que afetam o crescimento e a produtividade de leguminosas imporantes para o consumo humano como o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris L.*) (BROUGHTON et al., 2003, ZADRAŽNIK et al., 2013,). No Brasil, em regiões de clima árido e semiárido, a irregularidade na precipitação de chuva e o aumento a taxa de evaporação devido às altas temperaturas, intensificam as condições de déficit hídrico que é prejudicial para o crescimento, desenvolvimento e a produtividade do feijoeiro (SALES et al., 2013). Apesar das perdas em relação à produtividade devido a condições ambientais adversas, os mecanismos de resposta ao estresse nesta cultura ainda são pouco estudados.

Respostas moleculares ao estresse abiótico incluem a percepção, a transdução de sinal do citoplasma e núcleo, a indução da expressão gênica, e finalmente, alterações metabólicas levando a tolerância ao estresse (AGARWAL et al., 2006). Os Transcription factors (TFs) regulam a expressão gênica da maior parte dos genes em resposta a múltiplos stresses de uma maneira sincronizada, e são caracterizados como alvos potenciais para aplicação em biologia molecular de plantas (RASHID et al., 2012). A ligação desses TFs a elementos regulatórios de ação *cis* nas regiões promotoras dos genes alvo levam a produção de proteínas com funções específicas como modificações pós-traducionais (o dobramento de proteínas), resposta a desidratação e modificações na parede celular (KILIAN et al., 2012). Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (1994) identificaram um elemento regulatório cis, DRE (Dehydration Responsive Element), presente no promotor do gene COR78/Rd29A que está envolvido na resposta à seca, alta salinidade e baixa temperatura. Fatores de transcrição DREB (Dehydration Responsive Element Binding) são capazes de se ligar a DRE para ativar a expressão de genes da via de resposta a estresses. Alguns fatores de transcrição DREB foram identificados em arabidopsis por Liu et al. (1998), que isolaram e caracterizaram dois genes, DREB1A e DREB2A. A expressão de DREB1A foi induzida por baixa temperatura, e a expressão de DREB2A foi induzida pelo déficit hídrico. Hwang et al. (2012) isolaram e caracterizaram o gene DREB2C de arabidopsis que quando foi superexpresso, conferiu tolerância ao estresse oxidativo.

Cada fator de transcrição DREB contém o domínio funcional conservado AP2/EREBP, identificado inicialmente na proteína APETALA2, composta de aproximadamente 60 aminoácidos e codificada pelo gene *APETALA2* (*AP2*) (OKAMURO et al., 1997). O gene *AP2* é apenas um de uma família de 144 outros genes que possuem um

único domínio AP2 de ligação ao DNA em arabidopsis; as funções biológicas desta família incluem: controle do florescimento e do desenvolvimento da semente, a percepção e a resposta de defesa da planta mediante aos estresses abióticos (JOFUKU et al., 1994; WEIGEL, 1995; OKAMURO et al., 1997). No entanto, dentre os 144 genes, apenas 56 são enquadrados na categoria DREB, por apresentarem particularidades consistentemente exploradas em diversos estudos (RIECHMANN; MEYEROWITZ, 1998). Sakuma et al. (2002) verificou que genes do grupo *DREB* apresentam o domínio funcional AP2 com uma característica peculiar o 14º (valina) e o 19º (ácido glutâmico) aminoácido são conservados.

Sakuma et al. (2002) através de uma análise filogenética detalhada, fizeram a classificação dos genes *DREB* em seis sub-grupos (A-1 a A-6). Em arabidopsis, os genes *RAP2.4* e *RAP2.4B*, recentemente duplicados, codificam fatores de transcrição que possuem um domínio único AP2 e foram classificados no grupo A-6 de proteínas DREB associadas ao estresse abiótico (SAKUMA et al., 2002; RAE et al., 2011). Segundo Lin et al. (2008), *RAP2.4* é direcionada para o núcleo independentemente das condições de luz, e pode se ligar especificamente tanto ao elemento GCC-box na reposta ao etileno, quanto ao elemento regulatório DRE em situações de estresse. Fatores de transcrição se ligam a região promotora de diferentes genes induzidos pelo estresse, e a superexpressão ou deleção desses genes pode melhorar a tolerância da planta ao estresse abiótico (NURUZZAMAN et al., 2013). A superexpressão do gene *RAP2.4* ou a deleção causa alteração na expressão de genes que são regulados pela luz, pelo etileno e pela seca (LIN et al., 2008).

Os genes *DREB*, como TFs, podem estar envolvidos na regulação da expressão de outros genes que respondem a estresses abióticos, desempenhando um papel fundamental na ativação de mecanismos que levam a planta a adquirir tolerância. A análise de expressão gênica dos genes *DREB* tem demonstrado o seu papel em conferir maior tolerância ao frio, seca, e ao sal em cereais, cevada, arroz e trigo, assim como outras plantas, tais como o crisântemo, brassicas, arabidopsis, aloe vera e uva (WANG; HE, 2007; ZHAO et al., 2007; CHEN et al., 2008; WANG et al., 2008; YANG et al., 2009; MORRAN et al., 2011; ZHUANG et al., 2010; KIM et al., 2012; ZHAO et al., 2014). Embora estes genes já tenham sido descritos em outras espécies, há uma falta de informação sobre a expressão de genes *DREBs* em feijão, e seria de fundamental importância o isolamento e a caracterização funcional dos fatores de transcrição DREB de feijoeiro para tentar entender os mecanismos de percepção do estresse e como a planta tem a capacidade tolerá-lo.

Recentemente, o genoma de *Phaseolus vulgaris L*. foi sequenciado e já está disponível no banco de dados do Phytozome. O gene *RAP2.4* presente em *Arabidopsis thaliana* age

especificamente no núcleo e é induzido em plantas sob estresse abiótico; através da análise de similaridade foi possível encontrar uma sequência homóloga ao *RAP 2.4* em feijoeiro, um gene *DREB* do sub-grupo A6 que foi denominado *PvDREB6A*. Através da análise e predição da estrutura da proteína *DREB6A* de feijão foi possível identificar um peptídeo sinal de localização cloroplastidial cujos homólogos em soja e arabidopsis não possuem, tornando-se um potencial candidato para análise (CALDAS; TSAI, 2011; GOODSTEIN et al., 2012).

Pela análise *in sílico* de estrutura da proteína *PvDREB6A*, e análise de expressão deste gene em cultivares de feijoeiro, um susceptível e outro tolerante, foi possível observar que em plantas submetidas a estresses abióticos, ocorre um aumento do número de transcritos em condições de seca, alta salinidade e frio (CALDAS; GOMES; TSAI, 2010; CALDAS; TSAI, 2011). Por estas análises, acredita-se que este gene codifique para uma proteína que possui duplo direcionamento e que pelos padrões de expressão deve proporcionar aumento da tolerância a estresses abióticos quando superexpresso.

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram: (i) isolamento e a caracterização molecular do gene *PvDREB6A*; (ii) transformação genética de *Arabidopsis thaliana* (tipo selvagem e do mutante nulo Salk_020767C) com *35S::PvDREB6A* para análise de complementação funcional; (iii) análise da expressão diferencial de genes relacionados a tolerância a estresses abióticos em plantas transgênicas superexpressando *PvDREB6A*.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.2 Importância econômica do feijoeiro comum

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à subclasse *Rosidae*, a ordem *Fabales* e a família *Fabaceae* (CRONQUIST, 1988). Naturalmente, o feijão apresenta elevada amplitude de distribuição geográfica, ocorrendo desde o norte do México até o Nordeste da Argentina. No Brasil, a espécie foi introduzida, segundo evidências arqueológicas e genéticas, a partir do norte da América do Sul ou da América Central, com pouca influência da Região dos Andes Centrais e Meridionais (FREITAS, 2006).

O feijão é a leguminosa mais importante para consumo humano direto, a produção é especialmente importante na Europa Oriental, África do Sul e América Latina, onde é consumido por milhões de pessoas, representando na dieta uma importante fonte de proteína, vitaminas, minerais e fibras (BROUGHTON et al., 2003, HANAI et al., 2010). O feijão é altamente nutritivo com quase o dobro dos níveis de proteínas em relação aos cereais, menor teor de gordura do que a soja ou amendoim e maior quantidade de lisina, fósforo, ferro, zinco, magnésio, cobre e cálcio do que cereais (BLAIR et al., 2009).

O Brasil foi classificado durante 10 anos como o maior produtor de feijão do mundo, no entanto em 2012/2013, com a queda da produtividade, países asiáticos (Ìndia e Myanmar) se tornaram os maiores produtores (BRASIL, 2014). O feijão é a principal fonte de proteína vegetal consumida e em combinação com arroz, a cultura torna-se a refeição básica diária para todos os Brasileiros. A produção ocorre principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Considerando a safra 2012/2013, estima-se que a área total plantada de feijão seja de 3,2 milhões de hectares (1,4-2,9% maior que a safra passada) e a produtividade da safra nacional de feijão deverá chegar a 1.016 Kg/ha (CONAB, 2013). Além do grande volume de produção nacional, o Brasil é o maior importador desse produto, sendo que a quantidade importada varia em função dos resultados das safras. Nos últimos anos foram importadas, em média, cerca de 100 mil toneladas (FERREIRA, 2007).

O feijão mais consumido no Brasil é o tipo carioca (71,7%) (consumo praticamente restrito ao Brasil), seguido do feijão preto (17,6%), do feijão de corda (7,8%) consumido principalmente na região Nordeste, e outros (2,9%), representados por mais de 70 tipos (EMBRAPA, 2000). A exportação do feijão brasileiro representa uma pequena margem. No último ano, 4,4 mil toneladas do grão foram enviadas para comercialização no exterior, entre

os principais grupos estão o carioca, o preto, o caupi ou feijão de corda e o rajado (BRASIL, 2013).

Aproximadamente 90 dias após o plantio, o feijão pode ser colhido; no Brasil a safra do grão é divida em três etapas: (i) a safra das águas – onde o plantio e a colheita são beneficiados pelo alto índice de chuvas de Julho a Outubro, (ii) a safra seca que é feita no período com o menor índice de chuva no país, com plantio de dezembro a março e (iii) a safra irrigada que se refere à colheita do feijão irrigado, que têm a concentração do plantio na região Centro-Sul, de abril a junho (FERREIRA, 2007).

Além da importância econômica, o feijão possui um importante papel social, uma vez que é reconhecido como cultura de subsistência em pequenas propriedades. No Brasil, a produção é feita principalmente através da agricultura familiar e de acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento Agrário, esse setor emprega quase 75% da mão-de-obra no campo e é responsável pela segurança alimentar dos Brasileiros, produzindo 70% do feijão consumido no país (FAO, 1996; BRASIL, 2013).

1.1.3 Feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) e estresse abiótico

Os estresses abióticos (seca, alta salinidade e baixa temperatura) afetam negativamente a sobrevivência, o acúmulo de biomassa e a produção de grãos do feijoeiro. O déficit hídrico é prejudicial porque diminui a disponibilidade de água para funções celulares vitais, afetando a viabilidade da célula (SHINOZAKI; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 1997). Bray et al. (2003), relataram que estresses abióticos vão desencadear vários mecanismos de resposta em plantas, sendo a adaptação à seca uma função multigênica que envolve uma série de modificações fisiológicas e bioquímicas nas plantas; Essas modificações incluem: murcha e redução da área foliar, alterações no conteúdo relativo de água (RWC), o estímulo do crescimento da raiz, vazamento eletrolítico (EL), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos cloroplastos, mitocôndrias e/ou peroxissomos; Além disso, o acúmulo de radicais livres podem alterar a homeostase celular reagindo com lipídios, proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos, que podem resultar na peroxidação lipídica (LP), em danos à membrana e na inativação de enzimas (BUCHANAN; GRUISSEN; JONES, 2002; BARTELS; SUNKAR, 2005; SUBBARAO et al., 2005). No mundo, aproximadamente 20% das terras irrigadas usadas para o plantio, possuem alta salinidade (MUNNS; TESTER, 2008), e estima-se que este valor deve chegar a 50% em um futuro próximo (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). O cultivo de feijoeiro em solos com alta salinidade afetam o rendimento e a produtividade da cultura (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Durante o estresse salino, processos fisiológicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta como a fotossíntese, a síntese proteica, a produção de energia e o metabolismo de lipídeos são afetados (PARIDA; DAS, 2005). Uma vez cultivada em solos salinos, a planta necessita tolerar o estresse e para isso, são iniciados mecanismos para a proteção e sobrevivência que incluem: a percepção do estresse; a transdução de sinal que regula o transporte de íons através de canais mantendo a homeostase celular (evitando a toxicidade), e a sinalização por mensageiros secundários que leva a ativação da expressão de genes que regulam o metabolismo hormonal, a síntese de osmoprotetores (que mantém o potencial osmótico) e a produção de compostos antioxidantes para eliminar ROS e minimizar o dano ao tecido da planta exposta ao estresse (MAGNAN et al., 2008; WANG et al., 2009; XU et al., 2009; CARILLO et al., 2011).

Em relação a baixas temperaturas, apenas algumas espécies adaptadas podem crescer e se desenvolver naturalmente nessas condições (STUSHNOFF, 1984). O feijoeiro comum é uma espécie tropical que pode sofrer danos se for submetida a temperaturas abaixo de 15°C (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Siebeneichler et al. (1998), avaliaram como o estresse por baixa temperatura altera a fotossíntese, a condutância estomática e a eficiência fotoquímica em uma variedade de feijoeiro tolerante e em outra susceptível ao frio, e concluíram que a diminuição na condutância estomática e na redução da taxa fotossintética causada pelo estresse por frio em feijão vai depender do genótipo e do estádio de desenvolvimento da planta. Alguns mecanismos ajudam a planta adquirir tolerância ao frio como a estabilização da membrana, o acúmulo de açúcares solúveis, outros osmólitos, proteínas *antifreeze* e mudanças na expressão gênica (BUCHANAN; GRUISSEN; JONES, 2002).

1.2 Mecanismos de regulação da expressão gênica mediada por fatores de transcrição

Transcription factors (TFs) interagem com elementos *cis* nas regiões promotoras *upstream* dos genes alvos relacionados ao estresse abiótico, podendo regular a expressão de muitos genes *downstream* com resposta secundária, proporcionando tolerância ao estresse (ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013). Os mecanismos moleculares da regulação da expressão gênica são dependentes em parte, da estrutura da cromatina, que permitirá a acessibilidade da maquinaria transcricional ao DNA, dos fatores de transcrição gerais, que juntamente com a RNA polimerase, reconhecem e se ligam ao *TATA-box* para iniciar a transcrição, e dos *enhancers* que aumentam a eficiência e a especificidade com que o promotor será reconhecido (LEWIN, 2009). Mudanças na metilação do DNA e/ou modificações nas regiões amino-terminais de histonas associadas à alteração na expressão gênica fazem com que TFs específicos sejam recrutados e/ou induzem o remodelamento do nucleossoma para facilitar a transcrição pela RNA polimerase II (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013).

Estudos de predição de domínios funcionais pela análise mutacional ou funcional demonstram que fatores de transcrição típicos de plantas consistem de uma região de ligação ao DNA, um sítio de oligomerização, um domínio de regulação da transcrição e um sinal de localização nuclear (NLS) (LIU; WHITE; McRAE, 2009). As famílias de TFs são classificadas de acordo com suas características estruturais, sendo agrupadas em relação ao número e o espaçamento de resíduos conservados de aminoácidos no maior domínio similar (GUILFOYLE; ULMASOV; HAGEN, 1998; RIECHMANN; MEYEROWITZ, 1998; TAKATSUJI, 1998). O modo de ação de TFs de uma mesma família multigênica pode ser distinto, isso ocorre devido ao mecanismo diferenciado de regulação em seus domínios conservados e pela ação de ativadores ou repressores que podem inibir ou estimular expressão gênica (LEWIN, 2009).

Famílias de TFs em plantas tem um papel significativo na percepção do sinal gerado pelo estresse abiótico para efetuar mudanças na expressão gênica. Membros da família APETALA 2/*ethylene-responsive elemento binding factor* (AP2/ERF) tem sido caracterizados em relação ao seu papel na regulação em resposta a estresses abióticos, e o aumento da expressão dos TFs dessas famílias está relacionado a um aumento da tolerância da planta ao estresse (LINDEMOSE et al., 2013).

1.2.1 Domínio funcional AP2 e genes DREB

Os estudos de expressão de genes responsivos a estresses sugerem que a regulação da transcrição é uma das etapas mais importantes para a adaptação das plantas às condições de estresse (ZHU, 2002; YAMAGUSHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). A partir de estudos funcionais com *Arabidopsis thaliana* vários genes que são induzidos por estresses abióticos têm sido caracterizados, atuando como primers para a percepção e para a transmissão dos sinais entre as células. Análises moleculares revelaram a presença de elementos regulatórios específicos *cis*, que são intermediários na ativação da expressão de vários genes em plantas sob estrresse (YAMAGUCHI- SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1993). Genes *DREB* codificam proteínas que apresentam um domínio funcional conservado, conhecido como AP2/EREBP, que possui um papel importante na regulação de genes responsivos a estresses bióticos e abióticos (SAKUMA et al., 2002).

Os genes *AP2/EREBP* estão divididos em três famílias denominadas *AP2*, *Ethilene Responsive Factor* (ERF) e *RAV*, e esta divisão é feita com base na similaridade de suas sequências e no número de domínios AP2/EREBP que possuem (NAKANO et al., 2006; LATA; PRASAD, 2011). As proteínas da família ERF contêm apenas um domínio AP2/EREBP e são divididas em duas subfamílias principais, *C-Binding Factor*/DREB e ERF (SAKUMA et al., 2002). As proteínas AP2 contêm dois domínios AP2/EREBP, enquanto que, proteínas RAV contêm apenas um domínio AP2/EREBP e também um domínio B3 e estão relacionados à resposta aos estresses bióticos e abióticos (BOUTILIER et al., 2002; SOHN et al., 2006).

Os genes *DREB* são distinguidos dos genes *ERF* pela posição do 14° (valina) e do 19° (ácido glutâmico) aminoácido do domínio AP2/EREBP, eles apresentam papel chave na resposta das plantas a estresses abióticos pelo reconhecimento do elemento regulatório denominado *Dehydration Responsive Element* (DRE), que possui uma sequência conservada no núcleo de 9 pb (5'-TACCGACAT-3') e foi identificada pela primeira vez no promotor do gene *Rd29A* de arabidopsis, que responde a seca (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1993; SAKUMA et al., 2002). Os DRE estão envolvidos em várias respostas ao estresse abiótico, através de vias dependentes ou não de ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994; BUSK et al., 1997; LIU et al., 1998;. KIZIS; PÁGE`S, 2002; DUBOUZET et al., 2003).

A princípio, em uma análise realizada por Liu et al. (1998), os genes *AtDRE1A* (induzido pelo frio) e *AtDREB2A* (induzido pela seca e alta salinidade), que codificam para proteínas capazes de se ligar a DRE, foram isolados e ambos foram ativados pela via ABA-independente. No entanto, um trabalho realizado por Sakuma et al. (2002), revelou que os genes *DREB2A*, *DREB2B* e *DREB2C* foram induzidos em plantas submetidas a estresses abióticos, e em plantas que entraram em contato com o ácido abscísico (ABA), dessa forma, alguns modelos propostos para a regulação dos genes *DREB* começaram a ser modificados. Lata e Prassad (2011) desenvolveram um modelo mostrando que os genes *DREB* são regulados por ambas as vias (ABA-dependente e independente).

Os genes *DREB* podem ser divididos em seis sub-grupos (Sakuma et al. 2002), e a expressão dos genes do sub-grupo A1 (*DREB1/CBF*) em arabidopsis é induzida pelo frio, enquanto que os genes do sub-grupo A2 (*DREB2A* e *DREB2B*) são induzidos por desidratação, pela alta salinidade e pelo calor (LIU et al., 1998; SHINWARI et al., 1998; NAKASHIMA et al., 2000). Os *DREBs* do sub-grupo A1, *DREB1D/CBF4*, *DREB1E/DDF2*, e *DREB1F/DDF1* são induzidos por estresse osmótico, sugerindo a existência de *crosstalk* entre as vias DREB1 e DREB2 (HAAKE et al., 2002; NAKASHIMA et al., 2009).

Genes do sub-grupo A-3 não mostraram resposta a tratamentos de estresses em órgãos da planta de arabidopsis (SAKUMA et al., 2002). Genes do sub-grupo A-4 mostraram resposta ao tratamento por frio apenas em raízes de arabidopsis (SAKUMA et al., 2002).

Os genes *GmDREB1*, *GmDREB2*e *GmDREB3* foram isolados de soja, e baseado em análises de similaridade de sequência, estes foram enquadrados dentro do sub-grupo A-5 na sub-família DREB. A expressão desses genes foi induzida por déficit hídrico, alta salinidade, baixa temperatura e tratamento com ABA (LI et al., 2005; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2009).

Lin et al. (2008) isolaram o gene *RAP2.4* presente em *Arabidopsis thaliana* que pertence ao sub-grupo A-6 de genes DREB, que é direcionado para o núcleo independentemente das condições de luz, e pode se ligar especificamente tanto ao elemento regulatório GCC-box na reposta ao etileno, quanto ao elemento regulatório *cis*, DRE sendo induzido em plantas sob seca alta salinidade e frio

1.2.2 Tolerância ao estresse abiótico através da superexpressão dos genes DREB

Análises funcionais *in vivo* são importantes para compreender os mecanismos moleculares de tolerância ao estresse em plantas e também podem fornecer ferramentas que possibilitem melhorar a produtividade das culturas. Uma forma importante de alcançar tolerância a múltiplas condições de estresse é a superexpressão de fatores de transcrição que controlem uma grande variedade de genes em diferentes vias. Plantas transgênicas que superexpressam fatores de transcrição DREB apresentam maior tolerância à seca, alta salinidade, calor e congelamento (LATA; PRASAD, 2011).

A superexpressão dos genes *DREB1/CBF* em arabidopsis, *Brassica napus* e tabaco transgênico, induziu a expressão de genes *downstream* e aumentou a tolerância das plantas transgênicas ao congelamento (KASUGA et al., 2004). Em plantas de tomate transgênico, a superexpressão do gene *DREB1B/CBF1* aumentou a tolerância ao congelamento e a seca (HSIEH et al., 2002), enquanto que, a superexpressão constitutiva do *DREB1A* em plantas de tomate transgênico não aumentou a tolerância ao congelamento (ZHANG et al., 2004). Arabidopsis e plantas de arroz transgênicos superexpressando *OsDREB1A* foram tolerantes à baixas temperaturas, alta salinidade e seca (DUBOUZET et al., 2003; ITO et al., 2006). No entanto, a superexpressão de ambos os *AtDREB1A* e *OsDREB1A* em arabidopsis causou grave retardo do crescimento sob condições ideais de crescimento (AGARWAL et al., 2006).

A superexpressão de *DREB2A* não resultou em quaisquer alterações fenotípicas em plantas transgênicas de arabidopsis, ou seja, nem retardou o crescimento, nem melhorou tolerância ao estresse (LIU et al., 1998). Isto sugere que a proteína DREB2A requer modificações pós-traducionais como fosforilação para sua ativação (LIU et al., 1998). Busk e Page's (1998) também informaram que a fosforilação é necessária para a ativação de proteínas sob condições de estresse por seca, aumentando assim a atividade de ligação ao DNA dos diversos fatores de transcrição. A utilização de protoplastos de arabidopsis, onde foi feita a exclusão interna de aminoácidos 136-165, fez com que a proteína *DREB2A* fosse constitutivamente ativa. A superexpressão desta forma constitutivamente ativa (*DREB2A-CA*) resultou em retardo do crescimento em plantas transgênicas de arabidopsis, aumentando a regulação de muitos genes induzidos pelo estresse, conferindo tolerância significativa ao estresse hídrico (SAKUMA et al., 2006a). Plantas de arabidopsis transgênicas expressando *ZmDREB2A* de milho foram anãs, e apresentaram melhora na tolerância ao déficit hídrico.

em arabidopsis transgênicas superexpressando *DREB2A-CA* (QIN et al., 2007). A superexpressão de *OsDREB2A* e *OsDREB2B* em arabidopsis transgênicas melhorou a tolerância a seca e ao choque térmico (MATSUKURA et al., 2010). A superexpressão de *StDREB2* em plantas de batata transgênica resultou no aumento da tolerância ao estresse salino (BOUAZIZ et al., 2012). Um estudo sobre do fator de transcrição DREB2C de arabidopsis (*AtDREB2C*), revelou que a tolerância ao estresse oxidativo de plantas transgênicas que superexpressam esse fator de transcrição foi significativamente maior do que de plantas do tipo selvagem (HWANG et al., 2012).

A superexpressão do gene *GmDREB1* classificado no sub-grupo A-5 da sub-família *DREB*, resultou em um aumento a tolerância a seca e a alta salinidade e não retardou o crescimento das plantas de arabidopsis transgênicas (CHEN et al., 2007).

Estas observações sugerem que as proteínas DREB são importantes fatores de transcrição que regulam a expressão de genes relacionados ao estresse abiótico e desempenham um papel essencial na adaptação das plantas ao estresse.

Embora estes genes já tenham sido descritos em muitas espécies, há uma falta de informação a respeito de sequência, estrutura, expressão e função de genes *DREB* em feijão. Dessa forma, em um projeto anterior desenvolvido por Caldas e Tsai (2009; 2011 e 2012), quatro *Open Reading Frames (Orfs)* de genes *DREB* foram clonados de uma variedade de feijoeiro tolerante ao déficit hídrico e uma análise abrangente de sequência, estrutura e expressão dos mesmos foi realizada.

De acordo com os agrupamentos obtidos de análises filogenéticas, os genes foram denominados *PvDREB2C*, *PvDREB5A*, *PvDREB5B* e *PvDREB6A*. Ferramentas de bioinformática para predição mostraram que os quatro *DREB*s de feijoeiro possuem apenas uma cópia do domínio AP2, o qual se dobra um uma estrutura com três folhas- β e uma α -hélice (CALDAS; TSAI, 2011).

A superexpressão de fatores de transcrição em plantas é uma ferramenta importante visando à tolerância a múltiplas condições de estresse. Feijão e soja transgênicos contendo o gene *AtDREB2A* estão sendo desenvolvidos pela Embrapa (Unidades Arroz e Feijão e Soja) com o objetivo de obter plantas tolerantes a seca (POLIZEL et al., 2011; BIANCO et al., 2012). Sabe-se que arabidopsis é modelo de estudo que vem sendo utilizado para a caracterização funcional de genes de diversas espécies tanto monocotiledônea como dicotiledôneas (AGARWAL et al., 2006; CHEN et al., 2007; MATSUKURA et al., 2010; YING et al., 2012). Por isso, os genes *DREB* de *Phaseolus vulgaris*, assim como aqueles

regulados por eles, podem representar uma importante fonte de tolerância em plantas ainda não investigada.

Ferramentas de bioinformática para predição mostraram que o *DREB6A* de feijoeiro possui apenas uma cópia do domínio AP2, o qual se dobra um uma estrutura com três folhas- β e uma α -hélice. Também foi predito que a proteína PvDREB6A de feijão possui um peptídeo sinal de localização cloroplastidial cujos homólogos em soja e arabidopsis não possuem. Análises por RT-qPCR de plantas de feijoeiro submetidas a diferentes tipos de estresses abióticos mostraram que em condições controle, isto é em níveis basais, o transcrito *PvDREB6A* é mais abundantes em folhas e raízes e muito baixos em caules. Já, em tratamentos de seca, salinidade e frio o gene foi ativado em caules e raízes sob seca e sal. O gene *PvDREB6A* foi ativado em todos os tratamentos testados (CALDAS; TSAI, 2011). Este gene foi então selecionado para o desenvolvimento deste estudo, visando a sua caraterização funcional.

1.3 Mecanismos de aquisição de tolerância ao déficit hídrico

Plantas são expostas a condições ambientais adversas que podem afetar seu crescimento, desenvolvimento e produtividade, e a sua sobrevivência vai depender da capacidade de perceber, responder e se adaptar a essas condições. Estresses abióticos como seca, sal e alta/baixa temperatura, geralmente levam a alterações na expressão de genes e no metabolismo celular das plantas pelo desenvolvimento de uma rede de sinalização complexa a nível molecular, celular e sistêmico (RASHID et al., 2012). A resposta da planta depende do tecido ou órgão afetado, com diferenciação de expressão gênica em raízes, caules e folhas dependendo do tipo de estresse, nível e tempo de duração (TATTERSALL et al., 2007; DINNENY et al., 2008; PINHEIRO; CHAVES, 2011).

As respostas moleculares das plantas ao estresse abiótico envolvem múltiplas vias de sinalização celular e através de interações o *crosstalk* é ativado; e essas interações provavelmente estão envolvidas com mecanismos que permitem a planta responder ao estresse com processos biológicos apropriados (SHANKER; VENKATESWARLU, 2011). Mecanismos de resposta ao estresse podem ser agrupados em duas categorias: (i) mecanismos de prevenção, evitando a exposição ao estresse e (ii) mecanismos de tolerância, que permitem a planta resistir ao estresse (BUCHANAN; GRUÍSSEM; JONES, 2002).

Segundo Roychoudhury; Paul; Basu, (2013) sob condições de estresse, a alteração da expressão de genes pode ativar três categorias funcionais principais de sinalização na célula: (i) sinalização do estresse osmótico ou iônico para restabelecer a homeostase celular, (ii) sinalização de desintoxicação para controlar e reparar os danos e (iii) a sinalização para coordenar a divisão e a expansão celular. Em um estudo realizado por Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007), em que a análise de transcriptoma em larga-escala foi realizada, foi possível classificar os genes de resposta ao estresse em dois grupos. O primeiro grupo é constituído de genes funcionais que controlam o acúmulo de solutos compatíveis (enzimas-chave na biossíntese de osmólitos como prolina, betaína, açúcares, etc.), o transporte passivo através da membrana (transportadores de membrana), sistemas que requerem energia para o transporte de água (aquaporinas), a proteção e estabilização das estruturas celulares contra dissecação e danos causados por ROS (enzimas de desintoxicação, glutathiona S-transferase, catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, etc.), enzimas para o metabolismo de ácidos graxos, inibidores de proteinase, proteínas de transferência de lipídeos, ferritina, e outras proteínas para a proteção de macromoléculas (proteínas LEA, osmotina, chaperonas, antifreeze, etc). O segundo grupo de genes compreende proteínas que regulam a transdução de sinal gerada pelo estresse e modulam a expressão gênica. Eles incluem vários TFs, proteínas quinases, mitogen activated protein kinase (MAPK), calcium dependente protein kinase (CDPK), proteínas fosfatases e proteinases (fosfoesterases e fosfolipase C, etc).

A tolerância ou susceptibilidade aos estresses abióticos é um fenômeno muito complexo, em parte, porque múltiplos estresses podem afetar a planta durante todo o seu ciclo de vida. Não somente isso, mas experimentos de melhoramento genético revelaram que a tolerância aos estresses abióticos é direcionada por múltiplos *loci*, possuindo natureza multigênica (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Como foi dito anteriormente, a alteração da expressão gênica durante situações de estresse é fundamental para a percepção e resposta envolvendo mecanismos de adaptação que levam a tolerância, entre eles:

i. Biossíntese de osmoprotetores

Osmoprotetores estão entre as substâncias mais importantes para os seres vivos e estão presentes em bactérias, fungos, plantas superiores e animais. Osmoprotetores de plantas são compostos basicamente de carboidratos ou aminoácidos, possuem baixo peso molecular e não são tóxicos em alta concentração (YANCEY, 2005). Diante de condições de estresse

osmótico, as plantas apresentam aumento na síntese dessas moléculas que são osmólitos orgânicos, ou solutos compatíveis, fundamentais para a manutenção da homeostase celular, mantendo o turgor celular (RONTEIN; BASSET; HANSON, 2002). Alguns osmólitos podem também atuar como removedores de moléculas radicais livres ou como chaperonas pela direta estabilização da membrana e/ou proteínas (McNEIL; NUCCIO; HANSON, 1999). Entre os principais metabólitos osmoprotetores em plantas destacam-se a prolina e a glicina-betaína que são acumuladas em plantas sob estresse.

A prolina é um açúcar, com efeito osmoprotetor, essencial para o metabolismo primário na célula em condições de desidratação celular ou alta salinidade, ela pode atuar como chaperonas moleculares contribuindo para manter a estabilidade do pH no citosol da célula, ou ainda, como um composto antioxidante que elimina radicais livres altamente reativos na célula (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

A glicina-betaína é sintetizada a partir de colina e pela ação de uma mono-oxigenase, sendo oxidada em uma molécula aldeído (betaína), usando ferredoxina reduzida fotossintéticamente e oxigênio molecular. Uma segunda enzima, a betaína aldeído desidrogenase converte betaína em glicina-betaína (JAGENDORF; TAKABE, 2001; BUCHANAN; GRUÍSSEM; JONES, 2002). Ela é acumulada no cloroplasto e plastídios em plantas sob seca, alta salinidade ou frio e assim como a prolina apresenta ação antioxidante e ajuda na manutenção do controle osmótico da célula (CHEN; MURATA, 2008).

ii. Aquaporinas

Proteínas aquaporinas compreendem uma superfamília de proteínas altamente conservadas, *major intrinsic proteins* (MIP), que desempenham um papel importante no transporte de água em plantas. São proteínas integrais de membrana que facilitam a difusão de água e de algumas pequenas moléculas sem carga pela membrana plasmática, elas contribuem para o transporte de água intra e transcelular em raízes e outros órgãos, e participam da manutenção dos níveis de água na célula, contribuindo para homeostase, se tornando essenciais para a sobrevivência da planta sob seca (LUU; MAUREL, 2013).

Em condições de déficit hídrico, dois mecanismos opostos de ação das aquaporinas têm sido descritos na literatura para explicar a sua contribuição para tolerância ao estresse. Um dos mecanismos envolve o aumento do número de aquaporinas na célula, pela ativação de genes aquaporinas que são induzidos sob estresse. Outro mecanismo de ação seria a repressão de genes aquaporinas, diminuindo a sua síntese e consequentemente evitando a perda excessiva de água pela célula (HACHEZ et al., 2006).

A análise da expressão gênica de aquaporinas em cinco acessos de arabidopsis sugere que membros das sub-famílias *membrane intrinsic protein* (PIP) e *tonoplast intrinsic protein* (TIP) são coordenadamente regulados pela seca (ALEXANDERSSON et al., 2010). Os processos regulatórios PIPs e TIPs incluem o controle por TFs e mecanismos de regulação pós-transcricional (MAUREL et al., 2008). Alguns estudos indicam que PIP1s e PIP2s em várias espécies de plantas podem ser fosfoliladas em múltiplos sítios na porção N-terminal ou C-terminal tornando-se ativas, e essas modificações podem ser induzidas mediante condições de estresse (NÜHSE et al., 2004).

A superexpressão de genes aquaporinas é uma estratégia que vem sendo usada para o entendimento das relações hídricas da planta sob estresses abióticos. Vários estudos indicam que o aumento da expressão de aquaporinas em plantas transgênicas está intimamente relacionado ao aumento da tolerância ou da sensibilidade ao estresse (AHARON, 2003; KATSUHARA et al., 2003; PENG; LIN; CAI, 2007; ZHANG et al., 2013).

iii. Removedores de ROS

Quando a planta está sob estresse, um fenômeno muito comum é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxido (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH) que podem causar danos à membrana, degradação de proteínas, peroxidação lipídica afetando de diversas formas o metabolismo celular. As plantas desenvolveram um sistema antioxidante complexo que envolve a ação de enzimas antioxidantes, o ciclo da glutationa-ascorbato e a superóxido dismutase para prevenir os efeitos prejudiciais das ROS (BUCHANNAN; GRUISSEM; JONES, 2002).

Aminoácidos contendo enxofre como a cisteína e a metionina são importantes na sinalização redutora na célula em situações de estresse. A cisteína é um metabolito central que serve como doador de enxofre na síntese de metionina, grupos ferro-enxofre, algumas vitaminas, como tiamina e biotina, ácido lipóico e coenzima A, glutationa (GSH) e proteínas contendo tióis (HELL, 2011). A GSH em sua forma reduzida desempenha um papel importante como o principal agente tamponante redox celular que mantém o ambiente intracelular reduzido e, assim, promove a remoção de ROS. Além disso, contribui para a manutenção da estrutura e função das proteínas no ambiente intracelular, protegendo a planta de danos oxidativos (SZALAI et al., 2009).

Todas as plantas possuem GSH ou seus homólogos e o aumento dos níveis de GSH, seja pelo aumento da capacidade biossintética ou pela atividade da glutationa redutase (GR) que converte GSSG em GSH, tem sido relacionado à melhora na resistência ao estresse oxidativo e também a tolerância aos estresses abióticos. Alguns trabalhos relatam o aumento da concentração de GSH em situações de estresses abióticos (ZAGORCHEV et al., 2012; PYNGROPE et al., 2013; KUMAR et al., 2013).O GSH em níveis elevados na célula pode participar do ciclo glutationa-ascorbato onde será convertido na forma dissulfito (GSSG) alterando a biossíntese de GSH, ou pode servir de substrato para a ação de enzimas glutationa-s-transferases (GSTs) (PAREEK et al., 2010). GSTs compreendem uma extensa família de proteínas com diversas funções. Mais de 90 genes que codificam GSTs são transcritos em diferentes espécies de plantas, muitos dos quais são diferencialmente induzidos por estresse. GSTs catalisam a conjugação de GSH a um substrato eletrofílico, como por exemplo, eles podem catalisar a conversão de H2O2 por meio de GSH produzindo GSSG (CHI et al., 2011). Em plantas, suas funções incluem o transporte de flavonóides, a detoxificação de ROS e radicais livres, morte celular programada (pelo aumento de ROS), entre outras (DIXON; LAPTHORN; EDWARDS, 2002).

O GSH está presente em cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e nesses compartimentos participam de sistemas antioxidantes para evitar o estresse oxidativo e consequentemente dano aos principais compartimentos celulares.

iv. Poliaminas

Poliaminas (PAs) são compostos de baixo peso molecular, encontrados em todos os organismos vivos, possuem natureza catiônica, com alta afinidade por ânions como DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas ácidas, bem como, grupos aniônicos na membrana e na parede celular (BUCHANAN; GRUÍSSEM; JONES, 2002). As PAs mais abundantes em plantas são a putrecina, espermina e espermidina e elas podem se acumular em altos níveis sob condições de estresse hídrico possuindo papel importante na sinalização e na proteção contra o estresse. A possível contribuição das PAs seria através da via de conversão de putrescina a espermina (com liberação de H_2O_2) levando a reciclagem das PAs e também a amplificação do sinal pelas ROS com geração de peróxido de hidrogênio (ALCÀZAR et al., 2012).

v. Transdução de sinal

Estímulos gerados por condições ambientais adversas podem ativar vias de transdução de sinal, que são iniciadas quando ocorre a percepção do sinal por proteínas receptoras localizadas na superfície da membrana, que vão transmitir o sinal para mensageiros primários e secundários na célula. Os mensageiros secundários na via de sinalização por ABA incluem Ca²⁺, fosfolipídeos, ROS que também estão presentes em vias desinalização de outros fitormônios como do ácido salicílico (AS) e do etileno (PAREEK et al., 2010). Estes sinais secundários induzem a expressão de genes (fatores de transcrição, MAPKs, CDPKs, proteinases, etc) que, nesse caso, vão ativar uma cascata de resposta gerada por estresses abióticos (AGARWAL et al., 2006; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2007).

Ions Ca^{2+} são conhecidos como os principais mensageiros secundários na transdução de sinal em eucariotos. Em plantas, a família multigênica de proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), é importante na percepção da oscilação dos níveis de Ca^{2+} intracelular, que por sua vez, vão desencadear diversos processos regulatórios na célula, como a fosforilação de proteínas no citosol ou o fechamento estomático (SCHULZ; HERDE; ROMEIS, 2013). Normalmente, as células mantêm baixos níveis de Ca^{2+} no citosol para facilitar processos de sinalização. Quando a célula recebe o sinal, canais de Ca^{2+} se abrem transitoriamente e a concentração de Ca^{2+} aumenta rapidamente. Uma grande quantidade de proteínas que se ligam ao Ca^{2+} é ativada incluindo as CDPKs, e essa ativação ocorre por modificações em sua estrutura. CDPKs geralmente são reguladores positivos em resposta aos estresses abióticos, e superexpressão desses genes leva ao aumento da tolerância ao estresse (ASANO et al., 2012; BOUDSOCQ; SHEEN, 2013).

Um dos mecanismos mais bem estudados de sinalização em plantas é cascata de MAPKs, que compreendem uma classe de proteínas quinases que são fosforiladas em cascata, sendo responsáveis pela regulação direta de fatores de transcrição, e promovem a ligação entre a percepção do estímulo externo e as mudanças na organização celular ou expressão gênica (TAJ et al., 2010). As MAPKs são reguladas por proteínas fosfatases (que atuam na desfoforilação de proteínas alvo), que por sua vez, podem ser alvo de modificações por ROS, desse modo, alterações na atividade de fosfatases afetam a sinalização MAPKs associadas às ROS (BUCHANAN; GRUÍSSEM; JONES, 2002).

vi. ABA

Os mecanismos pelos quais as plantas adquirem tolerância aos estresses abióticos são complexos e entender como a planta é capaz de sobreviver nessas condições muitas vezes se torna um desafio. O principal fitormônio que possui papel fundamental na adaptação ao estresse é o ABA, uma molécula pequena com 15 carbonos, que regula processos essenciais na planta, incluindo inibição da germinação, manutenção da dormência das sementes, controle do fechamento estomático e também regula o crescimento e desenvolvimento vegetal (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002).

Um acúmulo significativo de ABA em plantas ocorre em resposta ao déficit hídrico, esse hormônio é produzido nas raízes e transportado para as folhas pelo xilema. O aumento da concentração de ABA nas folhas induz o fechamento estomático que diminui a taxa de trocas gasosas e isso resulta na redução da taxa fotossintética e na redução da perda de água. A principal função do ABA é regular o balanço hídrico na célula e a tolerância ao estresse osmótico. O aumento do ABA endógeno também induz a alteração da expressão de alguns genes relacionados ao estresse em plantas (HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2007).

Muitos sinais interagem cooperativamente e sinergisticamente para produzir o efeito final desejado. Estresses abióticos em plantas ativam vias de sinalização que podem ser ABAdependente ou independente. Múltiplos sinais de estresse e o ABA ativam elementos comuns às vias de sinalização que fazem *crosstalk*, ou seja, ocorre a interação entre esses elementos comuns as duas vias afetando uma a outra, competindo por uma molécula alvo (Ca²⁺) com o objetivo de atingir, dessa forma, um controle fino para aquisição da homeostase celular (KNIGHT; KNIGHT, 2001). O gene *Rd29A* é um exemplo de gene regulado pelas duas vias de sinalização, pois apresenta tanto o elemento *Abicisic acid responsive element* (ABRE) que é ativado na via ABA-dependente, quanto o *dehydration responsive element/cold-responsive element* ou C-repeat (DRE/CRT), que é ativado na via ABA-independente, respondendo a estímulos de seca, salinidade, frio e ABA (ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013).

vii. Etileno

O gás etileno é um fitohormônio que regula aspectos gerais do crescimento e desenvolvimento da planta, sob condições normais controla o amadurecimento, germinação, florescimento, elongação e senescência. Além dessas funções, o etileno está envolvido na regulação da resposta a estresses bióticos e abióticos. Plantas expostas a estresses ambientais
aumentam a produção de etileno e a biossíntese deste composto é feita da mesma forma que em condições normais (IQBAL et al., 2013).

O etileno pode promover *crosstalk* entre as vias de sinalização CDPKs e MAPKs para o controle de resposta ao estresse em plantas. A expressão transiente do gene *NtCDPK2* de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) demonstrou que este é um ponto convergente na transdução de sinal em plantas e controla a resposta durante estresses bióticos e abióticos pela ativação das vias do etileno e ácido jasmônico (JA) (LUDWIG et al., 2005). Em arabidopsis, a indução do *ethylene responsive fator 1* (ERF1) um fator de transcrição que regula a expressão diferencial de genes em resposta ao ataque de patógenos, é feita mediante o sinergismo entre o etileno e o ABA (LORENZO et al., 2003).

1.4 O uso de mutantes para realização de estudos funcionais em plantas

Arabidopsis thaliana é uma planta que tem sido adotada como um sistema modelo para estudo de genômica funcional devido ao seu curto ciclo de vida, genoma pequeno e alta densidade de genes, ela é um membro da família Brassicaceae, e é naturalmente distribuída pela Europa, Ásia e América do Norte (PARINOV; SUNDARESAN, 2000). Ao final do ano 2000, o genoma de *Arabidopsis thaliana* do ecotipo Columbia (Col-0) foi completamente sequenciado e 26.828 genes foram preditos dos quais, 25.540 foram anotados como codificadores de proteínas (YAMADA; LIM; DALE, 2003).

A completa inativação de um gene é uma das melhores ferramentas para entender sua função, e o processo de inserção de mutagênese em larga-escala no qual uma molécula de DNA exógeno é capaz de uma integração não específica no genoma (interrompendo a sequência de um gene) é uma das estratégias mais efetivas para estudo de genômica funcional (KRYSAN et al., 2002). A inserção de um T-DNA em regiões codificadoras dos genes leva a sua completa inativação, e essa inserção não pode ser experimentalmente controlada, sendo necessária a criação de uma ampla população de mutantes para atingir a saturação ao ponto que cada inserção seja avaliada quase que para cada gene. Um método desenvolvido por Malley et al. (2007), que se baseia em uma PCR mediada pela ligação de adaptadores, permitiu fazer um *screening* de mais de 150.000 mutantes gerados pela inserção de T-DNA sendo esse método usado também para o mapeamento de mutantes individuais.

A determinação da função de um gene é realizada através de estudos de caracterização funcional ou genética reversa, onde se avalia o efeito do ganho e da perda da função de um gene. A superexpressão de genes em plantas mutantes nos permite entender os mecanismos com os quais estes estão envolvidos, que pode ser desde processos regulatórios durante o estágio de crescimento e desenvolvimento da planta até mesmo mecanismos de resposta contra estresses bióticos e abióticos.

1.5 Transformação genética de plantas

A engenharia genética é uma tecnologia que permite a manipulação direta do genoma de um organismo pela introdução de um gene e elementos regulatórios, ou pela diminuição da expressão de genes endógenos. Para cada um desses pontos, a construção de DNA é inserida em um ou mais cromossomos ao acaso e em um ou mais *loci* (LIU; YUAN; STEWART JUNIOR, 2013). As principais ferramentas de introdução de genes em plantas são o método de transferência de DNA via *Agrobacterium tumefaciens* e a transferência direta do DNA por meio de partículas por bombardeamento.

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria gram-negativa presente no solo, que possui habilidade natural de transferir seus genes para a planta hospedeira levando ao desenvolvimento de uma doença agronomicamente importante em plantas dicotiledôneas chamada de galha-da-coroa. Essa doença é caracterizada pelo crescimento de um tumor na região caulinar, que se desenvolve pela transferência do T- DNA, uma região que contém os oncogenes, que está localizado no plasmídeo *Tumor induced* (Ti), e se integra ao genoma da planta hospedeira induzindo a síntese de auxinas, citocininas e genes que codificam para síntese de opinas (ANAMI et al., 2013). Quando algum tecido da planta hospedeira sofre lesão ocorre à liberação de moléculas como açúcares e compostos fenólicos induzindo a expressão de genes de virulência (Vir) da bactéria, os quais iniciam a síntese de proteínas que serão responsáveis pelo transporte e manutenção da integridade do T-DNA a ser incorporado ao genoma da planta (GELVIN, 2012).

Para obter linhagens de *Agrobacterium* capazes de transferir o material genético sem manifestar a doença é necessário desarmá-las e isso é feito por um processo de dupla recombinação onde a região contendo os oncogenes é trocada geralmente por genes de resistência a antibióticos que permitirão a seleção dessas bactérias. Uma vez obtida a linhagem desarmada, a *Agrobacterium* estará pronta para receber o vetor binário de

transformação (derivado de plasmídeos capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*) que deverá conter uma origem de replicação apropriada, o gene de interesse e um gene marcador seletivo para seleção das plantas transformadas. A *Agrobacterium* transformada geralmente é co-cultivada com explantes que após a transformação serão submetidos a meios de cultura específicos para a regeneração de plantas transformadas. Em arabidopsis, a transformação consiste na submersão dos botões florais na cultura de *Agrobacterium* e as plantas transgênicas são selecionadas a partir das sementes (CLOUGH; BENT, 1998).

A aceleração de partículas por bombardeamento é um método alternativo de transformação desenvolvido pela necessidade de transformar plantas recalcitrantes ao método via *Agrobacterium*, e plantas monocotiledôneas que naturalmente não são infectadas por *Agrobacterium* e incluem as principais culturas economicamente importantes como cana-de-açúcar, arroz, cevada, milho e trigo. Esse método direto de transformação consiste em disparar microprojéties de ouro ou tungstênio a uma alta velocidade para inserir o DNA aderido a sua superfície em células vivas. Uma vez dentro da célula, o DNA será eluído da partícula e incorporado ao núcleo levando a uma transformação relativamente estável (SANFORD, 1988).

Independente do método de transformação, o desenvolvimento de plantas transgênicas é uma excelente estratégia para a obtenção de plantas capazes de se adaptar a condições ambientais adversas como a resistência a pragas, seca, altas/baixas temperaturas e alta salinidade. Além disso, plantas transgênicas com características como alto teor nutricional ou ainda com compostos de efeito antibiótico também estão sendo desenvolvidas. A liberação comercial de organismos geneticamente modificados (OGMs) no Brasil, já é realidade para culturas como soja, milho, algodão e feijão que nesses casos podem possuir resistência a insetos, doenças e tolerância a herbicidas (BRASIL, 2014).

Referências

ACOSTA-GALLEGOS, J.; KOHASASHI-SHIBATA, J. Effect of water stress on growth and yield of indeterminatedry-beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivar. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 20, p. 81–93, 1989.

AGARWAL, P. K.; AGARWAL, P.; REDDY, M. K.; SOPORY, S. K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, p. 1263–1274, 2006.

AHARON, R.; SHAHAK, Y.; WININGER, S.; BENDOV, R.; KAPULNIK, Y.; GALILI, G. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 439–447, 2003.

ALCÀZAR, R.; BITRIÁN, M.; ZARZA, X.; TIBURCIO, A. F. Polyamine metabolism and signaling inplant abiotic stress protection. In: MUÑOZ-TORRERO, D.; HARO, D.; VALLÈS, J. (Ed.). **Recent advances in pharmaceutical sciences II**. Kerala, India: Transworld Research Network, 2012. cap. 3, p. 29-47.

ALEXANDERSSON, E.; DANIELSON, J. A.; RADE, J.; MOPARTHI, V. K.; FONTES, M.; KJELLBOM, P.; JOHANSON, U. Transcriptional regulation of aquaporin sin accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 650–660, 2010.

ANAMI, S.; NJUGUNA, E.; COUSSENS, G.; AESAERT, S.; LIJSEBETTENS, M. V. Higher plant transformation: principles and molecular tools. **International Journal Development Biolology**, Bilbao, v. 57, p. 483-494, 2013.

ASANO, T.; HAYASHI, N.; KIKUCHI, S.; OHSUGI, R. CDPK-mediated abiotic stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 7, p. 817–821, 2012.

BALASUBRAMANIAN, P.; VANDENBERG, A.; HUCL, P.; GUSTA, L. Resistance of Phaseolus species to ice crystallization at subzero temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, p. 451–457, 2004.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton, v. 21, p. 1–36, 2005.

BEAVER, J. S.; ROSAS, J. C.; MYERS, J.; ACOSTA, J.; KELLY, J.D.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; MISANGU, R.; BOKOSI, J.; TEMPLE, S.; ARNAUD-SANTANA, E.; COYNE.D.P. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 82, p. 87-102, 2003.

BIANCO, L. F.; CARVALHO, J. F. C.; TERASSI, F. S.; SEINO, Y. W.; TREVIZAN, F. H.; ONOFRE, E.; NEUMAIER, N.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FARIAS, J. R. B.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Crescimento de soja geneticamente modificada com osgenes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob déficit hídrico. In: JORNADA ACADÊMICA EMBRAPA SOJA, 7., 2012, Londrina, PR. Londrina: Embrapa Soja, 2012.

BLAIR, M. W.; ASTUDILLO, C.; GRUSAK, M.; GRAHAM, R.; BEEBE, S. Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, p. 197-207, 2009.

BOUAZIZ, D.; PIRRELLO, J.; AMOR, H. B.; HAMMAMI, A.; CHARFEDDINE, M.; DHIEB, A.; BOUZAYEN, M.; GARGOURI-BOUZID, R. Ectopic expression of dehydration responsive element binding proteins (StDREB2) confers higher tolerance to salt stress in potato. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 60, p. 98-108, 2012.

BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. CDPKs in immune and stress signaling. Trends in Plant Science, Kidlington, v. 18, p. 30–40, 2013.

BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R.; SHARMA, V. K.; KIEFT, H.; OUELLET, T.; ZHANG, L.; HATTORI, J.; LIU, C. M.; VAN LAMMAREN, A. A.; MIKI, B. L.; CUSTERS, J. B.; VAN LOOKEREN, C. M. M. Ectopic expression of baby boom triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 1737–49, 2002.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Aprovações comerciais**. Plantas – soja. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<u>http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14782.html</u>>Acesso em: 23 jan. 2014.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Censo**: agricultura familiar produz mais em menor área. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <<u>http://portal.mda.gov.br/portal/noticias/item?item_id=3594546</u>>. Acesso em: 09 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Agrário. **Perfil do feijão do Brasil**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <<u>http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais</u>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. p. 1158–1203.

BROUGHTON, W. U. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 55–128, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEN, W.; RUSSELL, L. J. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUSK, P. K.; JENSEN, A. B.; PAGE`S, M. Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab17 from maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 1285–1295, 1997.

CALDAS, D. G. G.; TSAI, S. M. Temporal and Spatial Regulation Analysis of Four DREBs Cloned from Phaseolus vulgaris Under Three Abiotic Stresses. In: PLANT AND ANIMAL GENOME, 20., 2012, San Diego. **Proceedings...** San Diego, 2012. CALDAS, D. G. G.; TSAI, S. M. Sequence and gene expression comparison among four new DREBs cloned from Phaseolus vulgaris. In: KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELL BIOLOGY, 2011, Keystone, CO. **Proceedings...** Keystone, 2011.

CALDAS, D. G. G.; GOMES, J. E.; TSAI, S. M. Cloning of a Phaseolus vulgaris DREbinding Transcription Factor. In: INTERNATIONAL PLANT MOLECULAR BIOLOGY CONGRESS, 9., 2009, Saint Louis. **Proceedings...** Sain Louis, 2009.

CALDAS, D. G. G.; GOMES, J. E.; TSAI, S. M. Análisis de la expresión génica de un factor de transcripción DREB en tejidos de frijol sometidos a estrés hídrico. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA, 14., 2010, Vina del Mar, Chile. **Anais...** Vina del Mar, Chile: ALAG, 2010.

CARILLO, P.; ANNUNZIATA, M. G.; PONTECORVO, G.; FUGGI, A.; WOODROW, P. Salinity stress and salt tolerance. In: ARUN, S. (ed.). Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations. Rijeka, Croatia: Intech, 2011. p. 22–38.

CHEN, M.; WANG, Q.-Y.; CHENG, X.-G.; XU, Z.-S.; LI, L.-C.; YE, X.-G.; XIA, L.-Q; MA, Y.-Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, p. 299-305, 2007.

CHEN, M.; XU, Z.; XIA, L.; LI, L.; CHENG, X.; DONG, J.; WANG, Q.; MA, Y. Coldinduced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean (Glycine max L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p.121–135, 2009.

CHEN, J. Q.; MENG, X. P.; ZHANG, Y.; XIA, M.; WANG, X. P. Overexpression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 30, p. 2191–2198, 2008.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N.Glycinebetaine: an effective protectant againstabiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 13, p. 499-505, 2008.

CHI, Y.; CHENG, Y.; VANITHA, J.; KUMAR, N.; RAMAMOORTHY, R.; RAMACHANDRAN, S.; JIANG, S. Y. Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione S-transferase family in Sorghum and other higher plants. **DNA Research**, Tokyo, v. 18, p. 1–16, 2011.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 437–448, 2005.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 12, p. 133–139, 2009.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2013-1014. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 40-46, 2013. Disponível em: em: em: <u>http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13 11 11 08 54 13 boletim portugu</u> es_novembro_2013_-_ok.pdf>Acesso em: 04. dez.13. CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 735-743, 1998.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. Bronx, NY: New York Botanical Gardens, 1988.

DINNENY, J. R.; LONG, T. A.; WANG, J. Y.; JUNG, J. W.; MACE, D.; POINTER, S.; BARRON, C.; BRADY, S. M.; SCHIEFELBEIN, J.; BENFEY, P.N. Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. **Science**, Washington, DC, v. 320, n. 5878, p. 942-945, 2008.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. Genome Biology, London, v. 3, p. 3004:1–3004:10, 2002.

FAO. **Perfil da agricultura familiar no Brasil**: dossiê estatístico. Brasília, DF, 1996. 24 p. (FAO. Projeto UFT/BRA/036/BRA).

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-, and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 751–763, 2003.

FERREIRA, C. M. **Mercado de feijão**. Brasília DF: Agência de Informação Embrapa, 2007. Disponível em: <<u>http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/</u> <u>AG01_69_1162003151646.html</u>> Acesso em: 06. dez. 2013.

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 15–45, 2002.

FOWLER, S.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **The Plant Cell,** Baltimore, v. 14, p. 1675–1690, 2002.

FREITAS, F. O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 1199–1203, 2006.

GELVIN, B. S. TRANSVERSING THE CELL: Agrobacterium T-DNA's journey to the host genome. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, p. 1-11, 2012.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, p. 1178–1186, 2012.

GUILFOYLE, T. J.; ULMASOV, T.; HAGEN, G. The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. Cellular and Molecular Life Science, Heidelberg, v. 54, p. 619-627, 1998.

42

HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, J. L.; PINEDA, O.; THOMASHOW, M. F.; ZHANG, J. Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 639–648, 2002.

HACHEZ, C.; ZELAZNY, E.; CHAUMONT, F. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, p. 1142-1156, 2006.

HANAI, L. R.; SANTINI, L.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; GEPTS, P.; TSAI, S. M.; VIEIRA, M. L. C. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 25–45, 2010.

HEINO, P.; PALVA, E.T. Signal transduction in plant cold acclimation. In: HIRT, H.; SHINOZAKI, K. (ed.). **Topics in current genetics**. v. 4. Plant responses to abiotic stress, Heidelberg: Springer-Verlag, 2003. p. 151–186.

HELL, R.; WIRTZ, M. Molecular biology, biochemistry and cellular physiology of cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Arabidopsis Book**, Washington, Dc, v. 9, n. 0154, 2011. doi: 10.1199/tab.0154.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, p. 343–351, 2007.

HSIEH, T. S.; LEE, J. T.; YANG, P. T.; CHIU, L. H.; CHARNG, Y. Y.; WANG, Y. C.; CHAN, M. T. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-*repeat/dehydration response element binding factor1* gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1086–1094, 2002.

HWANG, J. E.; LIM, C. J; CHEN, H.; JE, J.; SONG, C. AND LIM, C. O. Overexpression of Arabidopsis dehydration-responsive element-binding protein 2C confers tolerance to oxidative stress. **Molecular Cells**, Amsterdam, v. 33, p. 135-140, 2012.

INGRAM, J.; AND BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, 1996.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, p. 141–153, 2006.

IQBAL, N.; TRIVELLINI, A.; MASOOD, A.; FERRANTE, A.; KHAN, N. A. Current understanding on ethylene signaling in plants: The influence of nutrient availability. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 73, p. 128-138, 2013.

JAGENDORF, A. T.; TAKABE, T. Inducers of glycinebetaine synthesis in barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1827-1835, 2001.

JOFUKU, K. D.; DEN BOER, B. G. W.; VAN MONTAGU, M.; OKAMURA, J. K. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1211–1225, 1994.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, p. 346–350, 2004.

KATSUHARA, M.; KOSHIO, K.; SHIBASAKA, M.; HAYASHI, Y.; HAYAKAWA, T.; KASAMO, K. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants, **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, p. 1378–1383, 2003.

KILIAN, J.; PESCHKE, F.; BERENDZEN, K. W.; HARTER, K.; WANKE, D. Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1819, p. 166–175, 2012.

KIM, J-S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; NAKAJIMA, J.; OHORI, T.; TODAKA, D.; NAKASHIMA, K.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 52, p. 2136–2146, 2012.

KIZIS, D.; PAGE`S, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 679–689, 2002.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 1380–1385, 2001.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁSIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, p. 1301-22, 2011.

KRYSAN, P. J.; YOUNG, J. C.; JESTER, P. J. MONSON, S.; COPENHAVER, G.; PREUSS, D.; SUSSMAN, M. R. Characterization of T-DNA Insertion Sites in *Arabidopsis thaliana* and the Implications for Saturation Mutagenesis. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, New Rochelle, v. 6, p. 163-174, 2002.

KUMAR, S.; ASIF, M.H.; CHAKRABARTY, D.; TRIPATHI, R.D.; DUBEY, R.S.; TRIVEDI, P.K. Differential expression of rice lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditions. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 31, p. 569-580, 2013. doi:10.1007/s11105-012-0524-5.

LEWIN, B. Genes IX. Tradução de Andréa Queiroz Maranhão. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 912 p.

LI, X. P.; TIAN, A. G.; LUO, G. Z.; GONG, Z. Z.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 1355–1362, 2005.

LIN, R. C.; PARK, H. J.; WANG, H. Y. Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating lightand ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. **Molecular Plant**, Oxford, v. 1, p. 42–57, 2008.

LIU, L.; WHITE, M. J.; MACRAE, T. H. Transcription factors and their genes in higher plantsFunctional domains, evolution and regulation. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 262, p. 247-257, 1999.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 1391–1406, 1998.

LIU, W.; YUAN, J. S.; STEWART JUNIOR, C. N. Advanced genetic tools for plant biotechnology. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 14, p. 781-793, 2013.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 165–178, 2003.

LUDWIG, A. A.; SAITOH, H.; FELIX, G.; FREYMARK G.; MIERSCH, O.; WASTERNACK, C.; BOLLER, T.; JONES, J. D. G.; ROMEIS, T. Ethylene-mediated cross-talk betweencalcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. **Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 12, p. 10736-10741, 2005.

LUU, D.; MAUREL, C. Aquaporin trafficking in plant cells: an emerging membrane-protein model. **Traffic**, Copenhagen, v. 14, p. 629-635, 2013.

MAGNAN, F.; RANTY, B.; CHARPENTEAU, M.; SOTTA, B.; GALAUD, J. P.; ALDON, D. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from Arabidopsis thaliana, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. **Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 575–589, 2008.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 444, p. 139–158, 2005.

MALLEY, C. O. R.; ALONSO, M. J.; KIM, J. C.; LEISSE, J. T.; ECKER, R. J. An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the arabidopsis genome. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 2910-2918, 2007.

MATSUKURA, S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; TODAKA, D.; ITO, Y.; MARUYAMA, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics,** Berlin, v. 283, p. 185–196, 2010.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.; SANTONI V. Plant aquaporins: membrane channels withmultiple integrated functions. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 595–624,2008.

MCNEIL, S. D.; NUCCIO, M. L.; HANSON, A. D. Betaines and related osmoprotectants: targets for metabolic engineering of stress resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 945-949, 1999.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, p. 105–131, 2006.

MORRAN, S.; EINI, O.; PYVOVARENKO, T.; PARENT, B.; SINGH, R.; ISMAGUL, A.; ELIBY, S.; SHIRLEY, N.; LANDRIDGE, P.; LOPATO, S. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 230–249, 2011.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review in Plant Biology, Palo Alto, v. 59, p. 651–681, 2008.

NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 411–432, 2006.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 88–95, 2009.

NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA ,Y.; SEKI, M.; MIURA ,S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 657–665, 2000.

NÜHSE, T. S.; STENSBALLE, A.; JENSEN, O. N.; PECK, S. C. Phosphoproteomics of theArabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 2394–2405, 2004.

NURUZZAMAN, M.; SHARONI, A. M.; KIKUCHI, S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.4, p.1-16, 2013.

OKAMURO, J. K.; CASTER, B.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M. V.; JOFUKU, K. D. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding protein in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 94, p. 7076-7081, 1997.

PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT H. J.; GOVINDJEE. Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and genomic foundation. Heidelberg: Springer, 2010.

PARIDA, A.; DAS, A. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, New York, v. 60, p. 324–349, 2005.

PARINOV, S.; SUNDARESAN, V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 11, p. 157–161, 2000.

PENG, Y.; LIN, W.; CAI, W.; ARORA, R. Overexpression of a Panax ginseng tonoplast 947 aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in 948 transgenic Arabidopsis plants. **Planta**, Berlin, v. 226, p. 729–740, 2007.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we makemetabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 869-882, 2011.

POLIZEL, A. M.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R. B.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; FUNGATI, R.; RODRIGUES, F. A.; STOLF-MOREIRA, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1 for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.10, p.1-12, 2011.

PYNGROPE, S.; BHOOMIKA, K.; DUBEY, R.S. Reactive oxygen species, ascorbate–glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. **Protoplasma**, Lipzig, v. 250, p. 585–600, 2013.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN, L. S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 54–69, 2007.

RAE, L.; LAO, T. N.; KAVANAGH, A. T. Regulation of a multiple aquaporin genes in Arabidopsis by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. **Planta**, Berlin, v. 234, p. 429-444, 2011.

RIECHMANN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. The AP2/EREBP Family of plant transcription factors. **Journal of Biological and Chemistry**, Baltimore, v. 379, p. 633-646, 1998.

RONTEIN, D.; BASSET, G.; HANSON, A. D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. **Metabolic Engeneering**, Amsterdam, v. 4, p. 49-56, 2002.

ROYCHOUDHURY, A.; PAUL, S.; BASU, S. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscísico acid-independent pathways during abiotic stress. **Plant Cell Reports**, New York, v. 32, p. 985–1006, 2013.

ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S. Ascorbate-glutathione and planttolerance to various abiotic stresses. In: ANJUM, N. A.; UMAR, S.; AHMAD, A. (ed.). Oxidative stress in

plants causes, consequences and tolerance. New Delhi: IK International Publishing House, 2012. p. 177–258.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREB's, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 290, p. 998–1009, 2002.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought responsive gene expression. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1292–1309, 2006a.

SALES, W. DA S.; DE CALDAS, A. C. A.; DE SOUSA R. F.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C. Crescimento inicial de duas variedades do Feijão-caupi em condições de estresse hídrico. In: III Congresso Nacional de Feijão-Caupi (CONAC), Recife, Brasil. **Anais ...** CONAC, Recife, Brasil, 2013.

SANFORD, J. C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 6, p. 299–302, 1988.

SCHULZ, P.; HERDE, M.; ROMEIS, T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 163, p. 523-530, 2013.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, p. 279–292, 2002.

SHANKER, A. K.; VENKATESWARLU, B. Abiotic stress in plants - Physiological, biochemical and genetic perspectives. Rijeka, Croatia: Intech, 2011.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networksinvolved in drought stress tolerance and response. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 221–227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 327-334, 1997.

SHINWARI, Z. K.; NAKASHIMA, K.; MIURA, S.; KASUGA, M.; SEKI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 250, p. 161–170, 1998.

SIEBENEICHLER, S. C.; SANT'ANNA, R.; MARTINEZ, C. A.; MOSQUIM, P. R.; CAMBRAIA, J. Alterações na fotossíntese, condutânciaestomática e eficiência

fotoquímicainduzidas por baixa temperatura em feijoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, p. 37-44, 1998.

SOHN, K. H.; LEE, S. C.; JUNG, H. W.; HONG, J. K.; HWANG, B. K. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induce transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 897–915, 2006.

STUSHNOFF, C.; FOWLER, B.; BRUELE-BABEL, A. Breeding and selection for resistance to lowtemperature. In: VOSE, P. B.; BLIXT, S. G. (ed.). **Crop breeding**: a contemporary basis. Oxford: Pergamon Press, 1984. p. 115–136.

SUBBARAO, G. V.; JOHANSEN, C.; SLINKARD, A. E.; NAGESWARA, R. C.; RAO, SAXENA, N.P.; CHAUHAN, Y. S.; VIEIRA, R. F.; TSAI, S. M.; TEIXEIRA, M. A. Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, em solo tratado com lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, p. 1047-1050, 2005.

SZALAI, G.; KELLOS, T.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Glutathione as anantioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. Journal of Plant Growth Regulation, New York, v. 28, p. 66–80, 2009.

TAJ, G.; AGARWAL, P.; GRANT, M.; KUMAR, A. MAPK machinery in plants recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, p. 1370-1378, 2010.

TAKATSUJI, H. Zinc-finger transcription factors in plants. Cellular and Molecular Life Sciences, Basel, v. 54, p. 582-596, 1998.

TATTERSALL, E. A.; GRIMPLET, J.; DELUC, L.; WHEATLEY, M. D.; VINCENT, D.; OSBORNE, C.; ERGUL, A.; LOMEN, E.; BLANK, R. R.; SCHLAUCH, K. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Transcript abundance profiles reveal larger and more complexresponses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinitystress. **Functional Integrative Genomics**, Heidelberg, v. 7, p. 317-333, 2007.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids, Wien, v. 35, p. 753-759, 2008.

WANG, Y-M.; HE, C-F. Isolation and characterization of a cold induced DREB gene from Aloe vera L. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 25, p. 121–132, 2007.

WANG, Q.; GUAN, Y.; WU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; CHU, C. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 67, p. 589–602, 2008.

WANG, H.; LIANG, X.; WAN, Q.; WANG, X.; BI, Y. Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in Arabidopsis callus under salt stress. **Planta**, Berlin, v. 230, p. 293–307, 2009.

WEIGEL, D. The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 388-389, 1995.

XIANG, Y.; TANG, N.; DU, H.; YE, H.; XIONG, L. Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 48, n. 4, p. 1938-1952, 2008.

XU, P.; XIANG, Y.; ZHU, H.; XU, H.; ZHANG, Z.; MA, Z. Wheat cryptochromes: subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 760–774, 2009.

YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J. M. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, Washington, DC, v. 302, p. 842–846, 2003.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 251–264, 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration-stress in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 238, p. 17–25, 1993.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatorynetworks in cellular responses and tolerance to dehydrationand cold stresses. Annual Review Plant Biology, Palo Alto, v. 57, p. 781–803, 2006.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counter acting cyto protectants in high osmolarity and other stresses. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, p. 2819-2830, 2005.

YANG, Y.; WU, J.; ZHU, K.; LIU, L.; CHEN, F.; YU, D. Identification and characterization of two chrysanthemum (Dendronthema x moriforlium) DREB genes, belonging to the AP2/EREBP family. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 36, p. 71–81, 2009.

YING, S.; ZHANG, D.; FU,J.; SHI, Y.; SONG, Y.; WANG,T.; LI,Y.Cloning and characterization of a maize bZIP transcriptionfactor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerancein transgenic Arabidopsis. **Planta**, Berlin, v. 235, p. 253-266, 2012.

YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F. **Cultura do feijoeiro no Brasil**: característicasda produção. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 75 p.

ZADRAŽNIK, T.; HOLLUNG, K.; EGGE-JACOBSEN, W.; MEGLIČ, V.; ŠUŠTAR-VOZLIČ, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Journal of Proteomics**, Amsterdan, v.78, p.254-272, 2013.

ZAGORCHEV, L.; SEAL, C. E.; KRANNER, I.; ODJAKOVA, M. Redox state of low-molecular-weight thiols and disulphides during somatic embryogenesis of salt-treated

suspension cultures of *DactylisglomerataL*. Free Radical Research, London, v. 46, p. 656–664, 2012.

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. K. From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 615–621, 2004.

ZHANG, J.; LI, D.; ZOU, D.; LUO, F.; WANG, X.; ZHENG, Y.; LI, X. A cotton gene encoding a plasmamembrane aquaporin is involved in seedling development and in response to drought stress. Acta Biochimica and Biophysica Sinica, Shanghai, v. 45, p. 104–114, 2013.

ZHANG, X.; HENRIQUES, R.; SHIH-SHUN, L.; QI-WEN, N.; NAM-HAI, C. Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. **Nature Protocols**, London, v. 1, p. 1-6, 2006.

ZHAO, J.; REN, W.; ZHI, D.; WANG, L.; XIA, G. Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 1521–1528, 2007.

ZHAO, T.; XIA, H.; LIU, J.; MA, F. The gene family of dehydration responsive elementbinding transcription factors in grape (*Vitis vinifera*): genome-wide identification and analysis, expression profiles, and involvement in abiotic stress resistance. **Plant Molecular Biology Reports,** Heidelberg, v. 41, p. 1577-1590, 2014.

ZHUANG, J.; XIONG, A. S.; PENG, R. H.; GAO, F.; ZHU, B.; ZHANG, J. A.; FU, X. Y.; JIN, X. F.; CHEN, J. M.; ZHANG, Z.; QIAO, Y. S.; YAO, Q. H. Analysis of brassica rapaests: gene discovery and expression patterns of AP2/ERF family genes. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 37, p. 2485–2492, 2010.

2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *PvDREB6A* DE FEIJOEIRO

Resumo

Proteínas DREB (Dehydration Responsive Elements Binding) são fatores de transcrição que ativam genes específicos envolvidos na tolerância ao estresse abiótico. Para gerar novas informações na pesquisa com seca e outros estresses abióticos, variedades tolerantes, biologia molecular e bioinformática podem ser aplicadas para identificar e caracterizar genes que controlam a defesa da planta e os mecanismos de adaptação para o déficit hídrico, excesso de salinidade e altas/baixas temperaturas. Baseado nas informações disponíveis nos bancos de dados públicos, a sequência da Open Reading frame (Orf) completa do gene Phvul.009G029600.1|PACid:27146455 contendo 1062 pb foi encontrada e usada para o desenho dos primers, clonagem e para o sequenciamento. A nova sequência é muito similar ao AtRAP2.4 e foi nomeada como PvDREB6A, segundo a análise filogenética. Ferramentas de predição mostraram que a sequência apresenta 354 aminoácidos e possui uma cópia do domínio AP2, que se dobra em uma estrutura com três β -folhas e uma α -hélice apresentando resíduos importantes e motivos específicos de reconhecimento e de ligação ao DNA. Além disso, um peptídeo trânsito foi detectado na porção N-terminal com um sítio de clivagem no resíduo 52. A interação deste fator de transcrição com seu domínio de ligação ao DNA foi validada por Electro Mobility Shift Assay (EMSA). A localização subcelular foi verificada por expressão transiente de PvDREB6A::GFP em Nicotiana benthamiana e a expressão da GFP foi detectada no núcleo.

Palavras-chave: Feijão comum. Estresse abiótico. Análise *in silico*. Localização subcelular. EMSA.

Abstract

DREB (Dehydration Responsive Element Binding) proteins are transcription factors that activate specific genes involved in tolerance to abiotic stress. To generate new information on the research for drought and other abiotic stresses, tolerant varieties, molecular biology and bioinformatics can be applied to identify and characterize genes that control plant defenses and adaptation mechanisms to water deprivation, to salimity and to high/low temperatures. Based on public databases, a common bean DREB sequence was found and an in silico study was carried out. A complete Open reading frame (Orf) sequence Phvul.009G029600.1 PACid:27146455 containing 1062 bp was found and used for primer design and sequencing. The new sequence was very similar to AtRAP2.4 and named as PvDREB6A, according to phylogenetic analysis. Prediction tolls showed that the deduced 354 aa sequence has one copy of the AP2 domain, folding in a three β -sheets and one α -helix structure, and present important residues and motifs for DNA contacting and biding specificity. In addition, a chloroplast transit peptide was detected at the N-terminal region with cleavage site in the 52 residue. Binding activity of this transcription factor was validated by Electro Mobility Shift Assay (EMSA). Subcellular localization was verified by transient expression of PvDREB6A::GFP in Nicotiana benthamiana and the expression of GFP was detected in the nucleus.

Key-words: Common bean. Abiotic stress. In silico analysis. Subcellular localization. EMSA.

2.1 Introdução

Em todos os organismos vivos alguns genes podem ser expressos constitutivamente, entretanto, outros são expressos somente em resposta a estímulos específicos como em situações de estresse. O crescimento da planta e a sua produtividade são afetadas por estresses abióticos como seca, salinidade e alta/baixas temperaturas, e a expressão de genes induzidos por estes estresses são descritos em diversas espécies de plantas (PAREEK et al., 2010). Os mecanismos que permitem a planta responder a esses estresses a nível celular, molecular, bioquímico e fisiológico, envolve a ativação fatores de transcrição que regulam a transdução de sinais e modulam expressão gênica (ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013).

A classificação dos fatores de transcrição depende de suas características estruturais, e estudos de predição de domínios funcionais demonstram que fatores de transcrição típicos de plantas consistem em uma região de ligação ao DNA, um sítio de oligomerização, um domínio de regulação da transcrição e um sinal de localização nuclear (NLS) (LIU; WHITE; McRAE, 1999). Fatores de transcrição do tipo DREB (*Dehidration Responsive Element Binding*) pertencem à superfamília AP2/ERF (APETALA2/*Ethilene Responsive Element*) de fatores de transcrição, e são caracterizados pela presença de um único domínio funcional AP2 conservado. Esses fatores de transcrição de genes *downstream* que apresentam a sequência regulatória especifica de ação *cis* DRE (5'-A/GCCGAC-3') em sua região promotora (SHINOZAKI et al., 1997). Entretanto, tem sido demonstrado que ocorre *crosstalk* entre as vias de regulação ABA-dependente e ABA-independente mostrando que os genes *DREB* podem ser regulados em ambas as vias (LATA; PRASSAD, 2011).

Cada vez mais estudos de caracterização molecular de fatores de transcrição vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de entender processos regulatórios na célula tanto em condições normais de desenvolvimento da planta, como também sob a influência de estresses. Ferramentas de bioinformática podem auxiliar nesse processo, tornando possível uma análise detalhada da sequência de nucleotídeos, bem como de aminoácidos, dos genes de interesse. A predição de motivos, de domínios conservados, da localização subcelular, do número de aminoácidos na sequência, dos tipos de estruturas secundárias em que a proteína se dobrará e o seu tamanho podem ser determinadas utilizando-se estas ferramentas. Outra possibilidade são as análises filogenéticas, sem as quais, é impossível determinar a distância evolutiva entre as espécies, o ancestral comum que possuem, e o grupo as quais pertencem.

Proteínas *DREB* são importantes fatores de transcrição na regulação de genes relacionados ao estresse abióticos e embora estes genes já tenham sido descritos em muitas espécies, há uma falta de informações a respeito de sequência, estrutura, expressão e função de genes *DREB* em feijoeiro. Diante deste cenário, a primeira etapa deste trabalho consistiu na caracterização molecular do gene *PvDREB6A* de feijoeiro, com o objetivo de revelar a estrutura da proteína, determinar sua capacidade de interação com a molécula de DNA e a sua localização.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Análises in sílico

Estudos *in sílico* de quatro *Orfs* de genes *DREB* foram realizadas anteriormente por Caldas e Tsai (2011), onde, estas sequências foram clonadas de uma variedade de feijoeiro tolerante ao déficit hídrico BAT477 (ACOSTA-DÍAZ et al., 2009) e uma análise de estrutura e expressão dos mesmos em feijoeiro foram realizadas. Através de análises filogenéticas estes genes puderam ser nomeados de acordo com o grupo de genes *DREB* ao qual pertencem, sendo assim, *PvDREB2C*, *PvDREB5A*, *PvDREB5B* e *PvDREB6A*.

A sequência de nucleotídeos e também de aminoácidos do gene *PvDREB6A* cujo número de identificação encontrado no banco público de dados do *Phytozome* é Phvul.009G029600.1|PACid:27146455, foi utilizada para a predição de domínios conservados em sua sequência e para análises filogenéticas. Sequências ortólogas do gene *PvDREB6A* em soja (*Glicine max*), *Arabidopsis thaliana*, *Mendicago truncatula*, e arroz (*Oryza sativa*) obtidas do *Phytozome* foram usadas para construção da árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining* com o auxílio do *software* de bioinformática MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Para a predição de motivos utilizou-se o MEME *Multiple Em for Motif Elucidation* versão 4.9.1, com amplitude mínima de 6 e máxima de 60, e o número máximo de motivos foi 13 (THE MEME SUITE, 2014).

Para a predição da localização subcelular, várias ferramentas de bioinformática gratuitas disponíveis foram usadas, sendo elas, *Wolf PSORT* (HORTON et al., 2007), *Subnuclear Compartiments Prediction Systems* versão 2.0 (ZHENGDENG; YANG, 2005), ESLpred (BHASIN; GARG; RAGHAVA, 2005), CELLO (YU et al., 2006), *TargetP*

(EMANUELSSON et al., 2007), *ChlroP* (EMANUELSSON; NIELSEN; VON HEIJNE, 1999) e *NucPred* (BRAMEIER et al., 2007).

2.2.2 Material vegetal

Neste estudo foi utilizada uma variedade de feijoeiro tolerante ao déficit hídrico, o genótipo BAT477 que pertence ao pool gênico mesoamericano. Na análise de tolerância, foi verificado que sob seca este genótipo acelera a maturidade fisiológica, apresenta uma aumento na biomassa das raízes, redução da condutância estomática, do potencial hídrico da folha e da taxa de assimilação de CO_2 (ACOSTA-DIAZ et al., 2009). Este genótipo foi cultivado em casa-de-vegetação em condições normais de crescimento. Quando as plantas atingiram estádio de florescimento (aproximadamente 40 dias), as folhas jovens foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas no *ultrafreezer* (-80°C) até a maceração.

2.2.3 Desenho de primers para isolamento da Orf PvDREB6A

O desenho dos *primers* para o gene *PvDREB6A* foi feito de maneira a isolar a *Orf* com 1062 pb. O iniciador *forward* teve a sequência CACC adicionada a extremidade 5' para que pudesse ser feita a clonagem direcional no vetor pENTR/D-TOPO® (Life Technologies®), 5'-CACCATGGCAGCTATGATGG-3', enquanto que o iniciador *reverse* foi desenhado até o *stop* códon, 5'-TCACAGAGAATCCCAGTG-3'. Para isolar o *Orf* do gene *PvDREB6A* com o intuito de fazer a localização subcelular da proteína, houve uma diferenciação em relação ao primeiro par de primers, o iniciador *reverse* foi desenhado sem o *stop* códon (5'-CAGAGAATCCCAGTG-3') para que o fragmento resultante fosse fusionado à sequência do *Egfp*. Para isolar apenas o fragmento correspondente ao peptídeo trânsito da *Orf* do gene *PvDREB6A* (156 pb) um terceiro iniciador *reverse* (5'-AGTAGAAGGGAAAGAGGGAGTT-3') foi desenhado. A temperatura de dissociação (Tm) dos primers foi igual a 60°C, cada iniciador possuiu aproximadamente 20 pb e porcentagem de GC entre 50-60%. Após o desenho dos primers com a ajuda do programa *NetPrimer* (PREMIER BIOSOFT, 2014), o próximo passo foi verificar a probabilidade de formação de estruturas secundárias pela interação dos primers entre si utilizando-se o programa *Primer3plus*.

2.2.4 Extração de RNA total e Síntese de cDNA

A extração do RNA total a partir das folhas de feijão foi conduzida utilizando o reagente $Trizol^{(0)}$ (Life Technologies⁽⁰⁾) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA total e a concentração nas amostras foram determinadas por absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm, e a integridade foi verificada em gel de agarose 1% corado com *GelRed*⁽⁸⁾. As amostras foram então tratadas com DNase I⁽⁸⁾ (Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante.

A síntese do cDNA por RT-PCR foi realizada utilizando 100 ng de RNA total e o kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis*[®] (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. O programa usado para a reação de síntese foi: 10 minutos a 25°C, 15 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. O produto foi usado diretamente na reação para amplificação do fragmento.

2.2.5 RT-PCR para isolamento da Orf PvDREB6A

A região codificadora do gene *PvDREB6A* de *P. vulgaris* foi amplificada por PCR em reações contendo Tampão 10X, MgCl₂ 50mM, 10 mM dNTPs, 5 μ M *primer forward* (5'-CACCATGGCAGCTATGATGG-3'), 5 μ M *primer reverse* (5'-TCACAGAGAATCCC AGTG-3'), 4 unidades da enzima *Taq Platinum DNA polimerase*[®] (Life Technologies[®]), 50 ng de cDNA (descrito em 2.2.4) e água DEPC 0,1% para completar um volume de 50 μ L. A PCR para a clonagem do gene *PvDREB6A* e do fragmento contendo o peptídeo trânsito visando o ensaio de localização subcelular foi realizada com outros primers *reverse*, 5'-CAGAGAATCCCAGTG-3' e 5'-AGTAGAAGGGAAAGAGG AGTT-3', respectivamente. As reações foram conduzidas em termociclador nas seguintes condições: 10 min a 95°C; 40 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a 60°C Ta (temperatura específica de anelamento para o par de primers) e 2 min a 72°C; 7 min a 72°C de extensão final.

A identificação dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel TBE de agarose 1% corado com *GelRed*[®] e visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos foram purificados com o uso do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*[®] (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.6 Clonagem de produtos no pENTR/D-TOPO[®] e transformação de células de *Escherichia coli* (*E.coli*)

Para a clonagem dos fragmentos isolados por amplificação, 5 ng dos respectivos produtos purificados foram adicionados a 1 µL de solução salina, 3 µL de água e 1 µL de vetor *kit pENTR/D-TOPO*[®] *Cloning* (Figura 1), e incubados a 22°C durante 5 min, seguindo as instruções do fabricante. Este *kit* permite a clonagem de produtos de reação de PCR no sistema GatewayTM onde a recombinação sítio-específica permite a clonagem do inserto na orientação correta.

Em seguida, 50 μ L de células competentes de *E.coli DH5a* foram transformadas por choque térmico com 1 μ L dos produtos de ligação ao pENTR/D-TOPO[®] de acordo com o seguinte protocolo: 30 minutos de incubação no gelo do DNA plasmidial com as células bacterianas, 45 segundos em banho-maria a 42°C e 2 minutos de incubação no gelo. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio de cultura LB sólido com 50 μ g/mL de canamicina e incubadas a 37°C por 16 horas.

De três a cinco colônias de células que cresceram em meio de cultura seletivo, foram selecionadas para extração de DNA plasmidial utilizando-se o kit *GeneJETTM plasmid MiniPrep* (Thermo Scientific) segundo as informações do fabricante. Para a checagem do inserto por PCR, utilizou-se os respectivos primers dos insertos citados em 2.2.3. Logo após, a identificação dos produtos das reações de PCR, foi feita por eletroforese em gel TBE de agarose 1% corado com *GelRed*[®] e visualizado sob luz ultravioleta. O produto específico de 1062 pb correspondendo à *Orf* completa do *PvDREB6A* foi purificado com o uso do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*[®] (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante, assim como os outros dois produtos da *Orf* incompleta.



Figura 1 - Mapa do vetor pENTR/D-TOPO[®] (Life Technologies[®]) mostrando as regiões de recombinação attL1 e attL2

2.2.7 Construção dos vetores de transformação

O gene *PvDREB6A* clonado no TOPOTM (com e sem o *stop* códon ou peptídeo trânsito conforme descrito em 2.2.6) foi usado para reação de recombinação sítio-específica no sistema GatewayTM, que permite a subclonagem do inserto na orientação correta (CACC extremidade 5'). Vários vetores de destino são compatíveis para este sistema relativamente simples de construção de vetores para transformação.

Para a construção do vetor para análise da expressão heteróloga da proteína *PvDREB6A*, o fragmento com a *Orf* completa foi clonado no TOPOTM e posteriormente subclonado no vetor pDESTTM17 (Figura 2A) do sistema GatewayTM, um vetor específico para expressão de proteínas heterólogas, e logo em seguida, foi feita a transformação de *E.coli* DH5 α termocompetente conforme descrito em 2.2.6. Para a reação de recombinação, 150 ng de DNA plasmidial do vetor de entrada (pENTR/D-TOPO[®]), 150 ng de vetor de destino pDESTTM17, 6 µL de tampão TE pH 8,0 e 2 µL da enzima *LR Clonase* II[®] (Life Technologies[®]) foram utilizados. As reações foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente e os produtos da recombinação foram imediatamente usados para transformação de células competentes de *E.coli* DH5 α por choque térmico como descrito em 2.2.6. Essa construção foi nomeada pFEC4.1 (*35S::PvDREB6A*).

O vetor de destino utilizado para a reação de recombinação com o objetivo de construir os vetores de transformação para localização subcelular foi o pK7FWG2 (Figura 2B), que permite uma inserção flanqueada pelo promotor CaMv35S do vírus do mosaico da

couve-flor e o do gene *Egfp* (repórter), com *NptII* como gene marcador seletivo que confere resistência a canamicina (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002). A reação de recombinação foi conduzida conforme descrito acima e seus produtos foram imediatamente usados para transformação de células competentes de *E. coli* DH5α por choque-térmico. As construções para a localização subcelular foram nomeadas: pFEC3.1 (*35S::PvDREB6A-GFP*) e pFEC3.2 (*35S::Peptídeo trânsito-GFP*). As sequencias foram fusionadas ao gene *Egfp* que codifica para a *Green Fluorescente Protein* (GFP) fazendo com que, dessa maneira, a proteína PvDREB6A pudesse ser localizada.



Figura 2 - A) Vetor pDEST^{$^{\text{TM}}$}17 (Life Technologies[®]) de destino utilizado para expressão heteróloga, que possibilita fusão N-terminal a uma cauda de histidina para recuperação da proteína recombinante. B) Vetor pK7FWG2, que contém sítio de inserção flanqueado por promotor 35S e fusão ao *Egfp* e gene marcador de seleção de resistência a canamicina

2.2.8 Sequenciamento dos produtos clonados

Para sequenciamento do DNA plasmidial do vetor de entrada contendo cada um dos tipos de inserto (fragmento isolado com ou sem o *stop* códon e peptídeo trânsito), três clones de cada foram selecionados. A plataforma ABI PRISM 3100 *genetic analyzer*, que permite a análise das amostras por eletroforese capilar foi utilizada. Para a reação de sequenciamento foram usados: 2 μ L de *BigDye*[®] *terminator* v3.1, 1 μ L de *BigDye*[®] *terminator* v3.1 *5X Sequencing Buffer* (Life Technologies[®]), 1 μ L de iniciador M13 *forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') ou *reverse* (5'-CAGGAACAGCTATGAC-3') ambos a 5 μ M, de 100-150 ng do plasmídeo purificado contendo o inserto, completando com água

ultrapura até obter um volume final de 10 μ L. A reação foi colocada no termociclador a 96°C por 1 min, 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min. Após a reação foi necessária a precipitação com acetato de sódio/EDTA e lavagem com etanol. Um pouco antes de se levar as amostras ao sequenciador, as amostras foram precipitadas com Hi-DiTM *Formamide* (Life Technologies[©]).

Após o sequenciamento, com o auxílio das ferramentas da base de dados do *Ribossomal Database Project* (RDP), a trimagem das sequências para a remoção das regiões correspondentes ao vetor e também a sua qualidade foram determinadas. As sequências obtidas no sequenciamento, foram comparadas com sequencias depositadas no banco de dados público do NCBI usando a ferramenta *BLASTn* que permite a busca de sequencias de nucleotídeos pela análise de similaridade. Os resultados do sequenciamento também foram confrontados com a sequência da *Orf* do gene *PvDREB6A* pelo alinhamento das sequencias com o programa *Bioedit* v.7.3.1.0 (HALL, 1999).

Os mesmos procedimentos foram aplicados para o sequenciamento dos insertos contidos nos vetores de transformação (pFEC3.1, pFEC3.2 e pFEC4.1), com exceção dos primers utilizados (O mesmo *forward* 5´-CACCATGGCAGCTATGATGG-3´ para as três construções e para a construção pFEC3.1 o iniciador *reverse* 5´-TCACAGAGAATCCCAGTG-3´, para a construção pFEC3.2 o iniciador *reverse* 5´-AGTAGAAGGGAAAGAGGAGTT-3´ e para a construção pFEC4.1 o iniciador *reverse* 5´-CAGAGAATCCCAGTG-3´).

2.2.9 Ensaio para expressão heteróloga da proteína

Para a análise da expressão heteróloga da proteína PvDREB6A o *kit E.coli Expression* Systems with Gateway[®] (Life Technologies[®]) foi utilizado. O fragmento de 1062 pb subclonado do TOPO[®] para o pDEST^M17 (pFEC4.1 descrito em 2.2.7), que é um vetor específico para expressão heteróloga, permitiu a inserção do gene com o códon de início ATG posicionado depois do promotor T7 para expressão em procariotos. Este vetor insere um *tag* de seis histidinas na região N-terminal da proteína heteróloga recombinante, e isso foiessencial para a purificação da proteína e recuperação em coluna.

O vetor pFEC4.1 foi introduzido em células de *E.coli* BL21-AITM One Shot (Life Technologies[©]). Para isso, 10 ng de vetor foram adicionados a 50 μ L de células competentes

que foram transformadas por choque-térmico a 42°C por 45 s e imediatamente incubadas em gelo por 2 min. Em seguida, 250 μ L de meio SOC a temperatura ambiente foi adicionado e as células foram mantidas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após 1 hora de incubação, as células foram plaqueadas em meio LB sólido acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina e após 16 horas de incubaçãoa a 37°C os clones recombinantes putativos foram selecionados.

Os clones de BL21-AITM contendo o vetor pFEC4.1 selecionados em meio com ampicilina, foram usados para a indução da expressão heteróloga da proteína *PvDREB6A* recombinante com L-arabinose 0,2% seguindo as instruções do fabricante. A proteína foi purificada com o auxílio do kit ProBondTM *Purification System*[®], que consiste em um sistema de purificação para proteínas que tiveram um *tag* de seis histidinas adicionado a região Cterminal (proteínas recombinantes expressas em células de bactéria) e isso fez com que as proteínas pudessem ser recuperadas mais facilmente devido a alta afinidade da histidina à resina que contém níquel. A proteína foi quantificada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976).

2.2.10 Ensaio EMSA (Eletro Mobility Shift Assay)

Após a purificação da proteína PvDREB6A recombinante, procedeu-se o ensaio EMSA, com o objetivo de determinar a capacidade de ligação deste fator de transcrição à molécula de DNA. As sondas foram sintetizadas da seguinte forma: adicionou-se ao mix o Oligo sense (1 µL), o Oligo anti-sense (1 µL), 10x Anneling Buffer (5 µL), água (43 µL) conduzindo a reação em termociclador por 10 min a 70°C e 30 min a temperatura ambiente. Três tipos de sondas foram sintetizadas durante a reação, a DRE1 sense (5'-CCTGAACTTGGTACCGACAAAATACCCTGAACTTGGTACGCACAAAATACCC TGAACTTG-3') e anti-sense (3'-GTATTTTGTCGGTACCAAAGTTCAGGGTATTTT TGTCGGTACCAAGTTCAGGGTATTTTGTC-5'), a DRE2 sense (5'-AAGATCTT CATAGCCGACGTCACTTAAGATCTTCATAGCCGACGTCACTTGATCTTCA-3') e anti-sense (3'-AAGTGACGTCGGCTATGAAGATCTAAGTGACGTCG GCTATGAAGA TCTTAAGTGAGGTC-5') e a Rd29A sense (5'-AAAAGATATACTACCGACATGA GTTAAAAGATATACTACCGACATGAGTTAAAGATATA-3') e anti-sense (3'-ACTG ATGTCGGTAGTATATCTTTTAACTGA TGTCGGTATATCTTTTAATCATGTC-5').

Para ensaio de hibridização, foram necessários 1,4 pmol de sonda e 14 pmol de proteína, q.s.p água Mili-Q[®] para um volume final de 10 μ L; esse mix foi incubado por 30 min em gelo, em seguida, procedeu-se à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida SDS-PAGE não-desnaturante (2 mL de acrilamida 30%, 1 mL de tampão TAE 1X, 50 μ L de perssulfato de amônio 10%, 10 μ L de TEMED[®] e 6,94 mL de água Mili-Q[®]) nas seguintes condições: tampão de corrida TAE 1X, 100 V, 40 mA por 30 min. O gel foi corado com SYBR[®]Green 1:10.000 (v/v) por 20 min e visualizado em luz UV no transiluminador.

2.2.11 Transformação de Agrobacterium com os vetores pFEC3.1 e pFEC3.2 por eletroporação

Células de *Agrobacterium* da linhagem LBA4404 foram colocadas para crescer por 48 h em 5 mL de meio LB líquido acrescido de 300 µL/mL de estreptomicina e 50 µL/mL de rifampicina, com incubação a 28°C e 200 rpm. Após as 48 horas, os 5 mL de cultura foram inoculados em 45 mL de meio LB líquido acrescido de 300 µL/mL de estreptomicina e 50 µL/mL de rifampicina, com incubação a 28°C e 200 rpm. Quando a absorbância OD₆₀₀ da cultura ficou entre 0,6-0,9, as células foram centrifugadas a 4°C, 6000 rpm, por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de Hepes (1 mM, pH 7,0); em seguida, foi feita a centrifugação a 4°C, 6000 rpm, por 10 min. Descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de água estéril a 4°C, seguido de centrifugação a 4°C por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de Hepes/glicerol (1 mM, pH 7,0 + glicerol 10%), centrifugando-se a 4°C por 10 min.

Após o preparo das células, a mesmas foram transformadas por eletroporação. Alíquotas de 80 μ L dessa solução contendo a bactéria foram transferidas para tubos eppendorf[®] de 1,5 mL e 1 μ l do plasmídeo pFEC3.1 (100-150 ng/ μ L) foi adicionado e essa mistura, seguido por incubação em gelo por 2 min. Logo em seguida, essa mistura foi transferida para uma cubeta (0,1 cm de *gap*) de eletroporação e submetida ao pulso do eletroporador *BIO-RAD Gene Pulser*[®] *II*, nas seguintes condições: 25 μ F, resistor a 400 Ω e voltagem de 1,8 Kvolts. O mesmo procedimento foi feito para obter células de agrobacterium transformadas com o construção pFEC3.2 exceto pela adição de 1 μ L de plasmídeo purificado pFEC3.2 (100-150 ng/ μ L).

Imediatamente após a eletroporação, foram adicionados às células eletroporadas 500 μ L de meio SOC líquido e as células foram mantidas sob agitação a 90 rpm, por 1 h a 28°C para recuperação. Depois de 1 hora, a cultura foi plaqueada em meio LB sólido com 300 μ L/mL de estreptomicina, 50 μ L/mL de rifampicina e 50 μ L/mL de canamicina para seleção dos transformantes putativos. Após 16 horas algumas colônias cresceram e foram selecionadas para checagem do inserto por PCR nas condições descritas em 2.2.5.

Células de agrobacterium transformadas com o plasmídeo p19 foram cedidas pelo Prof. Dr^o. Márcio Castro Silva Filho do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

2.2.12 Localização subcelular da proteína PvDREB6A

Duas estratégias para transformação genética de plantas para a localização subcelular da proteína PvDREB6A foram adotadas, a transformação transiente e permanente. Para a transformação transiente, a sequência de nucleotídeos da região codificante do gene foi amplificada e clonada no vetor pK7FWG2 (descrito em 2.2.7) sem o stop códon, de forma que a proteína recombinante fosse produzida fusionada a proteína repórter GFP. Plantas de Nicotiana benthamiana com aproximadamente quatro semanas foram utilizadas para transformação transiente com o vetor pFEC3.1 por agroinfitração das folhas. Células de Agrobacterium transformadas com o vetor pFEC3.1 (descrito em 2.2.11) e com o plasmídeo p19 foram colocadas para crescer. A primeira em meio LB seletivo contendo 300 µL/mL de estreptomicina, 50 µL de rifampicina e 50µL de canamicina; a segunda em meio LB seletivo contendo 50 µL/mL de gentamicina e 50 µL/mL de canamicina, ambas nas mesmas condições: 28°C, 200 rpm, por 16 h. Após esse período, foi feita a centrifugação de 1 mL de cada cultura a 5.000 rpm por 5 min, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de tampão de ativação (10 mM de MgCL₂, 10 mM de MES e 200 µM de acetoseringona) onde permaneceram por 4 horas. Após esse período, as culturas foram diluídas até chegar à absorbância de 0,25 (OD₆₀₀); esse procedimento foi realizado separadamente para as duas culturas. No momento da agroinfiltração juntaram-se as duas culturas e com auxílio de uma seringa a solução foi injetada nas folhas de tabaco (Figura 3).

Três dias após a agroinfiltração, as folhas foram visualizadas em microscópio confocal da Olympus[®] (FV1000) e a fluorescência da GFP foi observada.

Para a transformação permanente, plantas de *Arabidopsis thaliana* foram cultivadas sob intensidade luminosa de 120 µmol. m²s, humidade de 60% e fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas escuro. Após 25 dias, as plantas atingiram estádio de florescimento e foram então transformadas pelo método *floral dip* (ZHANG et al., 2006) com algumas modificações; ao invés de imersão dos botões florais, os mesmos foram aspergidos com solução contendo *Agrobacterium* transformada com o plasmídeo pFEC3.1 ou pFEC3.2 (descrito em 2.2.11). Para isso, as células foram sub-cultivadas em meio LB seletivo contendo 300 µL/mL de estreptomicina, 50 µL/mL de rifampicina e 50 µL/mL de canamicina, a 28°C, até que se atingisse um volume de 50 mL de cultura com absorbância de 0,7-0,8 (OD₆₀₀), que posteriormente foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min. O *pellet* foi ressuspendido em 50 mL de solução para transformação que foi constituída basicamente de: sacarose 5%, MgCl₂ 250 mM e Silweet[®] 0,02%. Sete dias após a transformação, as plantas foram re-transformadas seguindo o mesmo procedimento.

Sementes de plantas de arabidopsis da primeira geração (T1) foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1,25% por 10 min, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada (121°C por 20min). As sementes foram mantidas a 4°C por 48 h e em seguida, foram colocadas em 50 μ L de solução de agarose 0,1% plaqueadas em meio ½MS, pH 5,8 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 50 μ g/mL de canamicina e solidificado com Agar[®] 5,5 g/L. As condições de crescimento das plantas foram: intensidade luminosa 120 μ mol. m²s, 22°C ± 2°C, 70% de humidade e fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas escuro. Plantas que cresceram em meio seletivo foram visualizadas em microscópio confocal da Olympus[®] (FV1000) e a fluorescência da GFP foi observada.



Figura 3 - Procedimento para a transformação transiente de folhas de tabaco por agroinfiltração

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação, nomenclatura e análises in silico do gene PvDREB6A

Estudos *in sílico* são importantes para a caraterização molecular de um determinado gene, e permitem uma análise detalhada de sua estrutura, função e localização, nos dizendo muito sobre sua provável contribuição nos diversos processos fisiológicos da planta. A família de genes *DREB* pertence a uma superfamília de genes que possuem um único domínio conservado AP2. O isolamento e a identificação de genes *DREB* dos seis sub-grupos (A1-A6) foram descritos em diversas espécies de plantas (WANG; HE, 2007; ZHAO et al., 2007; CHEN et al., 2009; YANG et al., 2009; BOUAZIZ et al., 2012). Em um trabalho desenvolvido por Caldas e Tsai (2011), quatro *Orfs* de genes *DREB* foram identificadas e clonadas de uma variedade de feijoeiro tolerante ao déficit hídrico BAT477 (ACOSTA-DÍAZ et al., 2009) e uma análise de estrutura e expressão dos mesmos foi realizada. Através de análises filogenéticas estes genes foram nomeados de acordo com o subgrupo de genes *DREB* ao qual pertencem (A1-A6), sendo assim, *PvDREB2C*, *PvDREB5A*, *PvDREB5B* e *PvDREB6A*.

Em feijoeiro comum, foi identificado um total de 54 genes *DREB* distribuídos nos seis sub-grupos (KONZEN et al., 2013). A pesquisa *in sílico* realizada nesta dissertação utilizando o banco de dados público do NCBI e do *Phytozome*, possibilitou a identificação da sequência Phvul.009G029600.1|PACid:27146455, que depois de análises filogenéticas foi denominada *PvDREB6A* por pertencer ao subgrupo A6 de genes *DREB* em feijoeiro conforme demostrado na (Figura 4A). O cDNA da sequência completa do gene *PvDREB6A* codifica um polipeptídeo de 354 aminoácidos, que se dobram em uma estrutura com três β -folhas e uma α hélice, correspondendo a um peso molecular de aproximadamente 40 KiloDaltons (Figura 4B).



Figura 4 - A) Agrupamento de genes *DREB* de feijoeiro e alguns genes representantes de *Glycine max* e *Arabidosis thaliana* em seus subgrupos A1-A6 (Adaptado de Konzen et al., 2013). B) Sequência de aminoácidos e estrutura secundária da proteína PvDREB6A

Sequências de genes ortólogos ao *PvDREB6A* que também pertencem ao subgrupo A6 de genes *DREB* identificados em soja (*Glycine max*), *Arabidopsis thaliana*, *Mendicago truncatula*, e arroz (*Oryza sativa*) obtidas do banco de dados público do *Phytozome*, foram usadas para construção da árvore filogenética e para a predição de motivos. Em relação à distância evolutiva entre os genes ortólogos nas cinco espécies, a espécie mais próxima do feijão foi *Mendicago*, e em seguida a soja, as três espécies pertenceram ao mesmo grupo com o mesmo ancestral comum. Arabidopsis e arroz estão mais distantes do feijão, e ficaram em um grupo separado do gene *PvDREB6A* (Figura 5A). A predição dos motivos revelou a posição do domínio AP2 nas diferentes espécies e no total foram identificados treze motivos conservados em quatro espécies comparadas (Figura 5B-C).



С



Figura 5 - A) Construção da árvore filogenética pelo programa MEGA 6.0, sequências ortólogas ao *PvDREB6A* de feijão em soja, *Mendicago*, *Arabidopsis* e arroz. B) Predição de motivos conservados pelo programa MEME v.4.9.1. C) Composição de aminoácidos do domínio AP2 do gene *PvDREB6A* MEME v.4.9.1

Fatores de transcrição são proteínas capazes de interagir com a molécula de DNA e estão diretamente envolvidos com a regulação da expressão gênica. Por essa função específica, a maioria dos trabalhos publicados demostram que eles estão localizados principalmente no núcleo da célula, onde está a maior parte o material genético que deverá ser regulado (FUJITA et al., 2005; YOSHIDA et al., 2010; HUANG et al., 2012; KIM et al., 2012). Na predição da localização subcelular da proteína PvDREB6A, dos sete tipos de ferramentas usadas, em quatro (Wolf PSORT, *Subnuclear Compartiments*, ESLPred e CELLO) a localização foi nuclear, em duas (TargetP e ChlroP) foi cloroplastidial e em uma delas (NucPred) a localização foi não-nuclear (Tabela 1). Essa diferença em relação à predição pode ser devido aos métodos diferentes de análise da estrutura da proteína, cada ferramenta em particular analisa a sequência de uma determinada maneira, levando em consideração a presença de sinal de localização nuclear (NLS), a composição de aminoácidos, análise dos motivos funcionais e se há o peptídeo trânsito para o cloroplasto e seus

respectivos sítios de clivagem (BHASIN; GARG; RAGHAVA, 2005; ZHENGDENG; YANG, 2005; BRAMEIER et al., 2007; EMANUELSSON et al., 2007; HORTON et al., 2007). De acordo com a predição de localização usando as ferramentas *TargetP* e *ChloroP*, a proteína PvDREB6A possui localização cloroplastidial, com um peptídeo trânsito de 156 pb na porção N-terminal e um sítio de clivagem na posição 52 do aminoácido. Outra explicação para essa diferença na predição da localização seria a evidência da dupla localização que alguns fatores de transcrição apresentam, sendo assim, podem participar da regulação da expressão gênica tanto no núcleo como nos plastídios (CARRIE et al., 2009).

Ferramenta de Predição Localização Wolf PSORT Núcleo Núcleo Subnuclear compartiments ESLpred Núcleo CELLO Núcleo **NucPred** Não-Nuclear Target-P Cloroplasto Chloro-P Cloroplasto

Tabela 1 - Predição da localização subcelular da proteína PvDREB6A utilizando diferentes ferramentas de bioinformática

2.3.2 Isolamento e clonagem da Orf PvDREB6A no vetor pENTER/D-TOPO®

O isolamento da sequencia codificadora da proteína PvDREB6A foi realizado à partir de RNA total obtido de plantas descritas no item 2.2.2, cuja integridade foi confirmada pela visualização das amostras em gel de Agarose[®] 1,5% (Figura 6), sendo que em nenhuma delas houve degradação. A concentração e a qualidade foram determinadas em nanodrop pela leitura da absorbância A_{260}/A_{280} . Em todas as amostras essa relação ficou entre 1,8 e 2,0.



Figura 6 - Eletroforese de amostras de RNA total extraídos de folha de feijoeiro da variedade BAT477

As amostras de RNA tratadas com DNAseI foram usadas na síntese da molécula de cDNA conforme descrito em 2.2.4. A molécula de cDNA foi então utilizada como molde, e a amplificação pela reação de PCR (condições especificadas em 2.2.5) com os primers específicos (descrito em 2.2.3) possibilitou o isolamento da *Orf* completa do gene *PvDREB6A* com 1062 pb (com *stop* códon), da *Orf* sem o *stop* códon com 1059 pb (para a localização subcelular) e o isolamento da região do peptídeo trânsito com 156 pb, respectivamente (Figura 7A-C).



Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose *low melting* 1,0%. A) Bandas referentes ao isolamento da *Orf* completa do gene *PvDREB6A*. B) Bandas referentes ao isolamento da *Orf* sem *stop* códon do gene *PvDREB6A*. C) Bandas referentes ao isolamento da região codificadora do peptídeo trânsito do gene *PvDREB6A*. Primeira coluna: *Low Mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen[©]), segunda coluna: controle negativo (exceto em C); demais colunas: clones crescidos em meio seletivo

Para cada uma das três sequências isoladas, três clones que cresceram em meio seletivo foram selecionados e por PCR foi confirmada a presença do inserto (Figura 8A-C), sendo os mesmos sequenciados (descrito em 2.2.8) para verificar da identidade da sequência. Por meio da comparação dos dados obtidos pelo sequenciamento com sequências depositadas no banco de dados públicos (NCBI e *Phytozome*), e também do seu alinhamento com a sequência da *Orf* do gene *PvDREB6A*, foi confirmada a clonagem correta das sequências, tanto em sua composição quanto na direção da clonagem.

O próximo passo foi o desenvolvimento dos vetores de transformação pFEC3.1, pFEC3.2 e pFEC4.1 (descrito em 2.2.7) por meio da recombinação de regiões homólogas nos plasmídios pelo sistema GatewayTM. Nesse sistema, o fragmento de DNA flanqueando os sítios de recombinação (*att*) pode ser transferido para vetores que contém sítios de recombinação que são compatíveis (*att*B x *att*P ou *att*L x *att*R) em uma reação mediada pela LR clonasse II[®], onde o gene clonado no vetor de entrada pode ser transferido para um vetor de destino (KARIMI, 2002). Três clones de cada construção, pFEC3.1, pFEC3.2 e pFEC4.1 foram sequenciados (descrito em 2.2.8) e em todos eles a sequência foi clonada corretamente.



Figura 8 - Eletroforese de produtos de PCR para a confirmação dos insertos clonados no TOPO[®]. A) PCR de três clones contendo a *Orf* completa. B) PCR de três clones contendo a *Orf* sem *stop* códon. C) PCR de três clones contendo a região codificadora do peptídeo trânsito do gene *PvDREB6A*. Primeira coluna *Low Mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen[®]), segunda coluna o controle negativo, demais colunas os clones selecionados em meio seletivo

2.3.3 Transformação e indução da expressão da proteína PvDREB6A em E.coli

A recombinação de regiões homólogas de DNA é uma tecnologia que permite a construção de plasmídeos com o gene de interesse que se deseja expressar. Essas construções geralmente possuem uma região promotora (que está localizada *upstream* do gene) que é responsável pelo controle de como, onde e quando o gene será expresso. O ensaio da expressão heteróloga da proteína PvDREB6A foi realizado utilizando o *kit E.coli Expression System with Gateway*[®] *Technology* (Invitrogen[®]) e a expressão do gene *PvDREB6A* foi induzida sob o controle do promotor araBAD quando adicionou-se L-arabinose ao meio de cultura.

O gene *PvDREB6A* foi clonado no vetor pENTER/D-TOPO[®], subclonado no vetor de destino pDESTTM17 e usado na transformação de *E.coli* DH5 α . Três clones que cresceram em meio seletivo foram selecionados e a confirmação da presença do gene foi feita por PCR com o par de primers específicos para a amplificação da *Orf* do gene *PvDREB6A*. Nos três clones

houve a amplificação do fragmento de 1062 pb com os primers específicos (Figura 9). Os três clones foram multiplicados e o plasmídeo foi purificado e sequenciado conforme descrito em 2.2.8. O sequenciamento do vetor recombinante pFEC4.1 confirmou a composição e integridade do fragmento inserido. Após verificar a construção, células de *E.coli* BL21-AITM *One shot* provenientes do kit de expressão foram transformadas. Três clones que cresceram em meio seletivo foram usados no ensaio de expressão heteróloga da proteína (descrito em 2.2.9).



Figura 9 - Eletroforese dos produtos da PCR para confirmação do inserto *PvDRE6A* em células *E.coli* BL21-AITM transformadas com o plasmídeo pFEC4.1. Primeira coluna: *Low Mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen[®]); segunda coluna: controle negativo; demais colunas: clones selecionados em meio seletivo

A indução da expressão da proteína heteróloga recombinante PvDREB6A em células de *E.coli* ocorreu devido a adição de L-arabinose ao meio de cultura durante a fase logarítmica de crescimento da bactéria e a proteína produzida pela bactéria foi secretada para o ambiente extracelular.

2.3.4 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA é um método clássico usado na detecção de proteínas que possuem a capacidade de se ligar a molécula de DNA, geralmente fatores de transcrição, que formam um complexo DNA-Proteína, migram mais devagar no gel de poliacrilamida em relação à molécula de DNA livre. Esse método é baseado na observação da mobilidade eletroforética do complexo formado pela proteína - ácido nucleico (FRIED; CROTHERS, 1981). O ensaio EMSA foi conduzido de acordo com a descrição em 2.2.10. As sondas foram sintetizadas com base na sequência conservada do elemento regulatório de ação *cis*, DRE (*Dehydration Responsive Element*) que tem nove pb (5'- TACCGACAT-3') e está envolvido na via
regulatória ABA-independente. Fatores de transcrição DREB, são capazes de se ligar a DRE para ativar a expressão de genes da via de sinalização a estresses (YAMAGUSHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1993). O ensaio EMSA revelou que os elementos DRE1, DRE2 e Rd29A podem interagir com a proteína PvDREB6A, retardando a mobilidade do complexo formado (Figura 10). Estes resultados sugerem que a proteína PvDREB6A foi capaz de se ligar especificamente ao elemento DRE contendo a sequência -CCGAC- *in vitro*.



Figura 10 - *Electro Mobility Shift Assay* (EMSA). Capacidade de interação da proteína PvDREB6A com as sondas DRE1, DRE2 e Rd29A

2.3.5 Localização subcelular da proteína DREB6A

O gene *PvDREB6A* possui um único domínio AP2 e pertence a subfamília DREB de proteínas AP2 (SAKUMA et al., 2002). Através de ferramentas de predição, o NLS foi deduzido e localizado na região N-terminal do domínio AP2 de ligação ao DNA na proteína PvDREB6A. Além disso, nesta sequência foi encontrado um peptídeo trânsito para o cloroplasto (156 pb) com um sítio de clivagem na posição do aminoácido 52. Para verificar a localização subcelular da proteína PvDREB6A, a região C-terminal codificadora do gene foi fusionado a região N-terminal da GFP e, esse gene fusionado foi expresso pelo controle do promotor CaMV 35S (vírus do mosaico da couve-flor). Células de tabaco foram transformadas transientemente com a construção *35S::PvDREB6A-GFP* por *Agrobacterium* pelo método agroinfiltração (descrito em 2.2.11). A fluorescência da GFP foi evidente no núcleo de células transformadas com *35S::PvDREB6A::GFP* (Figura 11), indicando que



Figura 11 - Localização nuclear da proteína *35S::PvDREB6A::GFP*. Expressão transiente em células de tabaco transformadas por agroinfiltração. Barra = 50µM

Plastídios são organelas que possuem DNA próprio e também podem ser alvos em potencial para regulação por fatores de transcrição. Proteínas com duplo direcionamento são comumente encontradas em plantas e algumas destas são fatores de transcrição que

encontrados no núcleo da célula.

participam de processos regulatórios na célula, como por exemplo, regulando genes da via fotossintética durante situações de estresse. Para determinar de forma definitiva se a localização da proteína PvDREB6A era nuclear ou cloroplastidial, a transformação permanente de plantas de *Arabidopsis thaliana* com a construção pFEC3.1 e com a pFEC3.2 por *Agrobacterium* pelo método *floral dip* modificado foi realizada (descrito em 2.2.11). Após 15 dias, plantas que cresceram no meio seletivo e que já possuíam o segundo par de folhas foram selecionadas e analisadas.

A fluorescência da GFP foi visualizada no núcleo de plantas transformadas com *355::PvDREB6A::GFP* indicando que PvDREB6A foi localizado no núcleo, assim como foi observado no experimento de transformação transiente da proteína fusionada a GFP em células de tabaco (Figura 11). Em relação à transformação de plantas com o peptídeo trânsito, não foi possível detectar a expressão de GFP. Em teoria, uma sequência de nucleotídeos após ser traduzida, possui toda a informação necessária para o dobramento da proteína em sua estrutura terciária ou quaternária quando se tornará funcionalmente ativa (LEWIN, 2009). Como apenas uma parte da proteína foi clonada, pode ser que no momento da tradução a proteína não conseguiu se tornar funcionalmente ativa sendo assim, não foi possível visualizá-la.

2.4 Conclusões

A caracterização molecular de um determinado gene é uma ferramenta importante para o entendimento dos prováveis processos fisiológicos (crescimento, desenvolvimento, respostas a estresses, etc.) com os quais ele pode estar envolvido. O gene *PvDREB6A* é um fator de transcrição que pertence a família AP2 e a subfamília A6 de genes *DREB* em feijoeiro. A proteína resultante de sua expressão pode se ligar a elementos regulatórios do tipo DRE. A transformação transiente em células de tabaco e permanente de plantas de arabidopsis foi essencial para determinar a localização nuclear da proteína PvDREB6A que apresenta 354 aminoácidos.

Essa caraterização inicial do gene *PvDREB6A* revelou não somente que ele é um fator de transcrição com provável envolvimento na resposta a adaptação a estresses abióticos, mas também que ele é um potencial alvo para a realização de estudos funcionais.

Referências

ACOSTA-DÍAZ, E.; ACOSTA-GALLEGOS, A. J.; TREJO-LOPEZ, C.; PADILLA-RAMÍREZ, J. S.; AMADOR-RAMÍREZ, M. D. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress*características de adaptación en variedades de frijol bajo sequía. Agricultura Técnica en México, Cidade del Mexico, v. 35, p. 416-425, 2009.

BHASIN, M.; GARG, A.; RAGHAVA, G. P. PSLpred: prediction of subcellular localization of bacterial proteins. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2522–2524, 2005.

BOUAZIZ, D.; PIRRELLO, J.; AMOR, H. B.; HAMMAMI, A.; CHARFEDDINE, M.; DHIEB, A.; BOUZAYEN, M.; GARGOURI-BOUZID, R. Ectopic expression of dehydration responsive element binding proteins (StDREB2) confers higher tolerance to salt stress in potato. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 60, p. 98-108, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMEIER, M.; KRINGS, A.; MACCALLUM, R. M. NucPred—Predicting nuclear localization of proteins. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 1159-1160, 2007.

CALDAS, D. G. G.; TSAI, S. M. Sequence and gene expression comparison among four new DREBs cloned from *Phaseolus vulgaris*. In: KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELL BIOLOGY, 2011, Keystone, CO. **Proceedings...** Keystone, 2011.

CARRIE, C.; KUHN, K.; MURCHA, M. W.; DUNCAN, O.; SMALL, I. D.; O'TOOLE, N.; WHELAN, J. Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*. **The Plant** Journal, Oxford, v. 57, p. 1128–1139, 2009.

CHEN, M.; XU, Z.; XIA, L.; LI, L.; CHENG, X.; DONG, J.; WANG, Q.; MA, Y. Coldinduced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean (Glycine max L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 121–135, 2009.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 953–971, 2007.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. **Protein Science**, New York, v. 8, p. 978-984, 1999.

FRIED, M. G.; CROTHERS, D. M. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 9, p. 6505–6525, 1981.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling that

enhances drought stress tolerance in arabidopsis. The Plant Cell, Baltimore, v. 17, p. 3470-3488, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HORTON, P.; PARK, K.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER C.J.; NAKAI, K. WoLF PSORT: protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. W585-587, 2007. doi: 10.1093/nar/gkm259.

HUANG, J.; SUN, S.; XU, D.; LAN, H.; SUN, H.; WANG, Z.; BAO, Y.; WANG, J.; TANG, H.; ZHANG, H.A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (Oryza sativa L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 80, p. 337–350, 2012.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 193–195, 2002.

KIM, J.; MIZOI, J.; KIDOKORO, S.; MARUYAMA, K.; NAKAJIMA, J.; NAKASHIMA, K.; MITSUDA, N.; TAKIGUCHI, Y.; OHME-TAKAGI, M.; KONDOU, Y.; YOSHIZUMI, T.; MATSUI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis Growth-Regulating Factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid– and osmotic stress–responsive genes, including DREB2A. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 24, p. 3393–3405, 2012.

KONZEN, E. R.; RECCHIA, G. H.; CASSIERI, F.; CALDAS, D. G. G.; BERNY, J. C.; PALKOVIC, A.; GEPTS, P.; TSAI, S. M. *DREB* genes as candidates for improving drought tolerance in common bean. In: BIENNIAL MEETING OF THE BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE, 2013, Portland, Oregon. Abstracts... Portland, Oregon: Michigan State University, 2013.

LEWIN, B. Genes IX. Tradução de Andréa Queiroz Maranhão. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 912 p.

LIU, L.; WHITE, M. J.; MACRAE T. H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 262, p. 247-257, 1999.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American, New York, p. 56-65, Apr. 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, K. F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJEE. Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation. Dordrecht: Springer, 2010.

PREMIER BIOSOFT. **NetPrimer**. Palo Alto, 2014. Disponível em: http://www.premierbiosoft.com/netprimer/ Acesso em: 10. fev. 2014.

ROYCHOUDHURY, A.; PAUL, S.; BASU, S. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscísico acid-independent pathways during abiotic stress. **Plant Cell Reports,** New York, v. 32, p. 985–1006, 2013.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREB's, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 290, p. 998–1009, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 327-334, 1997.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THEMEMESUITE.Motif-BasedAnalysisTools.Brisbane,<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi/> Acesso em: 28 jan. 14.

WANG, Y.-M.; HE, C.-F. Isolation and characterization of a cold induced DREB gene from *Aloe vera* L. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 25, p. 121–132, 2007.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration-stress in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 238, p. 17–25, 1993.

YANG, Y.; WU, J.; ZHU, K.; LIU, L.; CHEN, F.; YU, D. Identification and characterization of two chrysanthemum (Dendronthema x moriforlium) DREB genes, belonging to the AP2/EREBP family. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 36, p. 71–81, 2009.

YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; SAYAMA, H.; KIDOKORO, S.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 672–685, 2010.

YU, C. S; CHEN, Y.; C., LU, C. H.; HWANG, J. K. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins**, New York, v. 64, p. 643–651, 2006.

ZHANG, X.; HENRIQUES, R.; SHIH-SHUN, L.; QI-WEN, N.; NAM-HAI, C. Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. **Nature Protocols**, London, v. 1, p. 641-646, 2006.

ZHAO, J.; REN, W.; ZHI, D.; WANG, L.; XIA, G. Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 1521–1528, 2007.

ZHENGDENG, L.; YANG, D. An SVM-based system for predicting protein subnuclear localizations. **BioMed Central Bioinformatics**, London, v. 6, p. 1-8, 2005.

3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *PvDREB6A* DE FEIJOEIRO POR MEIO DA SUPEREXPRESSÃO EM Arabidopsis thaliana

Resumo

Estresses abióticos como seca, alta salinidade e baixas temperaturas, afetam o crescimento e a produtividade em culturas de interesse comercial como o feijoeiro comum. Fatores de transcrição (TFs) são importantes reguladores na via de resposta a esses estresses. Proteínas DREB (Dehydration Responsive Element Binding) são TFs capazes de regular a expressão de genes da via de sinalização a estresses abióticos, e a superexpressão de genes DREB principalmente os do subgrupo A1 e A2 tem sido relacionada ao aumento da tolerância das plantas à seca, salinidade, calor e frio. Um gene DREB de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) pertencente ao subgrupo A6 denominado PvDREB6A, de acordo com análises filogenéticas, foi isolado, clonado e usado para o estudo de caracterização funcional. Um vetor para a superexpressão do gene PvDREB6A sob o controle do promotor CaMV 35S foi construído por recombinação de regiões homólogas pelo sistema GATEWAY[®] e usado para a transformação genética de plantas de Arabidopsis thaliana Columbia-0 e mutantes nocaute para o gene AtRAP2.4 (Salk_020767C) via Agrobacterium. Vinte e cinco transformantes putativos foram selecionados em meio com canamicina 50 µg/mL, e por PCR foi confirmada a presença do gene PvDREB6A. A transformação de plantas com o vetor vazio foi realizada e plantas que cresceram em meio seletivo foram submetidas a PCR e a presença da Egfp foi confirmada. Eventos de transformação na terceira geração (T3) superexpressando o gene PvDREB6A foram submetidos a análises do número de cópias pelo ensaio TaqMan[®] "Copy number variation", e de expressão gênica do gene PvDREB6A por RT-qPCR. Quatro eventos com cópia única e melhor expressão do gene PvDREB6A denominados Col-0/pFEC2.1 #1, Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, Salk_020767C/ pFEC2.1 #19.7 e Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7, foram selectionados. O evento Salk 020767C/pFEC2.1 #23.7 mostrou melhor expressão do gene PvDREB6A e foi visualizado sob luz UV para detecção da expressão da proteína "Green Fluorescent Proteín" (GFP). Ensaios com estas plantas sob déficit hídrico, alta salinidade e frio foram conduzidos e a taxa de sobrevivência após os estresses foi calculada. Plantas transgênicas superexpressando o gene PvDREB6A apresentaram maior tolerância a seca, a alta salinidade e ao frio. Parâmetros fisiológicos como a determinação da taxa de desidratação e o vazamento de eletrólitos confirmaram que as plantas transgênicas possuem maior tolerância que as selvagens quando submetidas a estresses abióticos.

Palavras-chave: *PvDREB6A*. Superexpressão. Mutante nocaute. Estresses abióticos. Tolerância.

Abstract

Abiotic stresses, such is drought, high salinity and low temperatures affect growth and productivity in crops of economic interest such as common bean. Transcription factors (TFs) are important regulators on the response pathway to these stresses. DREB (Dehydration Responsive Element Binding) proteins are TFs capable of regulating the genes expression of the signaling pathway to abiotic stresses, and the overexpression of *DREB* genes mainly from subgroup A1 and A2 have been related to increased plant tolerance to drought, salt, heat and cold. A DREB gene from common bean (Phaseolus vulgaris L.) which belongs to the subgroup A6 called of PvDREB6A according to phylogenetic analysis, was isolated, cloned, and used for functional characterization study. A vector for overexpression of PvDREB6A gene under the control of the CaMV35S promoter, was constructed by recombination of homologous regions by GATEWAY® system and used for genetic transformation of Arabidopsis thaliana Columbia-0 and knockout mutant plants for the gene AtRAP2.4 (Salk_020767C) via Agrobacterium. Twenty five putative transformants were selected on medium containing kanamycin 50 mg/mL and the presence of PvDREB6A gene was confirmed by PCR. The transformation of plants with empty vector was performed, and plants that grew in selective medium were subjected to PCR, and the presence of Egfp was confirmed. Third generation (T3) transformation events overexpressing PvDREB6A were submitted to a copy number analysis by a TaqMan[®] Copy Number Variation test, and gene expression of *PvDREB6A* was analyzed by RT-qPCR. Four single copy events with better expression of the PvDREB6A named Col-0/pFEC2.1 #1, Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, Salk_020767C/pFEC2.1 #19.7 and Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 were selected. The event Salk 020767C/pFEC2.1 #23.7 showed the best expression of PvDREB6A and was visualized under Ultraviolet (UV) light to detect the Green Fluorescent Protein (GFP) expression. Assays using these plants under water deficit, high salt and cold stress were conducted and the survival rate was calculated. Transgenic plants overexpressing the PvDREB6A exhibited higher tolerance to drought, high salinity and cold. Physiological parameters such as the water loss rate and electrolyte leakage confirmed that transgenic plants have more tolerance than their respective wild type when subjected to abiotic stresses.

Key-words: PvDREB6A, overexpression, knockout mutant, abiotic stress, tolerance.

3.1 Introdução

Condições ambientais desfavoráveis causadas por estresses abióticos como seca, alta salinidade, ou frio, afetam negativamente o crescimento e rendimento das culturas (CRAMER, 2010; SKIRYCZ; INZE, 2010). Para poder sobreviver, as plantas precisam responder e se adaptar aos estresses nos níveis molecular, fisiológico e bioquímico. Mecanismos de resposta e adaptação geralmente envolvem a ação de fatores de transcrição (TFs), que são importantes reguladores envolvidos em vias de resposta a estresses e, portanto, se tornaram alvos para a engenharia genética com a finalidade de obter plantas com maior tolerância a estresses (CENTURY et al., 2008). A superexpressão de fatores de transcrição que controlem uma grande variedade de genes em diferentes vias se tornou uma estratégia importante para alcançar tolerância a múltiplas condições de estresse em plantas (LATA; PRASAD, 2011).

Fatores de transcrição DREB pertencem à grande família AP2/ERF de TFs, e são capazes de se ligar a regiões promotoras de genes-alvo que contém o elemento regulatório de ação *cis* DRE (*Dehydration Responsive Element*). Proteínas DREB se ligam a DRE na região promotora de um determinado gene, em resposta ao estímulo gerado quando as plantas são submetidas à seca, baixa temperatura e alta salinidade, dessa forma, a expressão gênica de muitos genes envolvidos na resposta a desidratação e induzidos pelo frio serão reguladas através da via ABA-independente (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1993; IWASAKI et al., 1997). Liu et al. (1998), isolaram pela primeira vez o cDNA que codifica para proteínas DREB1A e DREB2A de *Arabidopsis*. Genes *DREB* homólogos têm sido caracterizados a partir de várias plantas economicamente importantes incluindo milho (*Zea mays*) (KIZIS; PAGES, 2002; QIN et al., 2004), arroz (*Oryza sativa*) (DUBOUZET et al., 2003; TIAN et al., 2005; MATSUKURA et al., 2008), soja (*Glycine max*) (LI et al., 2005; CHEN et al., 2007), e algodão (*Gossypium hirsutum*) (HUANG; LIU, 2006).

Neste sentido, alguns trabalhos têm demonstrado que a superexpressão de genes *DREB*, principalmente os do grupo A1 e A2, está relacionada ao aumento da tolerância à seca, sal e frio em algumas espécies de plantas como arroz, soja, Populus e batata transgênicas (CHEN et al., 2007; CUI et al., 2011; ZHOU et al., 2012; BOUAZIZ et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Feijão e soja transgênicos contendo o gene *AtDREB2A* de *Arabidopsis* estão sendo desenvolvidos pela Embrapa (Unidades Arroz e Feijão e Soja) com o objetivo de obter plantas

tolerantes a seca (POLIZEL et al., 2011; PAIVA et al., 2013). Vários trabalhos que envolvem a caracterização funcional de genes *DREB* têm sido descritos na literatura, no entanto, pouca informação existe a cerca da estrutura, função e caracterização destes genes em feijoeiro.

O feijão comum é a principal fonte de proteína vegetal consumida e em combinação com arroz, a cultura torna-se a refeição básica diária para todos os Brasileiros. O Brasil foi classificado, nas últimas décadas, como o maior produtor de feijão do mundo e também como o principal consumidor (YOKOYAMA; PEDRA, 2000). Dentre os fatores que afetam a produtividade do feijoeiro comum estão os estresses abióticos como déficit hídrico, baixa ou alta temperatura e estresse salino. Em diferentes espécies de plantas tem sido demonstrado que, de todos os estresses abióticos a seca é o maior fator que limita a produtividade da cultura globalmente (BRAY et al., 2000). Estima-se que cerca de 60% do feijão no mundo cresce sob condições de seca, causando perdas de rendimento de até 80% em algumas regiões (ACOSTA-GALLEGOS; KOHASASHI-SHIBATA, 1989; SINGH, 1995; BEAVER et al., 2003; MIKLAS et al., 2006).

Dentro deste contexto, a caracterização funcional de um gene *DREB* de feijoeiro que pertence ao subgrupo A6 de genes *DREB* foi desenvolvida através da superexpressão em *Arabidopsis*, e um estudo de genética reversa foi conduzido para entender qual é o efeito do ganho e da perda da função desse fator de transcrição para a planta e, se ele é capaz de conferir tolerância a estresses abióticos em plantas transgênicas. Vale ressaltar que *Arabidopsis* é o modelo de estudo que vem sendo utilizado para a caracterização funcional de genes em diversas espécies tanto monocotiledônea como dicotiledôneas (AGARWAL et al., 2006; CHEN et al., 2007; MATSUKURA et al., 2010; YING et al., 2012). Estudar a função do gene *PvDREB6A* de *Phaseolus vulgaris*, assim como aqueles regulados por eles, podem representar uma importante fonte de tolerância para as plantas que ainda não foi investigada.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Vetores

O sistema de clonagem utilizado neste estudo foi o GATEWAY. Para isto, foi utilizado o vetor de entrada TOPO[®] contendo o gene *PvDREB6A* (descrito no Cap. II) e o vetor de destino pK7GW2D (Figura 12), que permite a inserção do gene a ser estudado flanqueando a região do gene promotor *CaMV 35S*, com *NptII* como gene marcador seletivo que confere resistência a canamicina e o contém *Egfp* como gene repórter (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002).



Figura 12 - Vetor pK7GW2D, que contém um sítio de inserção flanqueado por promotor 35S, com o gene *Egfp* como repórter e o gene marcador de seleção conferindo resistência a canamicina

3.2.2 Material Vegetal

As sementes de *Arabidopsis thaliana* do genótipo Columbia-0 (Col-0) usadas nos experimentos, foram cedidas pelo Prof.º Dr. Daniel Scherer do Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

As sementes do mutante nocaute (Salk_020767C), que possui um T-DNA inserido no gene *RAP2.4* ortólogo ao gene *PvDREB6A* de feijoeiro, foram compradas do banco de germoplasma do *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR).

Para o cultivo das plantas, sementes de *Arabidopsis thaliana* de ambos os genótipos foram colocadas sobre papel filtro com 10 mL de água e foram deixadas a 4°C por 48 horas para a quebra de dormência. Após esse período, elas foram mantidas em sala de crescimento a $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ com intensidade luminosa de 120 µmol. m²s, umidade de 60% e fotoperíodo de 16 horas/luz e 8 horas/escuro sob substrato (Basaplant:vermiculita média, 1:1, v:v). Foram feitas irrigações com solução nutritiva e após o surgimento das primeiras flores, o broto principal foi removido para indução da proliferação dos brotos laterais. Após 45 dias as plantas atingiram estádio de florescimento para serem usadas na transformação.

3.2.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico das plantas, foi utilizado o reagente Plant DNAzolTM (Invitrogen[©]) segundo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA e a concentração nas amostras foram determinadas por absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm e apenas amostras com A_{260}/A_{280} entre 1,8-2,0 tiveram a integridade verificada em gel de agarose 1% corado com *GelRed*[®]. As amostras foram visualizadas em luz ultravioleta.

3.2.4 Desenho dos primers

O desenho dos *primers* para isolar, clonar, bem como, identificar eventos de transformação superexpressando o gene *PvDREB6A*, foi feito de maneira a amplificar a *Orf* com 1062 pb do gene *PvDREB6A*, conforme descrito no Capítulo II.

Para realizar as reações de PCR para confirmação da presença do T-DNA nas plantas mutantes, identificar os eventos transformados com o vetor vazio (pK7GW2D), assim como, reações de RT-qPCR para avaliar a expressão gênica do gene *PvDREB6A* nas plantas transgênicas, pares de primers foram desenhados (Tabela 2).

A temperatura de dissociação (Tm) dos primers ficou em torno de 60°C, cada iniciador possuiu aproximadamente 20 pb e porcentagem de GC entre 50-60%. Após o desenho dos primers com a ajuda do programa *NetPrimer* (PREMIER BIOSOFT, 2014), o próximo passo foi verificar a probabilidade de formação de estruturas secundárias pela interação dos primers entre si utilizando-se o programa *Primer3plus*.

Primers	Temperatura de anelamento (Ta)	Sequência 5'-3' (Forward/Reverse)	Amplicon (pb)
S020767C	61°C	GAACTCATGGACGCGCTTGTAC/	544
		CAAGCCAGAGACGAGTCCGA	
Lbb1.3	61°C	ATTTTGCCGATTTCGGAAC/-	-
Egfp	60°C	GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC/	236
		GCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCC	
M13	60°C	GTAAAACGACGGCCAG/	-
		CAGGAACAGCTATGAC	
PvDREB6A	60°C	TTCCTCAACCCCCTCTTTCT/	200
RT-qPCR		GGATAAGCCGTCGGAATACA	
Copy Number	60°C	GCCTTGAGCGAAGCCTATGATATTT/	261
Assay		CCGACGGCTTATCCCTATCCAA	
Copy Number	60°C	GCCTTGAGCGAAGCCTATGATATTT/	261
Reference		TGTATTCCGACGGCTTATCCCTATC	

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados neste estudo

3.2.5 PCR para confirmar a inserção do T-DNA nas plantas mutantes

Sementes de Arabidopsis do tipo selvagem e do mutante nocaute foram colocadas para crescer em condições favoráveis de desenvolvimento conforme especificado em 3.2.2. Após 30 dias, o material vegetal foi coletado e procedeu-se a extração de DNA de acordo com o descrito em 3.2.3.

O DNA genômico da planta do tipo selvagem (Col-0) e de 22 plantas mutantes foi usado como molde para a realização de reações de PCR individuais. Dois tipos de reações foram conduzidos: (1) PCR com *primers* que flanqueiam a região do T-DNA; (2) PCR com iniciador *forward* que se anela a região do T-DNA e o iniciador reverse que se anela na região

que flanqueia o T-DNA. Para confirmar se as plantas mutantes nocaute Salk_020767C são homozigotas, a região flanqueadora ao T-DNA foi amplificada por PCR em reações contendo 5 μ L de Tampão 10X, 2,5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1,5 μ L de dNTPs 10 mM, 2 μ L do iniciador S020767C forward e 2 μ L do iniciador S020767C reverse (Tabela 2) a 5 μ M, 0,4 μ L de Taq Platinum DNA polimerase® (Invitrogen[®]), 1 μ L (100 ng/ μ L) de DNA (descrito em 3.2.3) e água DEPC 0,1% para completar um volume de 50 μ L. Além de confirmar que o mutante é homozigoto, um iniciador forward Lbb1.3 que se anela na região do T-DNA e o iniciador S020767C reverse foram usados em outra reação para confirmar a presença do T-DNA nos mutantes nas mesmas condições descritas acima. As reações foram conduzidas em termociclador nas seguintes condições: 10 min a 95°C; 40 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 61°C Ta (temperatura específica de anelamento para o par de primers) e 2 min a 72°C; 7 min a 72°C de extensão final.

A verificação do produto da reação de PCR foi feita por eletroforese em gel TBE de agarose 1% corado com GelRed[®] e visualizado sobre luz ultravioleta (UV).

3.2.6 Construção do vetor de transformação para superexpressão do gene *PvDREB6A* pelo sistema GATEWAYTM

Por meio de uma reação de recombinação o gene *PvDREB6A* foi transferido para o vetor de destino em uma reação que consistiu de 150 ng de DNA plasmidial do vetor de entrada pENTR/D-TOPOTM/*PvDREBA* (descrito no Capítulo II), 150 ng de vetor de destino pK7GW2D, 6 μ L de tampão TE pH 8,0 e 2 μ L da enzima *LR Clonase* II[®] (Invitrogen[®]). As reações foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente e o produto da recombinação foi imediatamente usado para transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α por choquetérmico. Essa construção para a superexpressão do gene *PvDREB6A* foi nomeada pFEC2.1 (*35S::PvDREB6A::T35S*). Como controle, células de *E. coli* também foram transformadas com o vetor vazio.

Após a transformação de *E.coli*, três clones de cada tipo (vetor com e sem inserto) que cresceram em meio de seleção foram selecionados para a confirmação do inserto. Antes disso, os clones foram colocados para crescer em meio LB líquido com 50 µL/mL de canamicina por 16 horas a 37°C sob agitação de 220 rpm. A cultura foi então usada para a extração do DNA plasmidial.

Na sequência, a confirmação dos vetores com presença e ausência do gene *PvDREB6A* foi realizada por meio de uma reação de PCR seguida de sequenciamento. Para a PCR, foram utilizados os primers descritos no Capítulo II para isolamento do gene *PvDREB6A* e primers do gene *Egfp* (Tabela 2). A reação de PCR foi conduzida conforme descrito em 3.2.5, exceto pela utilização de 50 ng de DNA plasmidial da construção pFEC2.1 e de seu respectivo vetor vazio.

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel TBE de agarose 1% corado com $GelRed^{\mathbb{R}}$. As bandas foram visualizadas sob luz UV.

3.2.7 Sequenciamento dos clones

O sequenciamento do DNA dos três clones pFEC2.1 crescidos em meio seletivo, cujo inserto foi detectado por PCR, foi realizado utilizando a plataforma *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* que permite a análise das amostras por eletroforese capilar. Para a reação de sequenciamento foram: 2μ L de BigDye[®] terminator v3.1, 1μ L de BigDye[®] terminator v3.1 5X Sequencing Buffer, 1μ L de iniciador M13 forward ou M13 reverse (Tabela 2) ambos a 5 μ M, e 100 ng do plasmídeo purificado contendo o inserto, completando com água ultrapura até obter um volume final de 10 μ L, se necessário. A reação foi colocada no termociclador a 96°C por 1 min, 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min. Após a reação, foi necessária a precipitação com acetato de sódio/EDTA e lavagem com etanol. Um pouco antes de se levar as amostras ao sequenciador, as mesmas foram precipitadas com Hi-DiTM Formamida (Life Technologies[®]).

Após o sequenciamento, com o auxílio das ferramentas da base de dados do RDP, foi realizada a trimagem das sequências para a remoção das regiões correspondentes ao vetor e a qualidade foi verificada. As sequências obtidas foram comparadas com sequencias depositadas no banco de dados público do NCBI usando a ferramenta *BLASTn* que permite a busca de sequências de nucleotídeos pela análise de similaridade. Os resultados do sequenciamento também foram confrontados com a sequência da *Orf* do gene *PvDREB6A* pelo alinhamento das sequências com o programa *Bioedit* v.7.3.1.0 (HALL, 1999).

3.2.8 Transformação de Agrobacterium tumefaciens LBA4404 com a construção pFEC2.1

Células de *Agrobacterium* da linhagem LBA4404 foram colocadas para crescer por 48 h em 5 mL de meio LB líquido acrescido de 300 μ L/mL de estreptomicina e 50 μ L/mL de rifampicina, com incubação a 28°C e 200 rpm. Após, os 5 mL de cultura foram inoculados em 45 mL de meio LB líquido acrescido de 300 μ L/mL de estreptomicina e 50 μ L/mL de rifampicina, com incubação a 28°C e 200 rpm. Quando a absorbância ficou entre 0,6-0,9 OD₆₀₀, as células foram centrifugadas a 4°C, 6000 rpm, por 10 min. Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de Hepes (1 mM, pH 7,0), em seguida, foi feita a centrifugação a 4°C, 6000 rpm, por 10 min. Descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de água estéril a 4°C, seguido de centrifugação a 4°C por 10 min. Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuspendido em 30 mL de Hepes/glicerol (1 mM, pH 7,0 + glicerol 10%), centrifugou-se a 4°C por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 500 μ L de Hepes/glicerol (1 mM, pH 7,0 + glicerol 10%).

Após o preparo das células, a mesmas foram transformadas por eletroporação. Alíquotas de 80 µL dessa solução contendo a bactéria foram transferidas para tubos de 1,5 mL e 1µl do plasmídeo pFEC2.1 (100-150 ng/µL) foi adicionado e essa mistura foi incubada no gelo por 2 min. Logo em seguida, essa mistura foi transferida para a cubeta (0,1 cm de *gap*) de eletroporação e submetida ao pulso do eletroporador *BIO-RAD Gene Pulser*[®] *II*, nas seguintes condições: 25 µF, resistor a 400 Ω e voltagem de 1,8 Kvolts. Para o controle, 1µL do vetor vazio (pK7GW2D) foi adicionado as células de *Agrobacterium* competentes e procedeu-se a transformação por eletroporação conforme descrito acima.

Imediatamente após a eletroporação, foram adicionados às células eletroporadas 500 μ L de meio SOC líquido, sendo mantidas sob agitação a 90 rpm, por 1 h a 28°C para recuperação. Depois de 1 hora, a cultura foi plaqueada em meio LB sólido com 300 μ L/mL de estreptomicina, 50 μ L/mL de rifampicina e 50 μ L/mL de canamicina para seleção dos transformantes putativos. Após 16 horas, algumas colônias cresceram e foram selecionadas para checagem do inserto por PCR nas condições descritas em 3.2.5, exceto pela utilização do DNA plasmidial da construção e do controle.

3.2.9 Transformação genética de Arabidopsis thaliana pelo método floral dip

As sementes de Arabidopsis do tipo selvagem (Columbia-0) e da mutante nocaute (Salk_020767C) foram cultivadas conforme as condições descritas em 3.2.2. Após 45 dias, as plantas atingiram estádio de florescimento e foram então transformadas pelo método *floral dip* (ZHANG et al., 2006) com algumas modificações; ao invés de imersão dos botões florais, os mesmos foram aspergidos com solução contendo *Agrobacterium* transformada com o plasmídeo pFEC2.1 e, para o controle, *Agrobacterium* transformada com o vetor pK7GW2D vazio.

As células foram sub-cultivadas em meio LB seletivo contendo 300 μ L/mL de estreptomicina, 50 μ L/mL de rifampicina e 50 μ L/mL de canamicina, a 28°C, até que se atingisse um volume de 50 mL de cultura com absorbância de 0,7-0,8 OD₆₀₀, que posteriormente foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min. O *pellet* foi ressuspendido em 50 mL de solução para transformação que foi constituída basicamente de sacarose 5%, MgCl₂ 250 mM e Silweet® 0,02%. Sete dias após a transformação, as plantas foram retransformadas para aumentar a eficiência de transformação, seguindo o mesmo procedimento e cultivadas até o final do ciclo para recuperação de suas sementes.

As sementes obtidas das plantas de arabidopsis transgênicas putativas da primeira geração (T1) foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1,25% por 10 min, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada. As sementes foram mantidas a 4°C por 48 h e em seguida, foram colocadas em 50 µL de solução 0,1% de agarose e plaqueadas em meio ½ MS, pH 5,8 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 50 µg/mL de canamicina e solidificado com Agar[®] 5,5 g/L. As condições de crescimento das plantas foram: intensidade luminosa 120 µmol. m²s, 22°C±2°C, 60% de umidade e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro. Plantas que cresceram em meio seletivo foram transplantadas para o substrato (Basaplant:vermiculita média, 1:1, v:v) e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram feitas irrigações com solução nutritiva e após o surgimento das primeiras flores, o broto principal foi removido para indução da proliferação dos brotos laterais. As sementes coletadas no final do ciclo de vida da planta foram armazenadas em câmara fria a 4°C e consistiram da geração T2.

Esses procedimentos de esterilização das sementes, inoculação em meio seletivo ½ MS com 50 µg/mL de canamicina e transplante para o substrato foram repetidos até obter plantas na terceira geração (T3).

3.2.10 Caracterização molecular das plantas transgênicas

3.2.10.1 Extração de DNA genômico das plantas transgênicas e quantificação

A extração de DNA genômico de plantas transgênicas e a posterior quantificação foram realizadas conforme descrito em 3.2.3.

3.2.10.2 PCR do gene *PvDREB6A* e do gene *Egfp* em transformantes putativos das gerações T1, T2 e T3

O DNA genômico das plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene PvDREB6A tanto do tipo selvagem (Col-0/pFEC2.1) quanto do mutante nocaute (Salk_020767C/pFEC2.1) das gerações T1, T2 e T3 e seus respectivos controles Col-0/pK7GW2D e Salk_020767C/pK7GW2D, selecionadas previamente em meio ½ MS com 50 µg/mL de canamicina (descrito em 3.2.9), foi usado em reações de PCR para confirmar a presença do gene PvDREB6A e do gene Egfp (controle) nas plantas com resistência a canamicina. Os reagentes e procedimentos foram realizados de acordo com o descrito em 3.2.5, exceto pelo uso de DNA genômico das plantas transgênicas e pela temperatura de anelamento de 60°C, utilizando-se os primers específicos para o gene PvDREB6A (descrito no Capítulo II) e para Egfp (Tabela 2).

A verificação dos produtos da reação de PCR foi feita por eletroforese em gel TBE de agarose 1% corado com *GelRed*[®] e visualizados sob luz UV.

3.2.10.3 Ensaio Copy Number Variation (CNV)

Para se determinar o número de cópias do gene *PvDREB6A* inserido nas plantas transgênicas, um ensaio CNV foi conduzido. Em uma reação de qPCR, o ensaio TaqMan[®] *Copy Number* e o TaqMan[®] *Copy Number Reference* foram corridos simultaneamente em duplex. O gene alvo *PvDREB6A* foi usado para síntese do ensaio TaqMan[®] *Copy Number* e o gene AT4G03070.1 de *Arabidopsis thaliana* que possui cópia única no genoma foi usado para a síntese do ensaio TaqMan[®] *Copy Number* e o gene AT4G03070.1 de *Arabidopsis thaliana* que possui cópia única no genoma foi usado para a síntese do ensaio TaqMan[®] *Copy Number Reference*, ambos foram customizados pela empresa Applied Biosystems[©]. Os reagentes usados para este ensaio foram: (1) ensaio

TaqMan[®] *Copy Number*, que contém os dois primers *forward* e *reverse* (Tabela 2) com fluoróforo FAMTM ligado a sonda MGB para detectar a sequência alvo do DNA genômico; (2) ensaio TaqMan[®] *Copy Number Reference*, que contém os dois primers *forward* e *reverse* com fluoróforo VIC[®] ligado a sonda TAMRATM (Tabela 2) para detectar o DNA genômico de referência; (3) TaqMan[®] *Genotyping Master Mix*, que contém a DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] ultra-pura e os dNTPs necessários para a reação de PCR. As reações foram realizadas conforme as instruções do fabricante no equipamento *StepOnePlus*TM *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*[®]). As condições da reação foram: 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min com coleta de dados. Os dados liberados pelo *software* do equipamento foram analisados com auxílio do programa *CopyCaller[®] Software* versão 2.0 (*Applied Biosystems[®]*).

3.2.10.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi conduzida utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen[©]) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA total e a concentração nas amostras foram determinadas por absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm, e a integridade foi verificada em gel de agarose 1% corado com *GelRed*[®]. Um micrograma de RNA total de cada amostra foi então tratado com DNase I[®] (Fermentas[©]) segundo as instruções do fabricante.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis*[®] (Fermentas[®]) a partir de 100 ng de RNA total tratado com DNase, de acordo com as instruções do fabricante. O programa usado para a reação de síntese foi: 10 min a 25°C, 15 min a 50°C e 5 min a 85°C. O produto foi usado diretamente na reação para amplificação do fragmento.

3.2.10.5 Análise da expressão de genes de referência em plantas de *Arabidopsis thaliana* genótipo Columbia-0 sob estresse salino

Sementes de *Arabidopsis thaliana* do genótipo Columbia-0 foram colocadas para germinar conforme as condições descritas em 3.2.2. Após 20 dias de crescimento, as plantas foram submetidas ao estresse salino pela irrigação com solução de NaCl 250 mM, exceto o

controle. Após 24 horas, as amostras controle e tratada três de cada foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no *ultrafreezer* (-80°C) até a maceração. A extração do RNA total, a quantificação, qualidade e a síntese de cDNA das amostras foram realizadas conforme descrito em 3.2.10.4.

Os genes de referência *At4270*, *SAND*, *PDF2*, *F-BOX*, *EF1α* e *PPR* (Tabela 3) usados neste trabalho foram selecionados de acordo com Hong et al., 2010 e Lilly et al., 2011, porque apresentaram estabilidade de expressão em plantas submetidas a diferentes condições. Para a análise de estabilidade de expressão em condições de estresse, 1 µL do cDNA das amostras controle e tratada foi usado na reação de qPCR com o *kit SYBR*[®] *Green/ROX qPCR Master Mix* de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram conduzidas no equipamento StepOnePlusTM Real Time PCR System (Applied Biosystems[®]) em um volume final de 10 µL. As condições da reação foram 95°C por 10 min, 40 ciclos de: 95°C por 30 s, 72°C por 30 s/ coleta de dados. Para a curva de *melting* as condições foram: 95°C por 15 s, 62°C por 1 min e 95°C por 15 s/coleta de dados a cada 0,7°C de incremento.

Após a corrida, os dados liberados pelo *software* do equipamento os valores de eficiência para cada reação foram corrigidos no programa *LinReg* PCR (v.11.0). Após, os dados foram analisados com o auxílio do programa *Normfinder* (v.2.0) para estimar qual o melhor gene de referência, ou seja, aquele que possuiu o menor valor de variação quando se comparou a amostra controle com a tratada.

Transcrito	Identificação	Sequência 5'-3' (Forward/Reverse)	Amplicon (pb)
	no TAIR		
At4270	At4g34270	TCGTCGGAGGAGAAAAGGTA	242
		GCATTCTCGCCAAAAACCATT	
SAND	At2g28390	GTTGGGTCACACCAGATTTTG	127
		GCTCCTTGCAAGAACACTTCA	
PDF2	At1g13320	TCATTCCGATAGTCGACCAAG	104
		TTGATTTGCGAAATACCGAAC	
F-BOX	At5g15710	TGCAATCACAAGGGAAGATGG	263
		CATATTTCTGACATGTTTTGCTGG	
EF1α	At5g60390	CACCACTGGAGGTTTTGAGG	137
		TGGAGTATTTGGGGGGTGGT	
PPR	At1g62930	AGGGCACGCCTTAGAGATGG	215
		TGCAATCACAAGGGAAGATGG	

Tabela 3 – Sequências dos primers dos genes de referência utilizados para análise de estabilidade de expressão após 24 horas em estresse salino

3.2.10.6 Análise da expressão do gene PvDREB6A nas plantas transgênicas por RT-qPCR

Sementes transgênicas do mutante nocaute na geração T3 (20 eventos) foram usadas para quantificação relativa da expressão do gene *PvDREB6A*. Para a análise da expressão do gene *PvDREB6A* nas plantas transgênicas, as amostras de RNA total foram extraídos de plantas com 30dias, e o cDNA foi sintetizado conforme descrito em 3.2.10.4. A reação de RTqPCR foi realizada usando o *kit SYBR[®] Green/ROX qPCR Master Mix* de acordo com as instruções do fabricante e conduzidas no equipamento *StepONE Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems*©). Foram utilizados *primers* para amplificar um fragmento de 234 pb correspondente ao gene *PvDREB6A* (Tabela 2). Os *primers* foram desenhados evitando regiões homólogas com entre o gene *PvDREB6A* e o seu ortólogo o gene AtRAP2.4. As condições da reação foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s com coleta de dados. Para a curva de *melting* as condições foram: 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s com coleta de dados a cada incremento de 0,7°C.

Após a corrida, os dados foram liberados pelo *software* do equipamento e os valores de eficiência para cada reação foram corrigidos no programa *LinReg* PCR (v.11.0). Após esta correção, os dados foram analisados com o auxílio do programa *REST* 2009 (QIAGEN[©]) para estimar o valor da expressão relativa. A análise foi feita de forma a comparar amostra com menor expressão relativa do gene *PvDREB6A* em relação aos outros eventos. Com base na análise dos dados, três plantas com cópia única e melhor expressão relativa do gene *PvDREB6A* foram escolhidas para a caracterização funcional, submetendo-se as plantas a estresses abióticos.

3.2.10.7 Expressão de GFP no evento Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7

Um dos eventos de transformação com cópia única e melhor expressão do gene *PvDREB6A* foi visualizado em microscópio confocal FLUOVIEW 1100 da OLYMPUS[®] para detectar a expressão de GFP. As folhas, raízes, sementes, siliqua e botões florais da planta escolhida com aproximadamente 30 dias, foram destacadas e colocadas nas lâminas com a face adaxial voltada para cima e a lamínula colocada sobre a amostra. A proteína GFP foi visualizada sob luz UV com comprimento de onda na faixa de 480 nm, sendo que a mesma

absorve a luz azul e reflete verde. Como contraste, foi visualizada a fluorescência da clorofila, que sob luz UV absorve na faixa do azul e reflete vermelho.

3.2.10.8 Caracterização funcional das plantas transgênicas

3.2.10.8.1 Experimento com déficit hídrico

Setenta sementes de arabidopsis de cada um dos tipos de plantas - tipo selvagem Col-0 e Salk_020767C; controles Col-0/pK7GW2D #7.1 e Salk_020767C/pK7GW2D #8.2; um evento Col-0/pFEC2.1 #1 e três eventos Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, #19.7 e #23.7 - foram colocadas para germinar em bandejas em condições de crescimento e desenvolvimento conforme especificado em 3.2.2.

Após 20 dias, todas as plantas foram submetidas ao déficit hídrico que consistiu em cessar a irrigação por 10 dias. Quatro dias após a re-hidratação a taxa de sobrevivência foi calculada da seguinte forma:

$$T_{\text{décit hídrico}} = \frac{Qf \ x \ 100}{Qi}$$

Onde,

Qi= Quantidade inicial plantas vivas

Qf= Quantidade final plantas vivas

T_{décit hídrico} = taxa de sobrevivência plantas sob déficit hídrico

3.2.10.8.2 Experimento com estresse salino

Trinta sementes de arabidopsis de cada um dos tipos de plantas - tipo selvagem Col-0 e Salk_020767C; controles Col-0/pK7GW2D #7.1 e Salk_020767C/pK7GW2D #8.2; um evento Col-0/pFEC2.1 #1 e três eventos Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, #19.7 e #23.7 - foram

colocadas para germinar em bandejas em condições de crescimento e desenvolvimento conforme especificado em 3.2.2.

Após 15 dias, cessou-se a irrigação por 3 dias e passou-se a irrigar as plantas com solução salina contendo 250 mM de NaCl uma vez por semana durante 4 semanas. Após esse período, a taxa de plantas que sobreviveram foi calculada de acordo com a fórmula citada em 3.10.8.1.

3.2.10.8.3 Experimento com estresse por frio

Vinte sementes de arabidopsis de cada um dos tipos de plantas - tipo selvagem Col-0 e Salk_020767C; controles Col-0/pK7GW2D #7.1 e Salk_020767C/pK7GW2D #8.2; um evento Col-0/pFEC2.1 #1 e três eventos Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, #19.7 e #23.7 - foram colocadas para germinar em bandejas em condições de crescimento e desenvolvimento conforme especificado em 3.2.2.

Após quatro semanas, as plantas foram aclimatadas em baixa temperatura e para isso foi necessário colocá-las a 4°C por três dias. Após, as plantas foram submetidas a -10°C por 90 min e imediatamente colocadas a 4°C novamente. Após sete dias, a taxa de sobrevivência foi calculada de acordo com a fómula especificada em 3.10.8.1.

3.2.10.9 Medições de parâmetros fisiológicos

3.2.10.9.1 Taxa de desidratação

Dez sementes de arabidopsis de cada um dos tipos de plantas - tipo selvagem Col-0 e Salk_020767C; controles Col-0/pK7GW2D #7.1 e Salk_020767C/pK7GW2D #8.2; um evento Col-0/pFEC2.1 #1 e três eventos Salk_020767C/pFEC2.1 #13.1, #19.7 e #23.7 - foram colocadas para germinar em bandejas em condições de crescimento e desenvolvimento conforme especificado em 3.2.1.

Após quatro semanas, a parte aérea das plantas foi separada das raízes e usada para medir o peso fresco das amostras. A perda de água foi monitorada e o peso da parte aérea das plantas foi medido com 30 min, 1, 2, 3 e 6 h. Após esse período, a parte aérea foi colocada na estufa e submetida a 80°C por 24 h e a medida do peso seco foi realizada. O cálculo para a taxa de perda de água foi realizado da seguinte forma:

 $T_{\text{desidratação}} = (\underline{Pd - Ps}) \quad x (100)$ (Pf - Ps)

Onde,

Pf= Peso fresco Ps= Peso seco Pd= Peso desidratação T_{desidratação}= Taxa de desidratação

As medidas foram coletadas de 10 amostras de cada tipo de planta tanto dos controles como das plantas transgênicas. As médias foram determinadas e o erro padrão calculado. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste de Tukey a 5% no *Software* BioEstat v.5.0 (AYRES et al., 2007).

Para determinar o dano celular causado por estresses abióticos, plântulas de arabidopsis das plantas do tipo selvagem, do mutante e plantas transgênicas Col-0/pFEC2.1 #1 e Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 foram submetidas aos estresses. Todas as medidas de condutividade foram realizadas utilizando-se o condutivímetro da Digimed[®] modelo DM-3Ex, com eletrodo de K=1,0 em uma temperatura 25°C.

Para o estresse osmótico, sementes de arabidopsis foram esterilizadas conforme descrito em 3.2.9 e colocadas para germinar em meio MS, pH 5,8 solidificado com ágar[®]. Após uma semana, as raízes das plântulas foram submersas em solução contendo PEG6000[®] a 25% por 3 horas. Após o estresse, 10 plântulas foram colocadas em 10 mL de água Mili-Q[®] e foram mantidas sob agitação a 20 rpm por 1 hora e logo em seguida a condutividade inicial (Ci) foi medida. As amostras foram então autoclavadas a 120°C por 20 min, após, quando as amostras atingiram a temperatura de 25°C a condutividade final foi medida (Cf).

Para o estresse salino, sementes de arabidopsis foram esterilizadas conforme descrito em 3.2.9 e colocadas para germinar em meio MS, pH 5,8 solidificado com ágar[®]. Após uma semana, as raízes das plântulas foram submersas em solução contendo NaCl 250mM por 5 horas. Após o estresse, 10 plântulas foram colocadas em 10 mL de água Mili-Q[®] e foram mantidas sob agitação a 20 rpm por 1 hora e logo em seguida a condutividade inicial (Ci) foi medida. As amostras foram então autoclavadas a 120°C por 20 min, após, quando as amostras atingiram a temperatura de 25°C a condutividade final foi medida (Cf).

Para o estresse por baixas temperaturas, sementes de arabidopsis foram esterilizadas conforme descrito em 3.2.9 e colocadas para germinar em meio MS, pH 5,8 solidificado com ágar[®]. Após uma semana, as plântulas foram submetidas a temperatura de 4°Cpor seis dias. Após o estresse, 10 plântulas foram colocadas em 10 mL de água Mili-Q[®] e foram mantidas sob agitação a 20 rpm por 1 hora e logo em seguida a condutividade inicial (Ci) foi medida. As amostras foram então autoclavadas a 120°C por 20 min, após, quando as amostras atingiram a temperatura de 25°C a condutividade final foi medida (Cf).

Com as medidas de condutividade inicial (Ci) e final (Cf), foram feitos os cálculos para determinar a taxa de vazamento de eletrólitos nas amostras:

$$T_{vazamento \ eletrólitos} = \frac{(Ci)}{(Cf)} x (100)$$

As amostras foram preparadas em quintuplicata para cada tipo de planta tanto dos controles como das plantas transgênicas. As médias foram determinadas e o erro padrão calculado. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste de Tukey a 5% no *Software* BioEstat v.5.0 (AYRES et al., 2007).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Confirmação de plantas mutante nocaute Salk_020767C homozigotas

Através da técnica de PCR foi possível confirmar que as plantas do mutante nocaute Salk_020767C são homozigotas (Figura 13A-B). Quando se utilizou a estratégia de amplificar as regiões que flanqueiam o T-DNA, todas as amostras amplificaram incluindo a planta do tipo selvagem (Figura 13A). No entanto, quando foi utilizada a segunda estratégia de amplificação, onde, o iniciador *forward* que se anela na região do T-DNA foi usado, todas as amostras amplificaram exceto, o controle negativo e a planta do tipo selvagem (Figura 13B).



Figura 13 - Confirmação de plantas Salk_020767C homozigotas. A) Reação de PCR com primers que amplificam a região flanqueadora ao T-DNA. B) Reação de PCR com o iniciador *forward* interno Lbb1.3 e *reverse* S020767C que se anela na região do T-DNA. LM: marcador de peso molecular *Low mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen[©]); C-: controle negativo; C0: planta tipo selvagem

Esses resultados indicam a inserção do T-DNA nas plantas mutante nocaute, e que as plantas são homozigotas para a mutação, uma vez que foi observada a presença de apenas uma banda em todas as amostras. Com base nas informações disponíveis no TAIR, o mutante Salk_020767C possui a região do gene *RAP2.4* interrompida. O gene *RAP2.4* de Arabidopsis é ortólogo do gene *PvDREB6A* de feijoeiro. Genes ortólogos são encontrados em espécies diferentes que possuem um mesmo ancestral comum, e a proteína que será codificada após a tradução da sequência do mRNA do gene transcrito, manterá uma parte de suas funções e características conservadas entre as espécies (LEWIN, 2009).

Plantas mutantes têm sido utilizadas em estudos de genética-reversa, que é uma das ferramentas mais importantes usadas no estudo de genômica funcional. A caracterização funcional de genes é essencial para entender como determinado gene se comporta em uma determinada espécie, e assim, entender os processos em que eles podem estar envolvidos. Estudos sobre as implicações do ganho e da perda da função de um determinado gene, através de superexpressão e deleção respectivamente, são essenciais para inferir a função, bem como, os processos regulatórios nos quais podem estar envolvidos no organismo em estudo.

3.3.2 Construção do vetor de transformação para a superexpressão do gene *PvDREB6A* em arabidopsis

No sistema de construção de vetores usado neste estudo, o fragmento de DNA flanqueando os sítios de recombinação (*att*) no vetor de entrada pode ser transferido para vetores que contém sítios de recombinação que são compatíveis (*att*B x *att*P ou *att*L x *att*R) em uma reação mediada pela LR clonasse II[®] (KARIMI, 2002). Dessa forma, a construção definitiva obtida com o vetor de destino pK7GWD2 foi chamada de pFEC2.1 (35S::PvDREB6A::T35S), e inseridos em células de *E.coli* DH5α. A reação de PCR de três clones confirmou a presença do gene *PvDREB6A* com o fragmento amplificado possuindo aproximadamente 1062 pb (Figura 14A), correspondente a sua *Orf*. O sequenciamento do plasmídeo pFEC2.1 revelou que a sequência do gene *PvDREB6A* foi clonada corretamente nos três clones.

Dessa forma, células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo pFEC2.1 e, para o controle, com o plasmídeo pK7GW2D. Dentre os vários clones que cresceram em meio seletivo, três foram selecionados para verificar a presença do inserto por PCR, dos quais em dois o fragmento de 1062 pb foi amplificado (Figura 14B).



Figura 14 - Amplificação do fragmento de 1062 pb referente ao gene *PvDREB6A* por PCR. A) PCR dos clones de *E.coli* DH5α transformados com a construção pFEC2.1. B) PCR dos clones de Agrobacterium transformados com pFEC2.1. LM: padrão molecular *Low Mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen[©])

3.3.3 Obtenção de plantas transgênicas de Arabidopsis do tipo selvagem (Col-0) e mutante (Salk_020767C) superexpressando o gene *PvDREB6A*

Plantas de arabidopsis (Col-0 e mutante) transformadas com os vetores pFEC2.1 e pK7GW2D (vazio) pelo método *floral dip* modificado foram cultivadas até o final de seu ciclo. Quando as plantas começaram a secar, cessou-se a irrigação e após alguns dias as sementes foram coletadas. Tais sementes já constituem a geração T1 e foram colocadas para crescer em meio ½ MS com canamicina para a seleção dos transformantes putativos (Figura 15A-D). As plântulas que cresceram e apresentavam o segundo par de folhas aclimatadas em substrato, levando à obtenção de 20 eventos de transformação de plantas Col-0/pFEC2.1 (Figura 15A) e mais de 100 eventos de transformação para plantas Salk_020767C/ pFEC2.1 (Figura 15B). No entanto, houve perda de plantas Col-0/pFEC2.1 no momento da aclimatação e apenas um evento permaneceu vivo e foi usado em análises posteriores. Em relação aos controles, foram obtidos 77 eventos de transformação Col-0/pK7GW2D (Figura 15C) e 64 eventos de transformação Salk_020767C/pK7GW2D (Figura 15D).







B







D



Figura 15 - Eventos de transformação após 15 dias de desenvolvimento em meio $\frac{1}{2}$ MS com 50 µg/mL de canamicina. A) Transformantes putativos Col-0/pFEC2.1. B) Transformantes putativos Salk_020767C/pFEC2.1. C) Transformantes putativos Col-0/pK7GW2D. D)

Α

Transformantes putativos Salk_020767C/pK7GW2D. A primeira, a segunda e a terceira coluna correspondem a seleção de plantas na primeira, segunda e terceira geração, respectivamente, em meio com canamicina 50 mg/mL.

3.3.4 Caracterização molecular das plantas transgênicas

3.3.4.1 Análise dos transformantes putativos nas gerações T1, T2 e T3 por PCR

Plantas transformantes putativos nas três gerações T1, T2 e T3 se desenvolveram em meio ½ MS seletivo e foram aclimatadas. Quinze dias após a aclimatação, o material vegetal em T1 de uma planta do evento Col-0/pFEC2.1, de 25 plantas Salk_020767C/pFEC2.1, de 28 plantas Col-0/pK7GW2D e de 30 plantas Salk_020767C/pK4GW2D foi coletado para extração de DNA e PCR conforme descrito em 3.2.3 e 3.2.5, respectivamente.

As reações de PCR com DNA de plantas transgênicas nas gerações T1, T2 e T3 tanto em plantas Col-0/pFEC2.1, quanto em plantas Salk_020767C/pFEC2.1, foram essenciais para confirmar a presença ou ausência do gene *PvDREB6A* nas plantas candidatas. Em relação ao evento #1 da planta Col-0/pFEC2.1 nas três gerações analisadas, foi detectado fragmento amplificado com 1062 pb correspondente a *Orf* do gene (Figura 16), garantindo a obtenção de pelo menos um evento deste tipo de planta.



Figura 16 - PCR do transformante putativo Col-0/pFEC2.1 evento #1 nas gerações T1, T2 e T3. LM: *Low mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen[©]); B: controle negativo

Vinte e cinco eventos de plantas Salk_020767C/pFEC2.1 na geração T1 foram selecionados e analisados por PCR, e em 22 deles o fragmento correspondente a *Orf* do gene *PvDREB6A* foi amplificado (Figura 17A). Os eventos #6, #8, #9, #13, #15, #19 e #23 foram selecionados para avançar a geração. Assim, plantas da geração T2 foram selecionadas,

aclimatadas e suas folhas foram coletadas para extração de DNA, o qual foi usado como molde para a reação de PCR. Em relação ao evento #6, de nove plantas analisadas, em apenas uma o fragmento não foi amplificado. Nos eventos #8, #9, #13, #15 e #19, em todas as amostras submetidas a PCR o fragmento de 1062 pb foi amplificado. Em relação ao evento #23, das 10 plantas submetidas à análise por PCR, setes delas amplificaram o fragmento correspondente a *Orf* do gene *PvDREB6A* (Figura 17B).

As mesmas análises foram realizadas nas plantas na geração T3. Todas as amostras dos eventos #6, #8, #9, #13 e #15 amplificaram o fragmento correspondente a *Orf* do gene. Em relação ao evento #19, das sete amostras analisadas, em apenas uma o fragmento não foi amplificado. O evento #23 teve sete amostras analisados por PCR e em duas delas o fragmento de 1062 pb não foi amplificado (Figura 17C).



Figura 17 - PCR dos transformantes putativos SalK_020767C/pFEC2.1. A) Análise por PCR de 25 eventos de transformação na geração T1. B) Análise por PCR de 60 plantas dos eventos #6, #8, #9, #13, #15, #19 e #23 na geração T2. C) Análise por PCR de 42 plantas dos eventos #6, #8, #9, #13, #19, #23 e #15 na geração T3

Em relação aos controles, as reações de PCR com DNA de plantas transgênicas nas gerações T1, T2 e T3 tanto em plantas Col-0/pK7GW2D, quanto em plantas Salk_020767C/pK7GW2D, foram essenciais para confirmar a presença ou ausência do gene *Egfp* nas plantas. Dos 28 eventos Col-0/pK7GW2D analisados em T1, em 24 foi detectado um fragmento amplificado de 235 pb correspondente ao tamanho esperado para o *Egfp* (Figura 18A). Os eventos #5, #7, #9, #10 e #17 foram selecionados para avançar a geração. Nas plantas da geração T2 nos eventos #5 e #7 apenas duas amostras não amplificaram; em todas as amostras do evento #9 houve amplificação; e nos eventos #10 e #17 houve amplificação de três e cinco amostras, respectivamente (Figura 18B). Para plantas Col-0/pK7GW2D da geração T3, das cinco amostras analisadas do evento #5, em apenas uma o fragmento não foi observado; nos eventos #7 e #17 todas as amostras amplificaram; E nos eventos #9 e #10, das cinco amostras analisadas duas delas não apresentaram o fragmento de 235 pb esperado (Figura 18C).





Figura 18 - PCR dos transformantes putativos Col-0/pK7GW2D. A) Análise por PCR de 28 eventos de transformação na geração T1. B) Análise por PCR de 34 plantas dos eventos #5, #7, #9, #10 e #17 na geração T2. C) Análise por PCR de 25 plantas dos eventos #5, #7, #9, #10 e #17 na geração T3

Para as plantas controle Salk_020767C/pK7GW2D, dos 30 eventos analisados em T1, 28 apresentaram um fragmento amplificado de 235 pb correspondente ao tamanho esperado (Figura 19A). Os eventos #1, #8, #18, #21 e #29 foram selecionados para avançar a geração. Na geração T2, nas plantas provenientes dos eventos #1 e #18 apenas duas amplificaram; em todas as amostras dos eventos #8 e #21 houve amplificação; e no evento #29 houve amplificação de cinco (Figura 19B). А análise amostras das plantas Salk_020767C/pK7GW2D na geração T3 mostrou que nos eventos #1 e #18, das seis amostras, apenas duas não amplificaram; e nos eventos #8, #21 e #29 as seis amostras amplificaram o fragmento esperado (Figura 19C).




Figura 19 - PCR dos transformantes putativos Salk_020767C/pK7GW2D. A) Análise por PCR de 30 eventos de transformação na geração T1. B) Análise por PCR de 32 plantas dos eventos #1, #8, #18, #21 e #29 na geração T2. C) Análise por PCR de 30 plantas dos eventos #1, #8, #18, #21 e #29 na geração T3

Com a confirmação da inserção do vetor vazio nas plantas controle, as plantas Col-0/pK7GW2D #7.1 e Salk_020767C/pK7GW2D #8.1 foram selecionadas e utilizadas nos experimentos seguintes.

Após detectar a presença ou ausência do fragmento amplificado correspondente a *Orf* gene *PvDREB6A* nas amostras analisadas por PCR, algumas delas em que o gene foi amplificado, dos eventos #6, #8, #9#, #13, #15, #19 e #23 foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho. O próximo passo foi determinar o número de cópias do gene *PvDREB6A* nas plantas transgênicas.

3.3.4.2 Ensaio para determinar o número de cópias do gene *PvDREB6A* nas plantas transgênicas

A técnica de qPCR ($\Delta\Delta C_T$) com ensaios TaqMan[®] em duplex tem sido amplamente utilizada para determinar o número de cópias de um gene inserido em plantas transgênicas (INGHAM et al., 2001; MASON et al., 2002; WENG et al., 2004). Amostras de DNA

isoladas de uma planta Col-0/pFEC2.1 e de 20 plantas Salk_020767C/pFEC2.1, foram analisadas para determinar o número de cópias do gene *PvDREB6A* nas plantas transgênicas usando o ensaio TaqMan[®] em duplex. O ensaio TaqMan[®] *Copy Number* detecta o gene alvo ou sequência de interesse e o TaqMan[®] *Copy Number Reference* detecta uma sequência que conhecidamente possui duas cópias no genoma diplóide. O gene alvo *PvDREB6A* foi usado para síntese do ensaio TaqMan[®] *Copy Number* e o gene AT4G03070.1 de *Arabidopsis thaliana* que possui cópia única no genoma foi usado para a síntese do ensaio TaqMan[®] *Copy Number* e o gene AT4G03070.1 de *Arabidopsis thaliana* que possui cópia única no genoma foi usado para a síntese do ensaio TaqMan[®] *Copy Number* Reference.

O número de cópias na sequência alvo foi determinado pela quantificação relativa usando o método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$). Para a reação de qPCR em duplex, o ensaio TaqMan[®] *Copy Number*, TaqMan[®] *Copy Number Reference*, o reagente TaqMan[®] *Genotyping Master Mix* e o DNA genômico de cada planta analisada foram colocados em um único tubo de reação.

O DNA molde é desnaturado e cada iniciador se anela em sua sequência alvo específica. Cada sonda se anela especificamente em sua sequência complementar nos sítios de ligação entre os primers *forward* e *reverse*. Durante cada ciclo da PCR, as sequências alvo e referência são simultaneamente amplificadas pela AmpliTaq[®] *Gold DNA Polymerase*, que possui atividade de nuclease na extremidade 5' que cliva as sondas que são hibridizadas em cada fragmento amplificado. Quando um oligonucleotídeo da sonda é clivado, o *quencher* é separado do corante repórter aumentado a sua florescência. O acúmulo dos produtos de PCR pode ser detectado em tempo real pelo monitoramento do aumento da fluorescência de cada repórter (FAMTM ou VIC[®]) em cada ciclo da PCR (Figura 20).



Figura 20 - Ilustração do método de detecção da sequência alvo e de referência no DNA genômico na reação de qPCR em duplex (Adaptado do protocolo TaqMan[®] *Copy Number*)

Após a corrida, os dados gerados foram corrigidos para *Manual C_T thershold* igual a 0,2 e *Automatic Baseline On* no *software StepOnePlus*, e exportados no formato texto. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software* CopyCaller[®] (v. 2.0) que faz a análise do número de cópias baseado nos dados de qPCR a partir do ensaio TaqMan[®] customizado. O número de cópias foi determinado para cada uma das amostras que representam os eventos de transformação confirmados por PCR. De todos os eventos analisados apenas as amostras do evento #15 apresentaram mais do que duas cópias no genoma diploide. As demais amostras dos eventos analisados (#6, #8, #9, #13, #19 e #23) apresentaram duas cópias, como o genoma de Arabidopsis é diploide, duas cópias indicam que durante o processo de transformação apenas uma cópia do gene de interesse foi inserido nas plantas transgênicas. O intervalo de confiança para a determinação do número de cópias foi maior que 0,99 e o número absoluto do desvio-padrão foi calculado para cada réplica *z-score* (Tabela 4).

Plantas transgênicas de todos os eventos, exceto #15, foram selecionadas para a análise da expressão gênica do gene *PvDREB6A* por RT-qPCR.

Eventos	Nº de cópias	Nível de confiança	z-score	
Col-0/pFEC2.1	2	>0,99	0,69	
#1	2	>0,99	0,02	
Salk_020767C/pFEC2.1	2	>0,99	0,10	
#6.1	2	>0,99	0,33	
#6.3	2	>0,99	0,04	
#8.3	2	>0,99	1,02	
#8.4	2	>0,99	1,07	
#8.9	2	>0,99	0,03	
#9.1	2	>0,99	0,08	
#9.4	2	>0,99	0,98	
#13.1	2	>0,99	0,52	
#13.7	2	>0,99	0,71	
#15.2	4	>0,99	0,06	
#15.8	4	>0,99	1,07	
#19.4	2	>0,99	0,45	
#19.7	2	>0,99	0,22	
#23.1	2	>0,99	0,65	
#23.3	2	>0,99	0,51	
#23.7	2	>0,99	0,09	

Tabela 4 - Determinação do número de cópias do gene *PvDREB6A* em plantas transgênicas Col-0/pFEC2.1 e Salk_020767C/pFEC2.1 por RT-qPCR pelo ensaio TaqMan[®] Copy Number Variation

3.3.4.3 Análise da expressão dos genes de referência em plantas de arabidopsis do tipo selvagem (Col-0) sob estresse salino

A quantificação relativa do nível de expressão de um gene é uma etapa fundamental na identificação da regulação de genes em vias regulatórias complexas no desenvolvimento da planta. A análise pela transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) é uma importante ferramenta para quantificar níveis de expressão gênica por apresentar alta sensibilidade, reprodutibilidade e uma ampla taxa de quantificação (FREEMAN et al., 1999).

Genes que são expressos de forma estável durante o desenvolvimento da planta ou em resposta a condições ambientais adversas, são essenciais para normalização em experimentos de RT-qPCR (HONG et al., 2010). A quantificação acurada da abundância de transcritos obtida pela análise de RT-qPCR é essencialmente dependente do uso genes que são expressos de forma estável (genes de referência) para normalizar a variação de amostra-para-amostra, a variação na integridade no RNA, na eficiência da transcriptase reversa, e a variação na amostra de cDNA (BUSTIN et al., 2009).

Vários genes que possuem expressão estável foram identificados em *Arabidopsis* e chamados de genes *housekeeping* são essenciais para a sobrevivência da planta e possuem pouca ou nenhuma variação na expressão (THELLIN et al., 2009). Alguns trabalhos, no entanto, têm demonstrado que os genes tradicionalmente usados como *housekeeping* não são sempre estáveis e podem apresentar algumas variações (SELVEY et al., 2001; LEE et al., 2002; CZECHOWSKI et al., 2005).

Baseado nas informações acima, este estudo foi desenvolvido para escolher os dois melhores genes de referência, ou seja, os genes com menor variação na expressão quando as plantas são submetidas ao estresse salino, um dos tipos de estresse abiótico que pode afetar a expressão de genes.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Col-0) foram cultivadas, submetidas ao estresse com solução NaCl 250 mM (exceto o controle), e o material vegetal da parte aérea foi coletado. O RNA total foi extraído, quantificado, e a integridade das amostras foi observada através da corrida em gel de agarose (Figura 21). A molécula de cDNA foi produzida a partir do mRNA e usado nas reações de RT-qPCR de acordo com o especificado em 3.2.10.1. Ao todo cinco genes de referência descritos na literatura como *housekeeping* foram analisados nesse estudo.



Figura 21 - Eletroforese de RNA total extraído de plantas de *Arabidopsis* controle (regadas com H_2O) e tratada (regadas com solução de NaCl 250 mM)

Após a análise de estabilidade de expressão, o gene com acúmulo de transcrito mais estável quando submetido ao estresse salino foi o *PDF2*, seguido de *F-BOX*, *PPR*, *SAND*, *At4270* e *EF1a* (Figura 22). Lilly et al. (2011) demonstraram que os genes de referência *PDF2*, *SAND*, *F-BOX* e *EF1a* foram os que tiveram maior estabilidade de expressão em plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas por vírus, o que caracteriza estresse biótico.

Portanto, o par de genes com expressão mais estável em plantas sob estresse salino dentre os analisados são o *PDF2* e o *F-BOX*. O gene *PDF2* codifica uma subunidade regulatória de 65-KDa (KiloDaltons) da proteína fosfatase (serina ou treonina) e tem a função de manter a identidade das células da camada meristemática L1, e a superexpressão deste gene pode levar ao atraso no florescimento (ABE et al., 2003). A função molecular e o processo biológico em que o gene *F-BOX* está envolvido é desconhecida (LILLY et al., 2011). Este gene foi o segundo mais estável nesta análise, este resultado é consistente com o que foi relatado por Libault et al. (2008), onde o *F-BOX* está na lista dos 15 genes com expressão mais estável testados em soja.

Os genes *AtPDF2* e *AtF-BOX* foram os genes que apresentaram maior estabilidade de expressão. A partir desses dados, as análises de expressão gênica realizadas neste trabalho foram conduzidas utilizando os genes *PDF2* e *F-BOX* como normalizadores internos.



Figura 22 - Estabilidade da expressão dos genes de referência *At4270*, *SAND*, *PDF*, *F-BOX*, *EF1α* e *PPR* em plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas ao estresse salino

3.3.4.4 Análise da expressão do gene PvDREB6A nas plantas transgênicas por RT-qPCR

Para analisar a função biológica do gene *PvDREB6A* que é um fator de transcrição, este foi superexpresso em plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Col-0) e mutante (Salk_020767C) geradas pela transformação de botões florais por *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário recombinante pFEC2.1. A *Orf* do gene *PvDREB6A* isolada a partir de cDNA, foi inserida na região *downstream* do promotor CaMV35S.

A quantificação da expressão do transgene normalizada pela expressão dos genes de referência, neste caso PDF2 e F-BOX, foi realizada através da PCR quantitativa (RT-qPCR) a partir do cDNA. Vinte amostras de plantas Salk_020767C/pFEC2.1 dos eventos #6, #8, #9, #13, #19 e #23 para as quais foi confirmada a presença de cópia única do gene *PvDREB6A* inserido foram utilizadas para extração de RNA total, (Figura 23).

	#6.1	#6.3	#6.8	#6.9	9 #6.10)	#	\$8.3	#8.4	# 8.5	#8.9	#9.1
								N SC 1			798 S	
		1977	1	E						-	B-okio Lulian Altitut	
#	#9.4	#13.1	#13.7	#19.2	#19.6	#19	9.7 #	23.4	#23	.7 #23.1	2	#23.13
			1.F									
調査			3 66				14 14					

Figura 23 - Extração de RNA das amostras de plantas transgênicas dos eventos #6, #8, #9, #13, #19 e #23

Através da quantificação relativa por RT-qPCR foi possível detectar a expressão do gene *PvDREB6A* em todas as plantas transgênicas analisadas. Os valores de Cq obtidos após a corrida foram corrigidos por meio de análise da eficiência em cada reação e foram utilizados para análise no *software REST* 2009 (QIAGEN[®]). A amostra com o menor valor de expressão (#8.3) do gene *PvDREB6A* foi usada como "controle", e a expressão das demais amostras foi relativa à ela. Em todas as amostras analisadas em relação à amostra #8.3, o gene *PvDREB6A*

foi *up-regulated* (Figura 24). A amostra com maior valor de expressão do gene *PvDREB6A* foi o evento de transformação #23.7, que apresentou expressão 20 vezes maior do que a amostra utilizada como controle.

Nenhuma modificação fenotípica visível, como o nanismo, foi observada nas plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A*. Chen et al. (2007), relataram que a superexpressão do gene *GmDREB1*, classificado no sub-grupo A5 da subfamília DREB, resultou em um aumento a tolerância a seca e a alta salinidade e não retardou o crescimento das plantas de arabidopsis transgênicas.



Figura 24 - Análise da expressão gênica do gene *PvDREB6A* em 20 amostras de plantas Salk_020767C/pFEC2.1 dos eventos de transformação #6, #8, #9, #13, #19 e #23. Todas as amostras apresentam cópia única do gene. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita em relação amostra #8.3, que apresentou menor valor de expressão. * Diferença estatisticamente significativa p < 0,05

3.3.4.5 Expressão da proteína GFP no evento de transformação #23.7 da planta Salk_020767C/pFEC2.1

O evento de transformação #23.7 da planta Salk_020767C/pFEC2.1, com cópia única e melhor expressão do gene *PvDREB6A*, foi selecionado para a visualização em microscópio confocal sob luz ultravioleta. A expressão da proteína fluorescente GFP foi detectada em diferentes tecidos como botões florais, raízes, sementes, siliqua e folhas (Figura 25),

confirmando a integração e expressão da construção genética inserida nesta planta. A luz ultravioleta, com comprimento de onda na faixa dos 480 nm foi absorvida pelas células e refletida em verde, onde a GFP estava presente, e em vermelho pela fluorescência natural da clorofila.

A proteína GFP é amplamente usada como repórter na expressão gênica e em estudos de localização subcelular de proteínas. Ela é uma proteína estável que se acumula e pode ser facilmente detectada. Assim, como em outras proteínas bioluminescentes o cromóforo na GFP está intrínseco na estrutura primária da proteína, e a fluorescência da GFP não requer substrato ou co-fatores para ser detectada (KAIN et al., 1995).



Figura 25 - Visualização do evento de transformação #23.7 planta Salk_020767C/pFEC2.1 sob luz ultravioleta em microscópio confocal. Da esquerda para direita: botão floral, raizes, sementes, siliqua e folha. Barra= 50 µM ou 50 pixels

3.3.5 Caracterização funcional das plantas transgênicas

3.3.5.1 Análise de tolerância ao déficit hídrico nas plantas transgênicas

Em diferentes espécies de plantas tem sido demonstrado que, de todos os estresses abióticos a seca é o maior fator que limita a produtividade das culturas globalmente (BRAY et al., 2000). O desenvolvimento de plantas tolerantes a estresses abióticos é fundamental para minimizar perdas, desta maneira, o melhoramento genético e a transformação genética de plantas têm contribuído para o desenvolvimento de plantas tolerantes a estresses.

Plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* foram obtidas neste estudo por meio da transformação genética via Agrobacterium. Após a confirmação da inserção do gene por PCR, a verificação do número de cópias inserida e a análise da expressão do gene *PvDREB6A*, a próxima etapa foi verificar se superexpressão do gene está relacionada ao aumento da tolerância ao déficit hídrico nas plantas transgênicas.

O experimento de déficit hídrico foi conduzido em sala de crescimento conforme especificado em 3.2.10.8.1. Para essa análise, foram utilizadas plantas do tipo selvagem (Col-0), plantas mutantes (Salk_020767C); plantas do tipo selvagem e do mutante transformadas com o vetor vazio (Col-0/pK7GW2D e Salk_020767C/pK7GW2D); 1 planta do tipo selvagem e 3 plantas mutante superexpressando o gene *PvDREB6A* (Col-0/pFEC2.1 #1, Salk_020767C/pFEC2.1 eventos #13.1, #19.7 e #23.7). As plantas cresceram sob condições normais por 20 dias, quando cessou-se a irrigação por 10 dias e quatro dias após a re-hidratação a taxa de sobrevivência foi calculada.

A superexpressão do gene *PvDREB6A* de feijoeiro em arabidopsis conferiu tolerância ao déficit hídrico nas plantas transgênicas (Figura 26). Em todos os controles utilizados nesse experimento (plantas do tipo selvagem, do mutante e plantas transformadas com o vetor vazio, Col-0/pK7GW2D e Salk_020767C/pK7GW2D) a taxa de sobrevivência após a rehidratação foi de 0%, ou seja, nenhuma planta sobreviveu após o estresse. Plantas mutantes, em que o gene ortólogo ao *PvDREB6A* foi interrompido, foram as primeiras a apresentar sinais de estresse, três dias após cessar a irrigação as plantas estavam completamente murchas. Plantas do tipo selvagem apresentaram sintomas de estresse após cinco dias sem irrigação. As plantas controle transformadas com o vetor vazio apresentaram o mesmo comportamento que suas respectivas plantas de origem. A análise da tolerância da planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1 ao déficit hídrico revelou que, das 70 plantas usadas no experimento apenas 20 sobreviveram após o estresse (28,5%). Em relação às plantas mutante superexpressando o gene *PvDREB6A* (Salk_020767C/pFEC2.1 eventos #13.1, #19.7 e #23.7) apresentaram taxa de sobrevivência de 12,9%, 48,6% e 74,3% respectivamente (Figura 27). As plantas transgênicas começaram a sofrer com o déficit hídrico após nove dias sem irrigação e após 10 dias sem irrigação as plantas estavam completamente murchas.

A superexpressão de genes DREB dos subgrupos A1 e A2 têm sido relacionadas ao aumento da tolerância ao déficit hídrico em diferentes espécies de plantas. Em plantas de tomate transgênico, a superexpressão do gene *DREB1B/CBF1* aumentou a tolerância ao resfriamento e a seca (HSIEH et al., 2002). *Arabidopsis* e plantas de arroz transgênicos superexpressando *OsDREB1A* foram tolerantes à baixas temperaturas, alta salinidade e seca (DUBOUZET et al., 2003; ITO et al., 2006). A superexpressão da forma constitutivamente ativa *AtDREB2A-CA* resultou em retardo do crescimento em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, aumentando a regulação de muitos genes induzidos pelo estresse, conferindo tolerância ao déficit hídrico (SAKUMA et al., 2006a). Plantas de arabidopsis transgênicas expressando *ZmDREB2A* de milho apresentaram melhora na tolerância ao déficit hídrico, no entanto, as plantas apresentaram fenótipo anão. A superexpressão de *OsDREB2A* e *OsDREB2B* em arabidopsis transgênicas melhorou a tolerância a seca e ao choque térmico (MATSUKURA et al., 2010).

Em plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene PvDREB6A, o aumento da tolerância foi detectado tanto na planta do tipo selvagem superexpressando o gene (Col-/pFEC2.1 #1), e nesse caso a planta possui um ortólogo ao PvDREB6A que é o gene RAP2.4 de arabidopisis, quanto em plantas mutantes superexpressando o gene PvDREB6A (Salk_020767C/pFEC2.1 eventos #13.1, #19.7 e #23.7). Lin et al. (2008), relataram que a superexpressão do gene RAP 2.4 ou a sua deleção causam alteração na expressão de genes que são regulados pela luz, pelo etileno e pela seca. Esses resultados demonstram que provavelmente há uma regulação positiva de genes relacionados ao déficit hídrico em plantas de arabidopisis que superexpressam o gene PvDREB6A.

Antes do estresse **Depois do estresse Columbia-0** Salk_020767C **Columbia-0** pK7GW2D Salk_020767C + pK7GW2D **Columbia-0** pFEC2.1 #1 Salk 020767C pFEC2.1#13.1 Salk 020767C pFEC2.1#19.7 Salk 020767C pFEC2.1#23.7

Figura 26 - Experimento de déficit hídrico com plantas de Arabidopsis Colmubia-0, Salk_020767C, Col-0/pK7GW2D, Salk_020767C/pK7GW2D, Col-0/pFEC2.1 #1 e Salk_020767C eventos #13.1, #19.7 e #23.7. À esquerda plantas com 20 dias de desenvolvimento, antes de serem submetidas ao estresse. À direita plantas submetidas ao estresse quatro dias após a re-hidratação



Figura 27 - Taxa de sobrevivência das plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* após o déficit hídrico

3.3.5.2 Análise de tolerância ao estresse salino em plantas transgênicas

Em plantas submetidas a estresses abióticos, a regulação da expressão de genes induzidos por estresses é mediada pela ação fatores de transcrição que interagem diretamente com o DNA na região promotora do gene alvo. Alguns estudos demonstram que genes DREB participam da regulação da expressão de genes induzidos por estresse salino, e a superexpressão desses TFs tem sido relacionado ao aumento da tolerância ao estresse salino em diferentes espécies de plantas (ZHOU et al., 2012; BOUAZIZ et al., 2013; ZHANG et al., 2013).

Para o experimento com estresse salino as plantas foram cultivadas durante 15 dias, tiveram a irrigação interrompida por três dias e foram irrigadas somente com solução salina pelas próximas quatro semanas. A superexpressão do gene *PvDREB6A* de feijoeiro em *Arabidopsis* conferiu tolerância ao estresse salino como pode ser observado na Figura 28. Em todos os controles utilizados nesse experimento a taxa de sobrevivência após a re-hidratação foi de 0%, ou seja, nenhuma planta sobreviveu após o estresse. Plantas mutantes, em que o gene ortólogo ao *PvDREB6A* foi interrompido, foram as primeiras a apresentar sinais de estresse; sete dias após a irrigação com solução salina as folhas começaram a apresentar

coloração amarela. Plantas do tipo selvagem apresentaram sintomas de estresse após 13 dias de irrigação com solução salina. As plantas controle transformadas com o vetor vazio apresentaram o mesmo comportamento que suas respectivas plantas de origem. A análise da tolerância da planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1 ao estresse salino revelou que, das 30 plantas usadas no experimento apenas 10 sobreviveram após o estresse (30%). Em relação às plantas mutante superexpressando o gene *PvDREB6A*, plantas Salk_020767C/pFEC2.1 eventos #13.1, #19.7 e #23.7 apresentaram taxa de sobrevivência de 16,6%, 43,3% e 66,7%, respectivamente (Figura 29). Esses resultados estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura a respeito do papel dos genes *DREB* na tolerância a estresses abióticos em plantas.

A superexpressão do fator de transcrição *StDREB1* de batata, melhorou a tolerância das plantas transgênicas ao estresse hídrico e salino (BOUAZIZ et al., 2013). Agarwal et al. (2010) observaram aumento da tolerância ao sal em plantas de tabaco transgênico superexpressando o gene *PgDREB2A* de milheto. Zhou et al. (2012), relataram o aumento da tolerância a seca e a alta salinidade em plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *PeDREB2A* de flor-de-lotus. A superexpressão do gene *OsDREB2A* de arroz aumentou a tolerância ao sal em plantas de soja transgênicas (ZHANG et al., 2013).

Além de conferir tolerância ao déficit hídrico, plantas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro apresentaram aumento na tolerância ao estresse salino, revelando que esse gene é um potencial alvo para o aumento da tolerância a múltiplos estresses abióticos em plantas.



Figura 28 - Experimento de estresse salino. A) Plantas controle antes do estresse. B) Plantas transgênicas antes do estresse. C) Plantas controle uma semana após a irrigação com solução salina. D) Plantas transgênicas uma semana após a irrigação com solução salina. E) Plantas controle após quatro semanas de irrigação com solução salina. F) Plantas transgênicas quatro semanas após a irrigação com solução salina



Figura 29 - Taxa de sobrevivência das plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* após o estresse salino

3.3.5.3 Análise de tolerância ao estresse por frio em plantas transgênicas

Entre os estresses abióticos, a baixa temperatura causada por resfriamento ou congelamento é um dos principais fatores que afetam a produtividade, o crescimento e a distribuição de plantas em escala espacial e temporal (SLOT et al., 2005). Genes *DREB* pertencem à família AP2/ERF de TFs e estão divididos em seis subgrupos, sua expressão é regulada durante o estresse e tem sido observado um aumento da tolerância a estresses abióticos em plantas transgênicas superexpressando esses genes (MIZOI et al., 2011).

O experimento de estresse por frio com as plantas obtidas neste estudo foi conduzido em sala de crescimento. Plantas com 20 dias de desenvolvimento foram usadas nesse experimento, as plantas foram aclimatadas para o frio por três dias, submetidas a temperaturas -10°C, posteriormente mantidas a 4°C e após esse período colocadas em condições normais de crescimento. A taxa de sobrevivência foi calculada conforme descrito em 3.2.10.8.3.

A superexpressão do gene *PvDREB6A* de feijoeiro em *Arabidopsis* conferiu tolerância ao estresse por frio nas plantas transgênicas (Figura 30). Em todos os controles utilizados nesse experimento, foram eles: plantas do tipo selvagem, do mutante e plantas transformadas com o vetor vazio (Col-0/pK7GW2D e Salk_020767C/pK7GW2D), a taxa de sobrevivência após a aclimatação foi de 0%, ou seja, nenhuma planta sobreviveu após o estresse. A análise da tolerância da planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1 ao déficit hídrico revelou que, das 20 plantas usadas no experimento, 12 sobreviveram após o estresse (60%). Em relação às plantas mutante superexpressando o gene *PvDREB6A*, plantas Salk_020767C/pFEC2.1 eventos #13.1, #19.7 e #23.7 apresentaram taxa de sobrevivência de 50%, 60% e 75% respectivamente (Figura 31). Esses resultados estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura a respeito do papel dos genes *DREB* na tolerância a estresses abióticos em plantas.

A engenharia genética é uma poderosa ferramenta que tem sido amplamente utilizada para a caracterização funcional de genes e para melhorar a tolerância das plantas a estresses. A maioria dos estudos relacionados a estresses abióticos tem sido realizada com *Arabidopsis* transgênicas e, em geral, a análise revela que a expressão constitutiva de genes *DREB* do subgrupo A1, leva a um aumento na expressão de genes *COR* que estão relacionados ao aumento da tolerância ao congelamento (AKHTAR et al., 2012). A superexpressão do gene *OsDREB1* de arroz, revelou a indução de genes responsivos a estresses e aumentou a tolerância a seca e ao frio (DUBOUZET et al., 2003; ITO et al., 2006). A superexpressão do gene *ZmDREB1A* de milho em *Arabidopsis* melhorou a tolerância a seca e ao congelamento (QIN et al., 2004). A superexpressão de genes homólogos *DREB1/CBF* de cevada, centeio e trigo em plantas de *Arabidopsis* e tabaco transgênico resultou na indução de genes e as linhagens apresentaram tolerância a seca e ao frio (NAKASHIMA et al., 2009). Arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *MbDREB1* de maçã mostraram um aumento na tolerância ao frio (YANG et al., 2011).

Plantas de Arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro apresentaram aumento na tolerância ao estresse por frio, revelando que esse gene é um potencial alvo para o aumento da tolerância a estresses abióticos em plantas.

 Col-0/
 Salk_020767C/
 Col-0/
 Salk_020767C/
 Salk_020767C/



Figura 30 - Experimento de estresse por frio. A) Plantas com quatro semanas após a germinação aclimatadas a 4°C. B) Plantas submetidas à temperatura de -10°C por 90 minutos. C) Recuperação das plantas submetidas ao estresse após sete dias



Figura 31 - Taxa de sobrevivência de plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* após o estresse por frio

3.3.5.4 Parâmetros fisiológicos

3.3.5.4.1 Avaliação da taxa de desidratação

Plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* foram submetidas ao experimento para determinar a taxa de desidratação conforme foi descrito em 3.2.10.9.1. A taxa de desidratação é um parâmetro fisiológico importante que revela quanta água a planta perde em relação ao tempo, ou seja, a tolerância à desidratação. Ao todo, 10 plantas de cada tipo (Col-0, Salk_020767C, Col-0/ pK7GW2D, Salk_020767C/ pK7GW2D, Col-0/pFEC2.1 #1, Salk_020767C/pFEC2.1 eventos #13.1, #19.7 e #23.7) tiveram a taxa de perda de água monitorada durante 0, 0,5, 1, 2, 3 e 6 horas. Após 6 horas de desidratação, pôde ser observado que as plantas controle estavam mais murchas do que as plantas transgênicas (Figura 32A). Plantas superexpressando o gene *PvDREB6A* apresentaram menor taxa de desidratação, sendo esta diferença estatisticamente significativa nos tempos 2, 3 e 6 horas (Figura 32B).

Os resultados revelam que plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* foram mais tolerantes a desidratação. Lu et al. (2012) demonstraram que em que plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *ZmNAC1* apresentam maior tolerância a desidratação do que plantas do tipo selvagem. A superexpressão do gene *ZmbZIP72* de milho em arabidopsis aumentou a tolerância contra a desidratação nestas plantas (YING et al., 2012).





Figura 32 - Determinação da taxa de desidratação nas plantas controle plantas de Arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A*. A) Aspecto das plantas após 6 horas de desidratação. B) Cálculo da taxa de desidratação. ** Indica diferença estatisticamente significativa em comparação com os controles, p<0.01

3.3.5.4.2 Vazamento de eletrólitos

Quando as plantas são submetidas a estresses, as membranas celulares podem ser afetadas e a manutenção da sua estabilidade e integridade é fundamental para a planta ser capaz de tolerar estresses causados por condições ambientais adversas (LEVITT, 1980).

Nesse estudo foram determinadas as taxas de vazamento de eletrólitos em plantas submetidas ao estresse osmótico, alta salinidade e baixa temperatura conforme descrito em 3.2.10.9.2. As taxas de vazamento de eletrólitos nas plantas transgênicas sob estresse osmótico, alta salinidade e baixa temperatura foram significativamente menores do que em seus respectivos controles mostrando que houve um aumento da estabilidade na membrana em plantas superexpressando o gene *PvDREB6A* (Figura 33A-C).

Por causa da correlação positiva entre a taxa de vazamento de eletrólitos e a taxa de desidratação, pode-se dizer que plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* possuem maior capacidade de tolerar estresses ambientais, conforme foi verificado nos ensaios funcionais descritos nesse capítulo em 3.2.10.8.







Figura 33 - Determinação da taxa de vazamento de eltrólitos nas plantas controle plantas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A*. A) Plantas submetidas ao estresse osmótico. B) Plantas ubmetidas ao estresse salino. C) Plantas submetidas a baixas temperaturas. ** Indica diferença estatisticamente significativa em comparação com os controles, p<0.01

3.4 Conclusões

A superexpressão do gene *PvDREB6A* de feijoeiro em plantas de arabidopsis do tipo selvagem e do mutante aumentou a tolerância ao déficit hídrico, a alta salinidade e a baixa temperatura. A análise da tolerância pela determinação da taxa de perda de água mostrou que as plantas transgênicas apresentam maior tolerância com menor taxa de perda de água.

A caracterização funcional do gene *PvDREB6A* de feijoeiro revelou que a superexpressão deste gene foi capaz de conferir tolerância a múltiplos estresses abióticos em plantas transgênicas de arabidopsis, assim, este é um gene candidato com alto potencial para a transformação genética de feijoeiro com o objetivo de obter plantas com maior tolerância a estresses abióticos.

Referências

ABE, M.; KATSUMATA, H.; KOMEDA, Y.; TAKAHASHI, T. regulation of shoot epidermal cell differentiation by pair of homeodomain proteins in Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 130, p. 635-643, 2003.

ACOSTA-GALLEGOS, J.; KOHASASHI-SHIBATA, J. Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry-beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivar. Field Crops Research, Amsterdam, v. 20, p. 81–93, 1989.

AGARWAL, P.; AGARWAL, P. K.; ARVIND, J.; JOSHI, S. K.; MALIREDDY, S.; REDDY, K. Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 37, p. 1125–1135, 2010.

AKHTAR, M.; JAISWAL, A.; TAJ, G.; JAISWAL, J. P.; QURESHI, M. I.; SINGH, N. K. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. **Journal of Genetics**, London, v. 91, p. 385-396, 2012.

ANDERSEN, C. L.; LEDET-JENSEN, J.; ØRNTOFT, T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. **Cancer Research**, London, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

AYRES, M.; AYRES, J. R. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, S. A. S. Y. **BioEstat 5.0** - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília, DF: CNPq, 2007. 290 p.

BEAVER, J. S.; ROSAS, J. C.; MYERS, J.; ACOSTA, J.; KELLY, J. D.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; MISANGU, R.; BOKOSI, J.; TEMPLE, S.; ARNAUD-SANTANA, E.; COYNE. D.P. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 82, p. 87–102, 2003.

BIANCO, L. F.; CARVALHO, J. F. C.; TERASSI, F. S.; SEINO, Y. W.; TREVIZAN, F. H.; ONOFRE, E.; NEUMAIER, N.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FARIAS, J. R. B.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Crescimento de soja geneticamente modificada com osgenes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob déficit hídrico. In: JORNADA ACADÊMICA EMBRAPA SOJA, 7., 2012, Londrina, PR. Londrina: Embrapa Soja, 2012.

BOUAZIZ, D.; PIRRELLO, J.; CHARFEDDINE, M.; HAMMAMI, A.; JBIR, R.; DHIEB, A.; BOUZAYEN, M.; GARGOURI-BOUZID, R. Overexpression of StDREB1 Transcription factor increases tolerance to salt in transgenic potato plants. **Molecular Biotechnology**, Burlington, v. 54, p. 803–817, 2013.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. p. 1158–1203.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MULLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFI, M.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information fou publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 4611-4622, 2009.

CENTURY, K.; REUBER, T. L.; RATCLIFFE, O. J. Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, p. 20–29, 2008.

CHEN, M.; WANG, Q.-Y.; CHENG, X.-G.; XU, Z.-S.; LI, L.-C.; YE, X.-G.; XIA, L.-Q; MA, Y.-Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** New York, v. 353, p. 299-305, 2007.

CRAMER, G. R. Abiotic stress & plant responses from the whole vine to the genes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Melbourne, v. 16, p. 86-93, 2010.

CUI, M.; ZHANG, W.; ZHANG Q.; XU, Z.; ZHU, Z.; DUAN F.; WU, R. Induced overexpression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, p. 1384-1391, 2011.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W. F. Genome-wide identification and testing of superior reference gene for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 5-17, 2005.

DA SILVA, V. F. R.; ARAÚJO, H. V. S.; COELHO, G. R. C.; DE FARIA, J. C. Transformação genética de feijão com construção gênica contendo o gene AtDREB2A visando tolerância à seca. In: SIMPÓSIO DE JOVENS TALENTOS, 6., 2012, Goiás. **Resumos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/941740/1/seriedocumentos275.pdf Acesso em 25. jan. 14.

DIMITROV, D. S.; SOWERS, A. E. Membrane electroporation: fast molecular exchange by electroosmosis. **Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes**, Amsterdam, v. 1022, p. 381-392, 1990.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought, high salt and cold responsive gene expression. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 751–763, 2003.

EGAWA, C.; KOBAYASHI, F.; ISHIBASHI, M.; NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.; TAKUMI, S. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. **Genes & Genetics Systems**, Shizuoka, v. 81, p. 77–91, 2006.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J. Quantitative RT-qPCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, New York, v. 26, p. 112-122, 1999.

GAO, S-Q.; CHEN, M.; XIA, L-Q.; XIU, H-J.; XU, Z-S.; LI, L-C.; ZHAO, C-P.; CHENG, X-G.; MA, Y-Z. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, p. 301–311, 2008.

HONG, S. M.; BAHN, S. C.; LYU, A.; JUNG, H. S.; AHN, J. H. Identification and testing of superior reference genes for starting poll of transcript normalization in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, p. 1694-1706, 2010.

HSIEH, T. S.; LEE, J. T.; YANG, P. T.; CHIU, L. H.; CHARNG, Y. Y.; WANG, Y. C.; CHAN, M. T. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-*repeat/dehydration response element binding factor1* gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1086–1094, 2002.

HUANG, B.; LIU, J. Y. Cloning and functional analysis of the novel gene GhDBP3 encoding a DRE-binding transcription factor from Gossypium hirsutum. **Biochimica et Biophysica** Acta. Gene Structure Expression, Amsterdam, v. 1759, p. 263–269, 2006.

INGHAM, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative real time PCR assay for determining transgene copy number in trans-formed plants. **Biotechniques**, New York, v. 31, p. 132–140, 2001.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, p. 141–153, 2006.

IWASAKI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Identification of a cisregulatory region of a gene in Arabidopsis thaliana whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 247, p. 391-398, 1995.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 193–195, 2002.

KAIN, S. R.; ADAMS, M.; KONDEPUDI, A.; YANG, T. T.; WARD, W. W.; KITTS, P. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. **BioTechniques,** London, v.19, n.4, p.650-655, 1995.

KIZIS, D.; PAGES, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the droughtresponsive element in an ABA-dependent pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 679–689, 2002.

KRYSAN, P. J.; YOUNG, J. C.; JESTER, P. J. MONSON, S.; COPENHAVER, G.; PREUSS, D.; SUSSMAN, M. R. Characterization of T-DNA Insertion Sites in *Arabidopsisthaliana* and the Implications for Saturation Mutagenesis. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, New Rochelle, v. 6, p. 163-174, 2002.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62 p. 4731-4748, 2011.

LEE, H. J.; KIM, J. S.; YOO, S. J.; KANG, E. Y.; HAN, S. H.; YANG, Y.; KIM, Y. C.; McSPADDEN, G. B.; KANG, H. Different roles of glycine-rich RNA-binding protein7 in plant defense against Pectobacterium carotovorum, Botrytis cinerea, and tobacco mosaic viruses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 60, p. 46–52, 2012.

LEE, P.; SLADEK, R.; GREENWOOD, C. M.; HUDSON, T. J. Control genes and variability:absence transcripts in diverse mammalian expression studies. **Genome Research**, Oxford, v. 12, p. 292-297, 2002.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**: water, radiation, salt and other stresses. New York: Academic Press, 1980. v. 2, p. 3-211.

LEWIN, B. Genes IX. Tradução de Andréa Queiroz Maranhão. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 912 p.

LI, X. P.; TIAN, A. G.; LUO, G. Z.; GONG, Z. Z.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 1355–1362, 2005.

LILLY, S. T.; DRUMMOND, R. S. M.; PEARSON, M. N.; MacDIARMID, R. M. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virusinfected *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 24, p. 294-304, 2011.

LIN, R. C.; PARK, H. J.; WANG, H. Y. Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating lightand ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. **Molecular Plant**. Oxford, v. 1, p. 42–57, 2008.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI. K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 391–406, 1998.

LU, M.; YING, S.; ZHANG, D.; SHI, Y.; SONG, Y.; WANG, T.; LI, Y. A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic Arabidopsis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 31, p. 1701–1711, 2012.

MASON, G.; PROVERO, P.; VAIRA, A. M.; ACCOTTO, G. P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative realtime PCR. **BMC Biotechnology**, London, v. 2, p. 20, 2002.

MATSUKURA, S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; TODAKA, D.; ITO, Y.; MARUYAMA, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 283, p. 185–196, 2010.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, p. 105–131, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, K. F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 88–95, 2009.

PAIVA, R. A. A.; FATIMA C. C. J.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; ENGELS, C.; RIO, A.; MARIN, S. R. R.; OLIVERA, M. C. N.; BENEVENTI, M. A.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMIER, N.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, Dordrecht, v.1, p.1, 2013.

POLIZEL, A. M.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; FARIAS, J. R. B.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUEZ, F. A.; STOLF-MOREIRA, R.; BENEVENT, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. AL. Molecular, anatomical and physilogical properties of a genecally modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drougth tolerance. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.10, p. 1-12, 2011.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN, L. S. P.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in Zea mays L. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 54–69, 2007.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y. Q.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in Zea mays L. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, p. 1042–1052, 2004.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, p. 62-66, 2003.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought responsive gene expression. **The Plant Cell,** Baltimore, v. 18, p. 1292–1309, 2006.

SELVEY, S.; THOMPSON, E. W.; MATTHAEI, K.; LEA, R. A.; IRVING, M. G.; GRIFFITHS, L. R. Beta-actin—an unsitable internal control for RT-PCR. **Molecular and Cell Probes**, London, v. 15, p. 307-311, 2001.

SHEN, Y. G.; ZHANG, W. K.; HE, S. J.; ZHANG, J. S.; LIU, Q.; CHEN, S. Y. An EREBP/AP2-type protein in Triticum aestivum was a DRE binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 923–930, 2003.

SINGH, S. P. Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 118-124, 1995.

SKIRYCZ, A.; INZE, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 21, p. 197-203, 2010.

SLOT, M.; WIRTH, C.; SCHUMACHER, J.; MOHREN, G. M. J.; SHIBISTOVA, O.; LLOYD, J.; ENSMINGER, I. Regeneration patterns in boreal Scots pine glades linked to cold-induced photoinhibition. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, p. 1139–1150. 2005.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEM, G., GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping gene as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 291-295, 1999.

TIAN, X. H.; LI, X. P.; ZHOU, H. L.; ZHANG, J. S.; GONG, Z. Z.; CHEN, S. Y. OsDREB4 genes in rice encode AP2 containing proteins that bind specifically to the dehydration responsive element. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, Victoria, v. 47, p. 467–476, 2005.

WENG, H.; PAN, A.; YANG, L.; ZHANG, C.; LIU, Z.; ZHANG, D. Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real time PCR assay with HMG I/Y as an endogenous reference gene. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 22, p. 289–300, 2004.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration-stress in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 238, p. 17–25, 1993.

YANG, W.; LIU, X. D.; CHI, X. J.; WU, C. A.; LI, Y. Z.; SONG, L. L.; LIU, X. M.; WANG, Y. F.; WANG, F. W.; ZHANG, C. A.; LIU, Y.; ZONG, J. M.; LI, H. Y. Dwarf apple *MbDREB1* enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. **Planta**, Berlin, v. 233, p. 219–229, 2011

YING, S.; ZHANG, D.; FU, J.; SHI, Y.; SONG, Y.; WANG, T.; LI, YU. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. **Planta**, Berlin, v. 235, p. 253–266, 2012.

YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F. **Cultura do feijoeiro no Brasil**: características da produção. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 75 p.

ZHANG, X. X.; TANG, Y. J.; MA, Q. B.; YANG, C. Y.; MU, Y. H.; SUO, H. C.; LUO, L. H.; NIAN, H. OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. 1-7, 2013.

ZHOU, M.; MA, J.; ZHAO, Y.; WEI, Y. B.; TANG Y.; WU, Y. Improvement of drought and salt tolerance in Arabidopsis and Lotus corniculatus by overexpression of a novel DREB transcription factor from Populus euphratica. **Gene**, Amsterdam, v. 506, p. 10–17, 2012.

4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERECIAL DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS DE *Arabidopsis* SUPEREXPRESSANDO O GENE *PvDREB6A* DE FEIJOEIRO

Resumo

Alta salinidade, baixas ou altas temperaturas, déficit de nutrientes, irradiação ultravioleta (UV), poluições químicas e a seca são caracterizados como estresses abióticos que afetam o crescimento e o desenvolvimento de plantas que se encontram nessas condições. Plantas são organismos sésseis e diferentemente dos animais, não podem se mover para escapar de situações que são desfavoráveis a elas. Mecanismos para regulação da expressão gênica mediada por fatores de transcrição (TFs) são essenciais para a sobrevivência das plantas em situações de estresse. Proteínas DREB (Dehvdration Responsive Element Binding) são TFs capazes de regular a expressão de genes da via de sinalização a estresses abióticos, e a superexpressão de genes DREB principalmente os do subgrupo A1 e A2 tem sido relacionados ao aumento da tolerância das plantas à seca, sal, calor e frio. Um gene DREB de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) pertencente ao subgrupo A6 denominado PvDREB6A, de acordo com análises filogenéticas, foi isolado, clonado e usado para o estudo de caracterização funcional. Dois eventos com cópia única e melhor expressão do gene PvDREB6A denominados Col-0/pFEC2.1 #1 e Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7, foram selecionados para estudar a expressão relativa de 20 genes descritos na literatura, que são regulados durante estresses abióticos, e estão relacionados com a aquisição de tolerância das plantas a estresses. Para isto a técnica de RT-qPCR foi utilizada. A quantificação dos genes na planta de arabidopsis do tipo selvagem em relação à planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1, e na planta mutante em relação a planta transgênica Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7, revelou que a expressão de 18 genes: AtDC1.2, AtUSP, AtKIN1, AtERF69, AtGolS3, AtMT2A, AtCAP160, AtNTR1.7, AtGPR7, AtPDC2, AtLTI78, AtCOR15a, AtCOR15b, AtCOR47, AtCOR413, AtLEA6, AtLEA9 e AtLEA14, relacionados a tolerância a seca, sal e frio foram up-regulated ou ativados devido à superexpressão do gene PvDREB6A de feijoeiro.

Palavras-chave: *PvDREB6A*. Arabidopsis. Mutante nulo. Superexpressão. Estresses abióticos. RT-qPCR.

Abstract

High salinity, low/high temperatures, low nutrient, ultraviolet irradiation (UV), chemical pollution and drought are characterized as abiotic stresses that affect the growth and development of plants under these conditions. Plants are sessile organisms and unlike animals, cannot move to escape situations that are unfavorable to them. Mechanisms for regulation of gene expression mediated by transcription factors (TFs), are essential for plant survival in stress conditions. DREB (Dehydration Responsive Element Binding) proteins are TFs able to regulate expression of genes in signalization pathways of abiotic stresses, and the overexpression of DREB genes mainly from A1 and A2 subgroup has been related to increase of drought, salt, heat and cold tolerance in transgenic plants. A DREB gene of common bean (Phaseolus vulgaris L.) that belongs to the A6 subgroup called PvDREB6A according to phylogenetic analysis was isolated, cloned and used for study and functional characterization. Two single copy events whit better expression of PvDREB6A called Col-0/pFEC2.1#1 and Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 were selected to study the relative expression of 20 genes described in the literature, which were regulated during abiotic stresses and are related to tolerance stresses in plants. For this, RT-qPCR technique was used. The quantification of gene expression in the arabidopsis wild type plant compared to the transgenic plant Col-0/pFEC2.1 #1, and in the mutant plant in relation to transgenic plant Salk_020767C/ pFEC2.1 #23.7 revealed that 18 genes, AtDC1.2, AtUSP, AtKIN1, AtERF69, AtGolS3, AtMT2A, AtCAP160, AtNTR1.7, AtGPR7, AtPDC2, AtLTI78, AtCOR15a, AtCOR15b, AtCOR47, AtCOR413, AtLEA6, AtLEA9 e AtLEA14, related to drought, salt and cold tolerance, were upregulated due to the overexpression of PvDREB6A from common bean.

Key-words: *PvDREB6A*. Arabidopsis. Knockout mutante. Overexpression. Abiotic stress. RT-qPCR.

4.1 Introdução

Alta salinidade, baixas ou altas temperaturas, déficit de nutrientes, irradiação ultravioleta (UV), poluições químicas e a seca são caracterizados como estresses abióticos que afetam o crescimento e o desenvolvimento de plantas que se encontram nessas condições. As plantas são organismos sésseis e diferentemente dos animais, não podem se mover para escapar de situações que são desfavoráveis a elas. Sua sobrevivência, portanto, vai depender de mecanismos rápidos de percepção, de sinalização e de adaptação que geralmente envolve a indução da síntese de hormônios como o ácido Abscísico (ABA) e também um ajuste no transcritoma, Proteoma e metaboloma com a indução da expressão de genes que vão melhorar a tolerância da planta a estresses abióticos (STAIGER; BROWN, 2013).

Como em todos os organismos multicelulares, todas as células das plantas são constituídas do mesmo DNA, no entanto, os genes podem ser expressos de maneira diferenciada. Isso ocorre porque as células são capazes de perceber estímulos externos e internos, regulando a expressão gênica tanto a nível espacial como temporal (SPITZ; FURLONG, 2012).

Os genes podem ser expressos na planta de forma constitutiva, quando estes estão envolvidos em processos para a manutenção do crescimento, do desenvolvimento e da sobrevivência da planta em condições normais, sendo ativados de acordo com a necessidade da célula; esses genes são chamados de *housekeeping*. A expressão desses genes não é alterada por estresse. Alguns genes, no entanto, são expressos somente quando a planta está sob estresse (WEAKE; WORKMAN, 2010).

Para a ativação da expressão gênica na planta sob estresse, mecanismos de sinalização através de moléculas como proteínas quinases que vão ser fosforiladas em cascata ou podem ser dependentes de Ca^{2+} (MAPKs ou CDPKs), espécies reativas de oxigênio (ROS) e o Ca^{2+} , são extremamente importantes sendo os responsáveis pela regulação direta de fatores de transcrição e promovem a ligação entre a percepção do estímulo externo e as mudanças na organização celular ou expressão gênica (TAJ et al., 2010). Existem diferenças na expressão de genes constitutivos em relação aos genes induzidos. Genes induzidos por estresse são rapidamente ativados, e o aumento dos níveis de transcritos pode ser detectado já nos primeiros segundos em que a planta está sob o estresse, como é o caso de fatores de transcrição. Quando o estímulo cessa, a planta volta a apresentar níveis basais de expressão destes genes (WEAKE; WORKMAN, 2010).

A transcrição é o processo pelo qual a partir de uma fita molde de DNA, uma molécula de RNA vai ser sintetizada. A maioria dos eventos regulatórios ocorre na iniciação da transcrição, quando a RNA polimerase se liga a um sítio promotor no DNA direcionada por fatores transcricionais. Por definição, um fator de transcrição (TF) é qualquer molécula necessária à iniciação da transcrição, que não é parte da RNA polimerase (LEWIN, 2009). Os TFs regulam a expressão gênica da maior parte dos genes em resposta a múltiplos estresses de uma maneira sincronizada e são caracterizados como alvos potenciais para aplicação em Biologia Molecular de plantas (RASHID et al., 2012). Um elemento regulatório *cis*, DRE (*Dehydration Responsive Element*), presente no promotor do gene *COR78/RD29A* que está envolvido na resposta à seca, alta salinidade e baixa temperatura foi identificado em um trabalho realizado por Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (1994). Fatores de transcrição *DREB (Dehydration Responsive Binding Element*) são capazes de se ligar a DRE para ativar a expressão de genes da via de sinalização a estresses.

A superexpressão de genes DREB, principalmente os do grupo A1 e A2, têm sido relacionadas à tolerância à seca, sal e frio em algumas espécies como arroz, soja, Populus e batata (CHEN et al., 2007; CUI et al., 2011; ZHOU et al., 2012a; BOUAZIZ et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Em um estudo realizado por Sakuma et al. (2006), a caracterização funcional do gene *AtDREB2A* de arabidopsis, demonstrou que este é capaz de regular a expressão gênica de vários outros genes que conferem tolerância a seca. Vários trabalhos que envolvem o estudo de genes *DREB* têm sido descritos na literatura, no entanto, pouca informação existe a cerca da estrutura, função e caracterização destes genes em feijoeiro.

No capítulo II deste trabalho, foi descrita a caracterização molecular do gene *PvDREB6A* de feijoeiro revelando a estrutura, função e localização. No capítulo III, através de superexpressão em arabidopsis, a caracterização funcional deste gene mostrou que este, é capaz de conferir tolerância à seca, sal e frio em plantas de arabidopsis transgênicas.

Baseado nessas informações, o objetivo deste trabalho foi a análise da expressão diferencial de 20 genes relacionados à tolerância a seca, sal e frio em plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Vegetal

As sementes de *Arabidopsis thaliana* do genótipo Columbia-0 usadas nos experimentos foram cedidas pelo Prof.º Dr. Daniel Scherer do Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP). As plantas transgênicas de arabidopsis do tipo selvagem superexpressando o gene *PvDREB6A* foram desenvolvidas, selecionadas e caracterizadas conforme descrito no capítulo 3 desta dissertação.

As sementes do mutante nocaute (Salk_020767C), onde o T-DNA foi inserido no gene *RAP2.4* ortólogo ao gene *PvDREB6A* de feijoeiro, foram compradas do banco de germoplasma do *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). As sementes da planta mutante foram multiplicadas e através da técnica de PCR foi confirmada a inserção do T-DNA, esse procedimento foi descrito no capítulo 3 desta dissertação. Plantas mutantes superexpressando o gene *PvDREB6A* foram desenvolvidas, selecionadas, caracterizadas conforme descrito no capítulo 3 desta dissertação, e foram usadas nos experimentos.

Sementes de *Arabidopsis thaliana* do genótipo Columbia-0, do mutante nocaute Salk_020767C e das plantas transgênicas foram colocadas sobre papel filtro com 10 mL de água e foram deixadas a 4°C por 48 horas para a quebra de dormência. Após esse período, elas foram cultivadas em sala de crescimento á 22°C \pm 2°C com intensidade luminosa de 120 µmol. m²s, humidade de 60% e fotoperíodo de 16 horas/Luz e 8 horas/escuro sob substrato (Basaplant:vermiculita média, 1:1, v:v).

4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi conduzida utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen[©]) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA total e a concentração nas amostras foram determinadas por absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm, e a integridade foi verificada em gel de agarose 1% corado com *GelRed*[®]. Um micrograma de RNA total de cada amostra foi então tratado com DNase I[®] (Fermentas[©]) segundo as instruções do fabricante.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis*® (Fermentas[®]) a partir de 100 ng de RNA total tratado com DNase, de acordo com as instruções do fabricante. O programa usado para a reação de síntese foi: 10 min a 25°C, 15 min a 50°C e 5 min a 85°C. O produto foi usado diretamente na reação para amplificação do fragmento.

4.2.3 Desenho dos primers

Vinte pares de primers foram desenhados para amplificação de 20 transcritos que são induzidos em plantas sob estresse abiótico. Sakuma et al. (2006) verificou a influência da expressão do gene *AtDREB2A* de Arabidopsis na regulação da expressão gênica de genes relacionados a tolerância a seca utilizando a análise de *microarray*. Com base nesse trabalho, 20 genes foram escolhidos e os primers foram desenhados de acordo com dados do genoma de *Arabidopsis thaliana*, os quais estão descritos na Tabela 5. A temperatura de *melting* (Tm) dos primers foi igual a 60°C, cada iniciador possuiu aproximadamente 20 pb e porcentagem de GC entre 50-60%. Após o desenho dos primers, com a ajuda do programa *NetPrimer* (PREMIER BIOSOFT, 2014) o próximo passo foi verificar a probabilidade de formação de estruturas secundárias pela interação dos primers entre si utilizando-se o programa *Primer3plus*.
Transcrito	Anotação funcional	Sequência 5'-3' (Forward/Reverse)	Amplicon (pb)
LTI78	Low temperature responsive protein 78	GGAAGACCTGGATACGGTGA GTGCTCTGTTTTGGCTCCTC	221
GolS3	Galactinol Synthase 3	TTACCCACCGGATAACCAAA	170
		AGAAGTTGCCGTCAGGAAGA	
CAP160	Low temperature	CTGATCCCACGCATAAAGGT	217
	responsive protein 75	TCCATCCCAGCTTTTGATTC	
LEA 9	Late Embryogenesis	GCAATCAAGAACAAGGCACA	164
	Abundant protein 9	TCAGTGCGAAGCCCTAAAGT	
CoR15A	Cold regulated protein	CAGAGTCGGCCAGAAAACTC	241
	15A	CGCAGCTTTCTCAGCTTCTT	
MT2A	Metallothionein 2A	GAAACTGCGGATGTGGATCT	169
		GCGTTGTTACTCTCCCCTGA	
CoR47	Cold regulated protein 47	GAGCGATGAAGAAGGTGAGG	160
		TACCGGGATGGTAGTGGAAA	
Gh11	Glucan-endo-1,3-beta glucosidase 11	CGATGTCGTGAGAGGTGCTA	201
		ATGCTCACCACCAATGACAA	201
NTR1.7	Nitrate transporter 1.7	CTCACAGCATCGTTTCCTCA AACCCCTTCCTCAGTTCGTT	198
PDC2	Pyruvate decarboxylase-2	GCTTCTGGCTATGGTCTTGC	165
		ATCGTTGAAAATCGGACCTG	
LEA14	Desiccation-related	CTCAAAGACGTGAACCGTGA	189
	protein LEA14 G	GGGAATATCAAGAGCCGTCA	
LEA6	Late Embryogenesis	bryogenesis CAACGACGGAGAAGAAAACG	168
	Abundant protein 6	GAGTAGGAGCATCGGTGGAG	
DC1 2	Pectin methylesterase	CCCTGCCTTATGTGTCCACT	186
20112	inhibitor family protein	CCCTGCCTTATGTGTCCACT ACGCAATCTTTGATGGCTTC	100
USP	Universal stress protein	ACTGGTTCGAGGCAGAAAGA	176
	family	TGGATCACAAAGCTGCTCAC	

Tabela 5 - Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR dos 20 genes selecionados neste estudo

			3
GPR7	Glycine-rich RNA- binding protein 7	TGAGTATCGGTGCTTCGTTG TCCTTGAAGGTGACGAATCC	156
KIN1	Stress induced protein KIN1	TGTCAGAGACCAACAAGAATGC CCGCATCCGATACACTCTTT	150
ERF69	Ethylene-Responsive transcription factor 69	CGACGGCGAATAAGAAGAAG CGCAGCGTTATCATAAGCAA	161
CoR15B	Cold-regulated protein 15b	AAAGTGACGGCAACATCCTC GCTTCCTCAGTCGCAGTTTC	160
CoR314	Cold regulated 314 inner membrane 1	GGTATCAACGAGGGTGGAGA AAGAATGCTGCCCATACACC	234
LCR69	Defensin-like protein 2	CATGATATTCGTCGCCACTG GAATCCACGGCAGTTACCTC	157

continuação

4.2.4 Escolha dos genes de referência que possuem maior estabilidade quando plantas de arabidopsis foram submetidas ao estresse salino

A análise da expressão dos genes de referência em plantas de arabidopsis do tipo selvagem, que foram submetidas ao estresse por alta salinidade, foi realizada conforme o que foi descrito no Capítulo 3 desta dissertação. Os genes com maior estabilidade de expressão em plantas de arabidopsis submetidas ao estresse salino foram o *AtPDF2* e *AtF-BOX*. Estes genes foram utilizados como normalizadores internos para a análise da expressão gênica por RT-qPCR.

4.2.5 Análise da expressão dos 20 genes envolvidos na tolerância à seca por RT-qPCR

Os eventos com cópia única e melhor expressão relativa do gene *PvDREB6A* (Col-0 + pFEC2.1 #1 e S020767C + pFEC2.1 #23.7) foram escolhidos para a análise de RT-qPCR da expressão relativa dos 20 genes relacionados a tolerância a seca (Tabela 5). Os primers foram desenhados conforme descrito em 4.2.3. Para a análise dos genes relacionados à tolerância, as amostras das plantas Col-0, Salk_020767C, do evento Col-0 + pFEC2.1 #1 e S020767C + pFEC2.1 #23.7, tiveram o RNA total extraído e a síntese

de cDNA foi realizada conforme 4.2.2. O cDNA das amostras (1µL cada) foram usados na reação de qPCR com o mesmo *kit* e nas mesmas condições descritas no item 4.2.4.

Após a corrida, os dados liberados pelo *software* do equipamento tiveram os valores de eficiência corrigidos para cada reação no programa *LinReg* PCR (v.11.0). Após a correção, os dados foram analisados no programa *REST* 2009 (QIAGEN©) para estimar o valor da expressão gênica relativa entre amostras. A análise de expressão relativa foi feita de forma a comparar: (1) Col-0/Salk_020767C, para revelar a expressão basal dos genes na planta do tipo selvagem em relação ao mutante; (2) Col-0 + pFEC2.1 #1/Col-0, para análise da expressão relativa dos genes da planta transgênica em relação ao tipo selvagem; (3) S020767C + pFEC2.1 #23.7/Salk_020767C, para a análise da expressão relativa dos genes na planta transgênica em relação ao mutante nulo.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Análise da expressão de 20 genes envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A*

Genes DREB são fatores de transcrição que geralmente são induzidos em plantas em condições de estresse, como seca, alta salinidade, altas/baixas temperaturas. Genes induzidos somente quando a planta está sob estresse, estão relacionados a mecanismos de resposta que vão gerar adaptação pela regulação de processos fisiológicos na planta. A função dos genes DREB na ativação da expressão de genes relacionados à aquisição de tolerância pela planta tem sido demonstrada por diversos trabalhos pela superexpressão dos mesmos. Sakuma et al. (2006), por meio de uma análise de *microarray*, identificaram 21 genes que foram ativados pela superexpressão do gene DREB2A de *Arabidopsis*, sendo que 12 deles são regulados em plantas sob déficit hídrico; dos 14 genes regulados diretamente pelo *AtDREB2A*, nove são proteínas LEA que protegem as macromoléculas como enzimas e lipídeos contra a desidratação.

A caracterização funcional de plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro foi descrita no capítulo 3 desta dissertação e revelou que as plantas foram tolerantes a seca, alta salinidade e baixa temperatura.

Para saber se superexpressão do gene *PvDREB6A* levou a alteração da expressão de genes relacionados a tolerância a estresses abióticos, plantas de arabidopsis do tipo selvagem (Col-0), mutante (Salk_020767C), dos eventos de transformação #1 da planta Col-0/pFEC2.1 e #23.7 da planta Salk_020767C/pFEC2.1, foram usadas para a análise da expressão de 20 genes já descritos por Sakuma et al (2006) que são induzidos sob estresse. Abaixo, foram descritas as mudanças nos níveis de expressão em cada grupo de genes.

4.3.1.1 Genes estruturais

Em plantas, a pectina metilesterase (PME) está envolvida em diversos processos fisiológicos e também na resposta a condições ambientais desfavoráveis. A parede celular constitui uma barreira física entre o ambiente e os componentes internos da célula, e modificações na sua estrutura estão associados a mecanismos de resposta da planta (VORWERK et al., 2004). Análises da expressão gênica de PMEs revelam que estes transcritos são regulados por seca, etileno e pelo ataque por insetos sugadores de pólen (LEE; LEE, 2003; DE PAEPE et al., 2004; MOSCATIELLO et al., 2006). O gene *AtDC1.2* é um inibidor de PMEs, e seu papel fisiológico consiste em modular a atividade de PMEs durante o crescimento e desenvolvimento da planta e durante situações de estresse (LIONETTI et al., 2007).

A análise da expressão basal do transcrito *Pectin methilesterase inhibitor AtDC1.2*, foi determinada em plantas do tipo selvagem em relação a plantas do tipo mutante sob condições normais de crescimento e revelou que o transcrito foi ativado nas plantas mutante, mas a ativação não atingiu níveis significativos (Figura 34).

Quando comparada a expressão em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1) (Figura 35), e a na planta mutante (Salk_020767C) em relação ao seu respectivo transgênico (Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7) (Figura 36), observou-se que o transcrito *AtDC1.2* foi ativado somente na planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1, com expressão duas vezes maior que seu controle.

A diminuição ou o aumento da atividade de PMEs foi observado através de silenciamento e superexpressão do gene em plantas, e mudanças associadas ao grau de metilesterificação de pectinas na parede celular têm sido correlacionadas à susceptibilidade da planta ao ataque de patógenos ou a estresses abióticos (MARTY et al., 1997; DOROKHOV et al., 2006; LIONETTI et al., 2007). A superexpressão de genes inibidores de PMEs de

arabidopsis *AtPEM1* e *AtPEM2* resultou na diminuição da atividade PMEs nas plantas transgênicas e consequentemente maior resistência a fungos necrotróficos (LIONETTI et al., 2007).

Conforme descrito acima, o acúmulo de transcritos inibidores de PMEs foi detectado em plantas em resposta a condições ambientais adversas. A planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1 superexpressando o gene *PvDREB6A* que é tolerante a estresses abióticos apresentou aumento da expressão do gene *AtDC1.2*, que atua na modificação da parede celular pela modulação da atividade das PMEs na planta transgênica.

4.3.1.2 Genes induzidos em plantas sob estresse

Alguns genes apresentam expressão constitutiva, ou seja, independente do estádio de desenvolvimento ou das condições ambientais, a sua expressão permanece inalterada. No entanto, existem alguns genes que são induzidos somente em situações de estresse. Quatro genes *AtLCR69*, *AtKIN1*, *AtUSP* e *AtERF69* que conhecidamente são induzidos em plantas sob estresse, foram quantificados nas plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* que são tolerantes a estresses abióticos.

A análise da expressão basal dos transcritos *AtLCR69*, *AtKIN1* e *AtUSP* na planta do tipo selvagem em relação ao mutante, demonstrou que na planta mutante os transcritos foram significativamente reprimidos. Em relação ao transcrito *AtERF69*, a análise da expressão basal revelou que na planta mutante este transcrito foi ativado, no entanto, a ativação não atingiu níveis significativos (Figura 34).

Quando comparada a expressão em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1), foi possível determinar que o transcrito *AtLCR69* foi reprimido nas plantas transgênicas, no entanto, a repressão não atingiu níveis significativos. Em relação aos genes *AtKIN1* e *AtUSP*, ambos foram significativamente ativados nas plantas transgênicas, com expressão maior que duas vezes em relação a plantas do tipo selvagem. Em relação ao gene *AtERF69*, houve a ativação da expressão gênica, com aumento do número de transcritos em quase cinco vezes nas plantas transgênicas em relação ao tipo selvagem (Figura 35).

Foram comparados também os níveis de expressão gênica dos quatro genes em plantas mutante em relação a plantas transgênicas Salk_020767C/pFEC2.1 evento #23.7. A expressão relativa dos genes *AtLCR69, AtUSP* e *AtERF69* foi quase dez vezes maior na planta transgênica Salk_020767C/ pFEC2.1 #23.7 em relação a planta mutante. Em relação ao gene *AtKIN1*, houve um aumento do número de transcritos na planta transgênica que foi quase cem vezes maior em relação a planta mutante (Figura 36).

Em relação à função, o gene *AtLCR69* codifica para um tipo de proteína que pertence ao grupo das defensinas que são pequenas proteínas catiônicas ricas em cisteína que possuem uma estrutura tridimensional estabilizada por quatro pontes dissulfito (GARCIA-OLMEDO et al., 1998; THOMMA et al., 2002). Defensinas em plantas pertencem a uma grande família de genes que são amplamente distribuídas em todos os organismos vivos (invertebrados, plantas, mamíferos) e estão envolvidos na resposta imune de defesa contra o ataque de patógenos (GANZ, 2003). Foi demostrado também que as defensinas poderiam estar envolvidas em processos que levam a tolerância ao zinco em plantas (MIROUZE et al., 2006). Estresses por metais pesados como o zinco são caracterizados como estresses abióticos, e elevados níveis desses metais são tóxicos para organismos vivos.

Em relação à função do gene *AtKIN1*, Kurkela e Franck (1990) fizeram a clonagem e a caracterização do gene *AtKIN1*, que codifica para uma proteína "*antifreeze*", mostrando que ele é induzido em condições de estresses abióticos como frio, déficit hídrico e ABA. O gene KIN1 assim como o Rd29A possui tanto o elemento regulatório ABRE, quanto o elemento regulatório DRE sendo ativado pela via ABA-independente e ABA-dependente (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Wang et al. (1995), isolaram os promotores de dois genes de Arabidopsis *AtKIN1* e *AtCOR6.6* que respondem a baixas temperaturas e ao ABA, respectivamente, fusionaram seus promotores ao gene beta-glucoronidase (GUS) e analisaram a expressão do gene em células de tabaco transgênica. A análise da expressão gênica revelou a indução da expressão dos genes *AtKIN1* e *AtCOR6.6* em plantas submetidas a baixas temperaturas, ABA, estresse osmótico e desidratação.

Outro gene quantificado em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* foi o *AtUSP*. Genes que codificam para proteínas com o domínio conservado *Universal Stress Protein* (USP) estão presentes em plantas e possuem a capacidade de responder a condições ambientais adversas. Deficiência de nutrientes, seca, alta salinidade, temperaturas extremas e exposição a compostos químicos tóxicos são exemplos de condições que induzem a expressão desses genes (KERK et al., 2003; KVINT et al., 2003). Genes USP foram identificados na tolerância à seca em algodão (MAQBOOL et al., 2009) e feijão-de-corda (COETZER et al.,

2010) e na resposta ao sal em cevada, mas nesse caso, o aumento do acúmulo de transcritos não foi associado a tolerância (LI et al., 2010). Proteínas USP podem aumentar a taxa de sobrevivência da célula durante um período prolongado de exposição a agentes causadores de estresse e elas podem proporcionar estratégias para "resistência ao estresse" (ARAVIND et al., 2002).

Loukehaich et al. (2012) fizeram a caracterização funcional do gene *SpUSP* de tomate selvagem (*Solanum pennellii*), e a superexpressão desse gene em plantas de tomate levou ao aumento da tolerância a seca; a análise do perfil transcricional das plantas transgênicas por *microarray* demonstrou a ativação de genes relacionados a vias fotossintéticas que podem estar relacionados a manutenção das mesmas.

O outro gene induzido por estresse analisado em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* foi o *AtERF69*, que é fator de transcrição da família AP2/ERF que está envolvido na regulação da expressão de genes em plantas sob estresse.

Na superfamília de fatores de transcrição (TFs) AP2/ERF, TFs AP2 atuam principalmente na regulação de processos relacionados ao desenvolvimento, enquanto que proteínas ERF atuam principalmente em processos regulatórios gerados por estímulos ambientais e hormônios (XU et al., 2011). Proteínas ERF foram originalmente isoladas como TFs que se ligam a regiões promotoras de genes responsivos a estresses. Genes ERF são induzidos por estresses abióticos e bióticos, incluindo a infecção por patógenos, estresse salino, osmótico, seca, hipóxia, altas/baixas temperaturas e hormônios relacionados a estresses como etileno, ácido jasmônico e ABA (LICAUSI; OHME-TAKAGI; PERATA, 2013).

A superexpressão do gene *OsERF1* de arroz (*Oryza sativa*), ativou a expressão de genes responsivos ao etileno e afetou o crescimento e desenvolvimento de plantas de arabidopsis transgênicas (HU et al., 2008). A superexpressão do gene *BnERF4* de *Brassica napus* aumentou a tolerância ao sal e a seca em plantas de Arabidopsis transgênicas (YEAN et al., 2010).

Uma análise em plantas de Arabidopsis superexpressando o gene *AtDREB1A*, revelou que 12 genes tiveram a expressão pelo menos duas vezes maior em relação ao tipo selvagem, sendo que seis deles são genes induzidos por estresse, Rd29A, KIN1, COR6.6/KIN2, COR15a, COR47 e ERD10 (LIU et al., 1998). A análise por *microarray* também revelou que muitos desses genes induzidos por estresse possuem o motivo DRE ou motivos relacionados ao DRE em suas regiões promotoras (MARUYAMA et al., 2004). Como fatores de

transcrição DREB são capazes de se ligar a elementos DRE eles são responsáveis pela regulação da expressão desses genes induzidos por estresse.

Plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro, apresentaram um aumento na quantidade de transcritos dos genes *AtLCR69*, *AtKIN1*, *AtUSP* e *AtERF69* que são induzidos em plantas sob estresse. O acúmulo desses transcritos em plantas tem sido relacionado ao aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos.

4.3.1.3 Genes que combatem o estresse oxidativo

Metalotioninas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, possuem a capacidade de se ligar a metais e são classificadas em 3 grupos de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína na molécula (ROBINSON et al., 1993; KLAASSEN et al., 1999). Em plantas, MTs estão envolvidas na resposta a tolerância a metais pesados (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002) e outras condições de estresses abióticos, como alta salinidade (WU et al., 2005) e seca (YANG et al., 2009). Muitos estudos revelam que MTs atuam na proteção contra o estresse oxidativo imposto por condições ambientais adversas (WONG et al., 2004; XUE et al., 2009; SAMARDZIC et al., 2010).

Sabendo que as MTs atuam na proteção contra o estresse oxidativo, foi quantificada a expressão do gene *AtMT2A* em plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A*. O nível basal da expressão do gene *AtMT2A* em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação à planta mutante (Salk_020767C) foi quantificada; a expressão basal do gene *AtMT2A* mostrou que em plantas do tipo mutante o gene foi reprimido, no entanto, não houve diferença significativa em relação a plantas do tipo selvagem (Figura 34).

A quantificação relativa de transcritos AtMT2A em plantas transgênicas superexpressando o gene PvDREB6A também foi determinada. Quando foi comparada a expressão do gene AtMT2A em plantas do tipo selvagem em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1) observou que a sua expressão foi mais que 2 vezes maior em relação a plantas do tipo selvagem (Figura 35). Já a comparação entre o mutante e seu respectivo transgênico (Salk_02076C/pFEC2.1 #23.7), revelou um aumento de quase 10 vezes na quantidade de transcritos AtMT2A na planta transgênica em relação a planta mutante (Figura 36). Em ambas as comparações à ativação do gene foram estatisticamente significativas com p< 0,05.

A superexpressão do gene *NsMT2A* da flor-de-lótus em plantas de arabidopsis, conferiu tolerância ao estresse oxidativo induzido por metil viologênio (Mv) e também ao estresse salino em plantas transgênicas (ZHOU et al., 2012b).

A expressão do gene *AtMT2A* foi ativada em um nível significativo em plantas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro. O acúmulo do transcrito *AtMT2A* está relacionado a tolerância das plantas transgênicas ao estresse salino e também ao dano oxidativo, mostrando que a plantas transgênicas são capazes de tolerar essas condições.

4.3.1.4 Genes envolvidos no metabolismo de carboidratos

Foram quantificadas a expressão de dois genes envolvidos no metabolismo de carboidratos o *AtGolS3* e *AtGH11* nas plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A*. Carboidratos apresentam um importante papel como reguladores osmóticos em plantas sob estresse, contribuindo para a homeostase celular.

Em soja, milho e arabidopsis, os açúcares Rafinose (Rf) e Galactinol Sintase (GolS) são acumulados em sementes durante a fase de maturação e possuem um importante papel na tolerância a desidratação (BLACKMAN et al., 1992; BRENAC et al., 1997; TAJI et al., 2002). Em plantas de arabidopsis sob seca, alta salinidade e frio foi detectado o acúmulo tanto de Rf quanto de GolS em plantas sob estresse; no entanto, em plantas sob condições normais de crescimento não foi detectado o acúmulo desses açúcares, sugerindo que eles estão envolvidos na tolerância da planta a estresses abióticos (TAJI et al., 2002). A GolS catalisa a primeira etapa da biossíntese de rafinose a partir de UDP-galactose. Em arabidopsis, três genes da GolS que respondem a estresses abióticos foram identificados; *AtGolS1* e *AtGolS2* foram induzidos em plantas sob seca e alta salinidade, enquanto, o *AtGolS3* foi induzido apenas em plantas sob estresse por frio (TAJI et al., 2002).

O nível basal da expressão do gene *AtGolS3* foi determinado pela quantificação de transcritos por RT-qPCR em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação a planta mutante (Salk_020767C). Em condições normais de desenvolvimento, a expressão basal do gene GolS3 em plantas do tipo mutante foi ativado, no entanto, não houve diferença significativa em relação a planta do tipo selvagem (Figura 34).

A quantificação relativa de transcritos *AtGolS3* em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* também foi determinada. Quando foi comparada a expressão do gene GolS3 em plantas do tipo selvagem em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1) observou que a sua expressão foi mais que sete vezes maior em relação a plantas do tipo selvagem (Figura 35). Já a comparação entre o mutante e seu respectivo transgênico (Salk_02076C/pFEC2.1 #23.7), revelou um aumento de quase dez vezes na quantidade de transcritos GolS3 na planta transgênica em relação a planta mutante (Figura 36).

Outro gene quantificado relacionado ao metabolismo de carboidratos foi o *AtGH11*. Glicosil hidrolases (Ghs) são enzimas que hidrolisam a ligação entre carboidratos e uma segunda molécula, que pode ser outro carboidrato, uma proteína ou um lipídeo (CANTAREL et al., 2009). Várias funções foram atribuídas as Ghs e incluem a defesa contra patógenos através do ataque aos carboidratos da parede da membrana celular de micróbios, a mobilização energética de reservas pela degradação de amido, e a sinalização hormonal através da clivagem e inativação do glicosil a partir de hormônios conjugados entre outros processos (MINIC, 2008).

A expressão basal do transcrito *AtGh11* foi determinada através da expressão relativa por RT-qPCR. Plantas de arabidopsis do tipo selvagem (Col-0) e do tipo mutante (Salk_020767C) foram usadas na análise da expressão relativa do gene *AtGh11* e observou-se que o gene foi reprimido na planta mutante, no entanto, a repressão não foi significativa (Figura 34).

Na análise da expressão do gene *AtGh11* nas plantas transgênicas, foi comparada a expressão do gene na planta do tipo selvagem em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1), e na planta mutante em relação ao seu respectivo transgênico (Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7). Os resultados em relação à expressão relativa deste gene nas plantas transgênicas foram contrastantes. Em plantas Col-0/pFEC2.1 #1, o gene *AtGh11* foi reprimido (Figura 35), enquanto que, em plantas Salk_020767C/pFEC 2.1 #23.7, o gene foi ativado (Figura 36). No entanto, o nível de expressão não foi significativo para ambos os eventos de transformação.

Em plantas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* (Col-0/pFEC2.1 e Salk_020767C/pFEC2.1), foi detectado um aumento significativo nos níveis de transcritos *AtGolS3*. Assim como a prolina, a GolS possui um papel osmoprotetor em plantas sob estresse, por isso, o aumento dos níveis desses transcritos tem sido relacionado a tolerância ao estresse.

Em relação ao gene *AtGH11*, aparentemente nem o incremento na expressão do fator de transcrição *PvDREB6A*, nem a sua complementação em plantas mutantes levam à indução deste gene, sugerindo que o mesmo não seja regulado por este TF.

4.3.1.5 Genes envolvidos na tradução de proteínas

Em plantas sob estresse ocorre um aumento na síntese proteica, sendo assim, genes envolvidos na tradução de proteínas são induzidos nessas condições. Três genes que de alguma forma estão relacionados à tradução de proteínas, como o *AtCAP160* que participa como proteína acessória na montagem dos ribossomos, o *AtNTR1.7* que é um transportador de nitrato e o *AtGPR7* que codifica para uma proteína de ligação ao RNA.

A proteína *Cold Aclimatation Protein* 160 (CAP160) se acumula em tecidos foliares expostos a baixa temperatura (5°C), ou durante o estresse por seca (GUY; HASKELL, 1987; GUY; HASKELL, 1988; GUY et al., 1992). Essa proteína possui um papel importante em plantas submetidas ao frio, e há evidências de que ela participe como proteína acessória na montagem dos ribossomos ou ajude a acelerar o processo de tradução de proteínas em plantas aclimatadas para o frio (GUY et al., 1985).

A expressão do gene *AtCAP160* foi significativamente reprimida em plantas do tipo mutante (Salk_020767C) quando comparada a expressão em relação a plantas do tipo selvagem (Col-0) em condições normais de crescimento (Figura 34).

Em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro, a expressão do transcrito CAP160 foi ativada em níveis significativos. A expressão relativa do gene CAP160 na planta Col-0/pFEC2.1 #1 em relação ao tipo selvagem foi quase cinco vezes maior (Figura 35). Na planta Salk_020767C #23.7 o nível de transcritos foi dez vezes maior em relação à planta mutante (Figura 36).

Genes que codificam para transportadores de nitrato (NTRs) têm sido identificados em plantas superiores e possuem diversos papéis no balanço de nitrato na planta (TSAY et al., 2007). Em arabidopsis, NTR1 e NTR2 compreendem famílias de transportadores de nitrato acoplados a prótons (TSAY et al., 1993; LITTLE et al., 2005). O gene *AtNTR1.7* é responsável pelo transporte de nitrato pelo floema, permitindo a remobilização do nitrogênio de folhas mais velhas para folhas mais novas (FAN et al., 2009). Hu et al. (2006) fizeram a

caracterização funcional do gene *OsNTR1.3* de arroz (*Oryza sativa*) e a análise da expressão gênica revelou que este gene é induzido pela seca.

A expressão basal do transcrito *Nitrate transporter 1.7 AtNTR1.7*, foi avaliada na planta do tipo selvagem (Col-0) em relação ao mutante (Salk_020767C) revelando que o transcrito foi significativamente reprimido nas plantas mutantes (Figura 34).

A expressão relativa do gene *AtNTR1.7* em plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro foi determinada por RT-qPCR. A comparação da expressão do gene *AtNTR1.7* em plantas do tipo selvagem em relação ao transgênico Col-0/pFEC2.1 #1 mostrou que houve a ativação da expressão do gene em um nível significativo (Figura 35). A expressão relativa do gene *AtNTR1.7* nas plantas mutante em relação ao transgênico (Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7) foi ativada, no entanto, a ativação não foi significativa (Figura 36).

Com o aumento do número de transportadores NTRs na célula, mais nitrato será assimilado e direcionado para o vacúolo onde pode ser estocado ou reduzido a nitrito pela enzima citosólica nitrato redutase. O nitrito é translocado para o cloroplasto onde será reduzido a amônio pela enzima nitrito redutase; o amônio por sua vez, será incorporado aos aminoácidos (BUCHANNAN; GRUISSEM; JONES, 2002). A desidratação causada devido ao estresse por seca, sal ou frio, leva ao aumento da transcrição de genes relacionados à tolerância. Guy (1985) relata que há um aumento da tradução na célula em plantas aclimatadas para o frio. O aumento da síntese proteica requer maior quantidade de aminoácidos que dependem do amônio para serem sintetizados.

Em relação ao gene *AtGPR7*, ele codifica para uma proteína de ligação ao RNA, com um único motivo de reconhecimento a molécula de RNA na porção N-terminal e um domínio rico em glicina na porção C-terminal (LOHR et al., 2014). O gene *AtGPR7* responde ao estresse por frio e ao estresse oxidativo (SCHONING et al., 2008; SCHMIDT et al., 2010). Esse gene também participa da resposta na defesa contra o ataque de patógenos (LEE et al., 2012).

A expressão basal do gene *Glycine-Rich RNA-Binding Protein* 7 (GPR7) foi determinada através de RT-qPCR. A análise da expressão em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação à planta mutante (Salk_020767C) demonstrou que o gene foi significativamente reprimido na planta mutante (Figura 34).

Foram comparados os níveis de expressão do gene *AtGPR7* nas plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro. A análise da expressão do gene na planta do tipo selvagem em relação à planta transgênica Col-0/pFEC2.1 #1 revelou que houve a

ativação da expressão do gene cerca de duas vezes mais na planta transgênica (Figura 35). A análise da expressão do gene *AtGPR7* na planta mutante em relação a planta transgênica Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 mostrou que o gene foi aproximadamente 15 vezes mais expresso na planta transgênica (Figura 36). Em ambos os casos a ativação da expressão gene foi significativa.

Em plantas superiores, proteínas de ligação ao RNA apresentam um papel importante em processos regulatórios como na transição e no desenvolvimento floral ou na tolerância a estresses abióticos e bióticos (SCHOMBURG et al., 2001; GONG et al., 2002; CHENG et al., 2003).

Diante disto e somados aos resultados descritos no capítulo anterior, presume-se que em plantas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A*, a indução da expressão dos genes *AtCAP160*, *AtNTR1.7* e *AtGPR7* não sejam capazes de conferir tolerância a estresses abióticos à planta, mas que provavelmente o aumento da quantidade dessas proteínas na célula trabalhem de forma conjunta a toda uma rede de proteínas envolvidas neste processo.

4.3.1.6 Genes envolvidos no metabolismo celular

Um gene envolvido no metabolismo celular que codifica para a piruvato descarboxilase, *AtPDC2* foi quantificado em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A*. A piruvato descarboxilase pode proporcionar uma via glicolítica alternativa em plantas submetidas a estresses.

Estresses abióticos podem romper a atividade respiratória e isso tem sido proposto como uma compensação para a função mitocondrial prejudicada, convertendo o metabolismo aeróbio para a fermentação anaeróbia (LEVITT, 1980). Kursteiner et al. (2003) relataram que a expressão do gene Piruvato Descarboxilase 1 (PDC1) de arabidopsis é ativada durante estresse por excesso de água nas plantas levando a anoxia. Nessas condições as plantas deixam de utilizar a via respiratória e passam a realizar a fermentação etanólica como principal via glicolítica. Na primeira etapa, o piruvato é o substrato para a ação da Piruvato Descarboxilase (PDC), uma molécula de CO_2 e o acetaldeído serão liberados. Dados preliminares da expressão de genes PDC de arabidopsis durante estresses abióticos têm sido descritos e a via da fermentação etanólica tem sido parte da resposta a estresses ambientais (DOLFERUS et al., 1997).

O nível basal da expressão do gene *AtPDC2* foi determinado pela quantificação de transcritos por RT-qPCR em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação a planta mutante (Salk_020767C). Em condições normais de desenvolvimento a expressão basal do gene *AtPDC2* em plantas mutante foi significativamente reprimida (Figura 34).

A quantificação relativa de transcritos PDC2 em plantas transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* também foi determinada. Quando foi comparada a expressão do gene *AtPDC2* em plantas do tipo selvagem em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1) observou que a sua expressão foi maior do que cinco vezes em relação a plantas do tipo selvagem (Figura 35). Já a comparação entre o mutante e seu respectivo transgênico (Salk_02076C/pFEC2.1 #23.7) revelou um aumento de quase dez vezes na quantidade de transcritos PDC2 na planta transgênica em relação a planta mutante (Figura 36). Em ambas as comparações à ativação do gene foram estatisticamente significativas com p<0,05.

O aumento dos níveis de transcritos PDC tem sido descrito em plantas de Arabidopsis submetidas ao tratamento por frio e manitol (DOLFEREUS et al., 1997; CONLEY et al., 1999) e por frio em arroz e milho (CHRISTIE et al., 1991).

A ativação da expressão do gene *AtPDC2* em plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A* de feijoeiro, é muito importante porque pode proporcionar às plantas uma via glicolítica alternativa (fermentação) durante situações de estresses abióticos.

4.3.1.7 Genes Dehidrinas

Genes Dehidrinas (DHs) são pertencentes ao grupo II de genes LEA, e desempenham um papel importante na estabilização de membrana durante a desidratação induzida pelo congelamento das plantas em situações de estresse, elas possuem um efeito crioprotetor e atividade *antifreeze* funcionando como possíveis osmorreguladores ou removedores de espécies reativas de oxigênio (CLOSE, 1996; DANYLUK et al., 1998; NYLANDER et al., 2001; HARA et al., 2003; BRAVO et al., 2006). Alguns estudos demostram que existe uma correlação positiva com o aumento da expressão de genes DHs ou o acúmulo dessas proteínas, na tolerância da planta ao estresse. Pelah et al. (1997) encontraram uma correlação entre a tolerância a seca e o acúmulo de DHs em *Populus popularis*. Similarmente, Labhilili et al. (1995) correlacionaram o acúmulo de transcritos DHs com o aumento a tolerância a seca e duas cultivares de trigo.

A expressão gênica de cinco DHs sendo elas: *AtLT178, AtCOR15a, AtCOR15b, AtCOR47* e *AtCOR413*, foi quantificada em plantas de Arabidopsis transgênicas superexpressando o gene *PvDREB6A*.

A análise da expressão basal do transcrito *Low-Temperature Induced 78 AtLTI78*, foi avaliada na planta do tipo selvagem (Col-0) em relação ao mutante (Salk_020767C) em plantas sob condições normais de crescimento. Nessas condições, o transcrito foi significativamente reprimido nas plantas mutante (Figura 34).

Quando comparada a expressão em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1) (Figura 35), e a na planta mutante (Salk_020767C) em relação ao seu respectivo transgênico (Salk_020767C/pFEC2.1) (Figura 36), observou-se que o transcrito *AtLTI78* foi ativado, com expressão aproximadamente cinco vezes (Col-0/pFEC2.1) e cem vezes (Salk_020767C/pFEC2.1) maior nas plantas transgênicas.

As proteínas da família LT geralmente são induzidas em plantas submetidas a baixas temperaturas, protegendo-as contra a desidratação. Para correlacionar o aumento da tolerância ao frio com a presença de proteínas específicas ao estresse, Mäntylä et al. (1995), e colaboradores determinaram o acúmulo de LTI78 em plantas de Arabidopsis submetidas a estresses abióticos. A proteína LTI78 foi acumulada em todos os genótipos em resposta a baixas temperaturas e seca, e esteve sempre presente quando as plantas foram tolerantes ao congelamento, correlacionando o aumento dos seus níveis a tolerância.

Em relação aos genes *Cold-Regulated AtCOR15a*, *AtCOR15b*, *AtCOR47 e AtCOR413*, a análise da expressão basal dos transcritos comparando a expressão destes genes na planta do tipo selvagem (Col-0) em relação ao mutante (Salk_020767C), revelou que os genes *AtCOR15a*, *AtCOR15b*, *AtCOR47* foram significativamente reprimidos nas plantas mutante, enquanto que, o gene *AtCOR413*, foi ativado só que esta ativação não atingiu níveis significativos (Figura 34).

Quando comparada a expressão em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1), observou-se que os transcritos *AtCOR15a*, *AtCOR15b*, *AtCOR47 e AtCOR413*, foram significativamente ativados, com expressão aproximadamente duas vezes maior para os genes *AtCOR15a* e *AtCOR47* e dez vezes maior para os genes *AtCOR15b* e *AtCOR413* em plantas Col-0/pFEC2.1 (Figura 35).

Quando comparada a expressão dos genes AtCOR15a, AtCOR15b, AtCOR47 e AtCOR413 na planta mutante (Salk_020767C) em relação a planta transgênica

(Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7), observou-se que todos os genes foram significativamente ativados, com expressão quase dez vezes maior para os genes *AtCOR15a*, *AtCOR15b* e *AtCOR47* e de quase cem vezes maior para o gene *AtCOR413* em plantas Salk_020767C/pFEC2.1 (Figura 36).

Em arabidopsis, alguns genes têm sido descritos como regulados pelo frio como *AtKIN1* (KURKELA; FRANCK, 1990), *AtKIN2* (KURKELA; FRANCK, 1992), *AtCOR15a* (LIN; THOMASHOW, 1992), *AtLT178* e *AtLT165* (NORDIN; VAHALA; PALVA, 1993), *AtCOR47* (GILMOUR; ARTUR; THOMASHOW, 1992) e *AtRAB18* (LANG; PALVA, 1992). Genes *COR* possuem um papel importante na tolerância das plantas ao congelamento e o aumento da expressão desses genes tem sido relacionado com a aquisição de tolerância em várias cultivares de alfafa (MOHAPATRA et al., 1989). Em arabidopsis, os genes COR 6.6, COR15a, COR47 e COR78 são os que têm maior indução em plantas aclimatadas pelo frio (THOMASHOW, 1990; THOMASHOW, 1993), e os polipeptídeos COR apresentam similaridades com proteínas crioprotetoras que protegem os cloroplastos e membranas dos tilacóides contra a desestabilização causada pelo congelamento induzido *in vitro* (VOLGER; HEBER, 1975; HINCHA et al., 1996).

Seis genes DHs foram caracterizadas em arabidopsis, RAB18 (LANG et al., 1989; LANG; PALVA, 1992), LTI29/ERD10 (KIYOSUE et al., 1994; WELIN et al., 1994), LTI30/DHNXERO2 (WELIN et al., 1994; ROUSE et al., 1996), COR47 (WELIN et al., 1995), ERD14 (KIYOSUE et al., 1994) e DHNXERO (ROUSE et al., 1992). Os genes *Low temperature Induced 29* (LTI29) e *Cold-regulated* 47 (COR47) se acumulam primariamente na resposta ao frio, mas também no estresse por Ácido abscísico (ABA) e sal (NYLANDER et al., 2001).

A superexpressão dos genes RAB18 e COR47 da planta da ressureição (*Craterostigma plantaginerum*) simultaneamente em arabidopsis melhorou a tolerância das plantas ao frio, mas não a seca (PUHAKAINEN et al., 2004).

O gene *COR15a* de arabidopsis codifica um polipeptídeo de 15kDa, que foi localizado no estroma do cloroplasto (LIN; THOMASHOW, 1992). A superexpressão deste gene em arabidopsis afetou a tolerância ao frio em protoplastos congelados *in vitro*, aumentando a taxa de sobrevivência em plantas submetidas de -2°C a -8°C; o aumento na sobrevida nas células foi uma manifestação de um aumento na crioestabilidade da membrana plasmática (ARTUS et al., 1996).

Kathy, Wilhelm e Thomashow (1993) descreveram um gene homólogo ao *AtCOR15a* que foi denominado *AtCOR15b* e apresenta a sequência de nucleotídeos com alto grau de

identidade e a sequência de aminoácidos deduzidos com polipeptídios muito similares. Apesar dos dois genes serem homólogos *AtCOR15a* e *AtCOR15b* são diferentemente regulados: ambos os transcritos se acumulam em resposta a baixas temperaturas e ABA, mas somente *AtCOR15A* se acumula em altos níveis em resposta a seca.

Em arabidopsis, o nível de expressão do gene *Cold-Regulated* 413 (COR413) foi quantificado e revelou que estes transcritos são mais abundante em folhas aclimatadas pelo frio, e através da localização subcelular foi determinado que proteínas COR413 estão localizadas na membrana do tilacóide nos cloroplastos (BRETON et al., 2003). Proteínas COR413 funcionam como transportadores e os metabólitos que são transportados por eles podem possuir papéis importantes na tolerância ao frio (STITT; HURRY, 2002; GUY et al., 2008). Alternativamente, proteínas COR413 podem atuar como estabilizadores de membrana em condições de estresses abióticos, e esta atividade tem sido proposta porque essas proteínas são altamente hidrofílicas (DANYLUK et al., 2008).

Foi detectado o aumento dos níveis de transcritos *AtLTI78*, *AtCOR15a*, *AtCOR15b*, *AtCOR47* e *AtCOR413* nas plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A*. De acordo com os dados obtidos no capítulo 3 desta dissertação, as plantas transgênicas apresentaram maior tolerância a estresses abióticos e a análise por RT-qPCR dos genes DHs que possuem uma correlação positiva pelo seu acumulo em plantas sob estresse abióticos, revelou que as plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A* possuem maior tolerância a desidratação que pode ser causada pela seca, sal, mas principalmente causada por estresse a baixas temperaturas.

4.3.1.8 Genes LEA

Genes LEA codificam proteínas que podem proteger as atividades enzimáticas na célula, que interagem com açúcares impedindo a agregação entre proteínas, e que podem atuar como chaperonas moleculares (GOYAL et al., 2005; GRELET et al., 2005; REYES et al., 2005). Proteínas LEA *Late Embriogenesis Abundant* foram identificadas primeiramente em sementes de algodão (*Gossypium hirsicum*), e posteriormente em sementes de outras espécies, e são expressas durante o período de germinação das sementes protegendo contra os efeitos da desidratação (HUGUES; GALAU, 1991). Estas proteínas também foram detectadas em órgãos vegetativos, principalmente em plantas submetidas a estresses abióticos que podem

levar a um déficit de água na célula (DURE; GREEN; GALAU, 1981; TUNACLIFFE; WISE, 2007; HUNDERTMARK; HINCHA, 2008; TUNACLIFFE et al., 2010). Nessas condições proteínas altamente hidrofílicas, como as proteínas LEA, são produzidas e podem alterar sua estrutura tridimensional (MOULLINON et al., 2006; BATTAGLIA et al., 2008).

Devido a sua importância na proteção contra os efeitos da desidratação, a expressão de três genes *LEA*, um do grupo 6, um do grupo 9 e um do grupo 14 foram quantificadas em plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDREB6A*.

O nível basal da expressão dos genes *AtLEA6, AtLEA9 e AtLEA14* foram determinado pela quantificação de transcritos por RT-qPCR em plantas do tipo selvagem (Col-0) em relação a planta mutante (Salk_020767C). Em condições normais de desenvolvimento a expressão basal dos genes *AtLEA6, AtLEA9 e AtLEA14* em plantas mutante foram significativamente reprimidos (Figura 34).

Quando foram comparadas a expressão dos genes *AtLEA6*, *AtLEA9* e *AtLEA14* em plantas do tipo selvagem em relação ao seu respectivo transgênico (Col-0/pFEC2.1 #1) observou-se que a expressão dos genes *AtLEA6* e *AtLEA14* foi maior do que 2 vezes em relação a plantas do tipo selvagem, enquanto que a expressão do gene *AtLEA9* foi maior que doze vezes (Figura 35).

Já a comparação entre o mutante e seu respectivo transgênico (Salk_02076C/pFEC2.1 #23.7), revelou um aumento maior do que cinco vezes na quantidade de transcritos *AtLEA6*, maior que doze vezes na quantidade de transcritos *AtLEA9* e maior que dez vezes na quantidade de transcritos *AtLEA14* na planta transgênica (Figura 36).

Proteínas LEA do grupo 6 são altamente hidrofílicas, possuem resíduos de cisteína e triptofano e não coagulam a altas temperaturas (BATTAGLIA et al., 2008). Rodríguez-Valentín et al. (2014), mostraram que o gene *OsLEA6* de arroz, responde ao déficit hídrico e ao tratamento com ABA, e assim como em outras espécies de plantas, promove o acúmulo de transcritos e proteínas do grupo 6. A superexpressão de genes LEA tem sido relacionada ao aumento da tolerância a estresses abióticos. Zhao et al. (2003), superexpressaram o gene *AtLEA3* de Arabidopsis em *E.coli* e houve aumento de tolerância ao frio; a expressão desse gene em Arabidopsis levou ao aumento da tolerância ao estresse osmótico e a sensitividade ao ABA.

A superexpressão de genes LEA de plantas tem sido descrita em várias espécies como cevada, trigo, arroz. A superexpressão do gene *HVA1* de cevada em arroz e trigo aumentou a tolerância à seca nas plantas transgênicas (XU et al., 1996; SIVAMANI et al., 2000) e a expressão de genes *PMA80* e *PMA1959* de trigo aumentou a tolerância a desidratação em

plantas de arroz transgênico (CHEN et al., 2002). A superexpressão do gene *WC19* de trigo em arabidopsis aumentou a tolerância das plantas ao frio (NDONG et al., 2002).

Singh et al. (2005), analisaram a estrutura do gene *AtLEA14* de arabidopsis, e determinaram que esta proteína é expressa quando a célula é submetida a estresse. Kimura et al. (2003) através da análise da expressão gênica em plantas de arabidopsis por *microarray*, verificaram que o gene *AtLEA14* foi um dos 10 genes mais ativados por estresses de alta luminosidade, seca, frio e salinidade.

Quando as plantas são submetidas à seca e ao frio, muitas enzimas se agregam perdendo a sua atividade catalítica; algumas proteínas LEA impedem a agregação e consequentemente a inativação dessas enzimas (GOYAL; WALTON; TUNACLIFFE, 2005; BOUCHER et al., 2010). Além disso, nessas condições algumas proteínas LEA participam da estabilização da membrana celular, elas podem se integrar na membrana como proteínas intrínsecas e se ligar especificamente a glicolipídeos presentes no cloroplasto (THALHAMMER et al., 2010). A estabilidade da membrana celular é essencial para manutenção da sobrevivência da célula em plantas sob estresse.

Tem sido descrito na literatura que em situações de estresse a expressão de genes *LEA* é ativada como um mecanismo de resposta que leva a proteção da planta contra a desidratação causada por estresses abióticos. Foi detectado o aumento do número de transcritos dos genes *AtLEA6*, *AtLEA9* e *AtLEA14* em plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando o gene *PvDERB6A*, somando esse resultado com os resultados descritos no capítulo 3 desta dissertação, podemos dizer que as plantas transgênicas possuem maior tolerância ao déficit hídrico, alta salinidade e baixa temperatura, e o acúmulo destes transcritos permite a proteção das plantas contra a desidratação causada por esses estresses.



Figura 34 - Análise da expressão relativa por RT-qPCR de 20 genes relacionados à tolerância a estresses abióticos em plantas. Expressão basal dos genes pela comparação da planta do tipo selvagem (Col-0) em relação ao mutante (Salk_020767C).* Diferença estatisticamente significativa p<0,05



Figura 35 - Análise da expressão relativa por RT-qPCR de 20 genes relacionados à tolerância a estresses abióticos em plantas. Expressão diferencial dos genes na planta Col-0/pFEC2.1 #1 superexpressando o gene *PvDREB6A* em relação a planta do tipo selvagem (Col-0) . * Diferença estatisticamente significativa p<0,05



Figura 36 - Análise da expressão relativa por RT-qPCR de 20 genes relacionados à tolerância a estresses abióticos em plantas. Expressão diferencial dos genes na planta Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 superexpressando o gene *PvDREB6A* em relação à planta mutante (Salk_020767C). * Diferença estatisticamente significativa p<0,05

4.3.1.9 Modelo proposto de regulação na célula pela indução da expressão dos 18 genes relacionados à aquisição de tolerância

A expressão de 20 genes relacionados à tolerância a estresses abióticos foi quantificada por RT-qPCR em plantas de arabidopsis transgênicas expressando constitutivamente o gene *PvDREB6A*, as quais adquiriram tolerância a estresses abióticos. A análise de expressão revelou que desses 20 genes quantificados, 18 foram ativados pela superexpressão do gene *PvDREB6A*. Genes estruturais, que são induzidos por estresse, que combatem o estresse oxidativo, que participam do metabolismo de carboidratos e que estão relacionados à tradução de proteínas foram escolhidos para tentar entender como a célula se organiza e responde para se proteger dos efeitos causados por estresses abióticos.

Fatores de transcrição são proteínas que reconhecem e se ligam a regiões regulatórias de genes alvo, sendo capazes de alterar a expressão desses genes. O fator de transcrição *PvDREB6A*, uma vez superexpresso na planta, promoveu a ativação da expressão dos seguintes genes: *DC1.2, USP, KIN1, ERF69, GolS3, MT2A, CAP160, NTR1.7, GPR7, PDC2, LT178, COR15a, COR15b, COR47, COR413, LEA6, LEA9 e LEA14*.

A proteína DC1.2 está localizada no sistema de endomembranas na célula, e a expressão do gene *DC1.2* modula a atividade das PMEs em plantas. Quando o grau de metilesterificação das pectinas presentes na parede celular é alterado, a susceptibilidade das plantas aos estresses abióticos pode ser diminuída (LIONETTI et al., 2007). A proteína KIN1 está localizada no citoplasma, possui ação *antifreeze* protegendo a célula contra a desidratação (KURKELA; FRANCK, 1990). Outras proteínas que protegem a célula contra a desidratação são as DHs e as proteínas LEA. As proteínas DHs possuem um papel importante na estabilização da membrana celular, possuem efeito crioprotetor e podem atuar como removedores de ROS; estão localizadas no cloroplasto (COR15a, COR15b e COR413), no citoplasma/núcleo (COR47) ou apenas no núcleo (LTI78) (VOLGER; HEBER, 1975; HINCHA et al., 1995). As proteínas LEA foram localizadas na membrana plasmática (LEA6) e no citoplasma (LEA9 e LEA14) e podem estabilizar a membrana do cloroplasto pela ligação a glicolipídeos presentes na sua superfície (GOYAL et al., 2005; THALHAMMER et al., 2010).

Além da estabilização da membrana, é importante para a célula manter seu sistema fotossintético funcionando normalmente, desse modo, proteínas USP, que estão presentes no citoplasma, são importantes porque ajudam a regular a ativação de genes da via fotossintética visando a sua manutenção (LOUKEHAICH et al., 2012). Outra proteína citoplasmática importante para proteger a célula contra estresse oxidativo é a MT2A que geralmente é ativada em plantas sob estresses abióticos (WONG et al., 2004; SAMARDZIC et al., 2010).

A proteína ERF69 presente no núcleo, é um fator de transcrição cuja expressão foi regulada pelo gene *PvDREB6A* (XU et al., 2011). O gene *GolS3* codifica para uma enzima que foi localizada no núcleo e catalisa a primeira etapa para a biossíntese da rafinose, essa proteína possui um efeito osmoprotetor (TAJI et al., 2002). Outro gene que codifica para uma enzima é o PDC2. Foi descrito na literatura que em situações de estresses abióticos, pode haver um rompimento da atividade respiratória quando a função mitocondrial é prejudicada, assim, é comum as plantas converterem o seu metabolismo aeróbio para fermentação como uma via glicolítica alternativa, a enzima citosólica que participa dessa conversão no metabolismo é a piruvato descarboxilase 2 (DOLFERUS et al., 1997).

Em situações de estresses, a síntese proteica aumenta e genes que codificam para a síntese de proteínas que de alguma forma auxiliam nesse processo, como a CAP160 (que funcionam como proteína acessória na montagem dos ribossomos), NTR1.7 (transportador de nitrato) e GPR7 (que é uma proteína de ligação ao RNA) foram ativados pela superexpressão do gene *PvDREB6A*. Essas proteínas foram localizadas no citoplasma da célula. (GUY et al., 1985; BUCHANNAN; GRUISSEM; JONES, 2002; LOHR et al., 2014).

Na Figura 37, foi apresentado um esquema que mostra onde as proteínas codificadas pela expressão de genes regulados pelo gene *PvDREB6A* vão atuar dentro da célula, gerando a resposta que leva a proteção necessária quando as plantas estão sob estresse.



Figura 37 - Localização das proteínas codificadas pelos 18 genes ativados pela superexpressão do gene *PvDREB6A*. Imagem adaptada de Taiz e Zeiger (2004)

4.4 Conclusões

A superexpressão do gene *PvDREB6A* em plantas de arabidopsis do tipo selvagem e mutante foi importante para determinar que genes relacionados a tolerância a estresses abióticos são regulados pelo gene *PvDREB6A*. Com essa análise, podemos concluir que os genes que tem sido descritos na literatura como induzidos em plantas submetidas ao estresse e estão relacionados à tolerância como: *AtLTI78, AtGolS3, AtCAP160, AtLEA9, AtLEA14, AtLEA6, AtCOR15A, AtCOR15B, AtCOR47, AtCOR413, AtMT2A, AtPDC2, AtUSP, AtGPR7,AtKIN1 e AtERF69,* foram todos induzidos nas plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando constitutivamente o gene *PvDREB6A*, mantidas em condições normais de crescimento.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos no Capítulo 3 e com os dados de expressão gênica obtidos neste capítulo, podemos concluir que as plantas transgênicas Col-0/pFEC2.1 #1 e Salk_020767C/pFEC2.1 #23.7 são tolerantes a estresses abióticos como seca, salinidade ou altas/baixas temperaturas, e que a superexpressão do gene *PvDREB6A* em plantas de arabidopsis transgênicas foi responsável por ativar a expressão de genes que participam de processos que envolvem a estabilização da membrana celular, a proteção de macromoléculas e a remoção de espécies reativas de oxigênio.

Referências

ACOSTA-DÍAZ, E.; ACOSTA-GALLEGOS, A. J.; TREJO-LOPEZ, C.; PADILLA-RAMÍREZ, J. S.; AMADOR-RAMÍREZ, M. D. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress*características de adaptación en variedades de frijol bajo sequía. Agricultura Técnica en México, Cidade del Mexico, v. 35, p. 416-425, 2009.

ARAVIND, L.; ANANTHARAMAN, V.; KOONIN, E. V. Monophyly of class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETFP, photolyase, and PPATPase nucleotide binding domains: implications for protein evolution in the RNA. **Proteins**, New York, v. 48, p. 1–14, 2002.

ARTUS, N. N.; UEMURA, M.; STEPONKUS, P. L.; GILMOUR, S. J.; LIN, C.; THOMASHOW, M. F. Constitutive expression of the cold-regulated Arabidopsis thaliana COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. **Proceedings of the Nactional Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 93, p. 13404-13409, 1996.

BATTAGLIA, M.; OLVERA-CARRILLO, Y.; GARCIARRUBIO, A.; CAMPOS, F.; COVARRUBIAS, A. A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 148, p. 6–24, 2008.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 225-230, 1992.

BOUAZIZ, D.; PIRRELLO, J.; CHARFEDDINE, M.; HAMMAMI, A.; JBIR, R.; DHIEB, A.; BOUZAYEN, M.; GARGOURI-BOUZID, R. Overexpression of StDREB1 transcription factor increases tolerance to salt in transgenic potato plants. **Molecular Biotechnology**, Burlington, v. 54, p. 803–817, 2013.

BOUCHER, V.; BUITINK, J.; LIN, X.; BOUDET, J.; HOEKSTRA, F. A.; HUNDERTMARK, M.; RENARD, D.; LEPRINCE, O. MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, p. 418–430, 2010.

BRAVO, L. A.; GALLARDO, J.; NAVARRETE, A.; OLAVE, N.; MARTINEZ, J.; ALBERDI, M.; CLOSE, T. J.; CORCUERA, L. J. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 118, p. 262–269, 2003.

BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A. M.; SMITH, M. E.; OBENDORF, R. L. Rafinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (Zeamays L.) seed development and maturation. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 150, p. 481-488, 1997.

BRETON, G.; DANYLUK, J.; CHARRON, J. B.; SARHAN, F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 64–74, 2003.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 233-238, 2009.

CHEN, M.; WANG, Q.-Y.; CHENG, X.-G.; XU, Z.-S.; LI, L.-C.; YE, X.-G.; XIA, L.-Q; MA, Y.-Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, p. 299-305, 2007.

CHENG, Y.; KATO, N.; WANG, W.; LI, J.; CHEN, X. Two RNA-binding proteins, HEN4 and HUA1, act in processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 4, p. 53-66, 2003.

CHENG, Z.; TARGOLLI, J.; HUANG, X.; WU, R. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959 enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, p. 71-82, 2002.

CHRISTIE, P. J.; HAHN, M.; WALBOT, V. Low-temperature of *alcohol dehydrogenase-1* mRNA and protein activity in maize and rice seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 699–706, 1991.

CLOSE, T. J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 795–803, 1996.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 53, p. 159–182, 2002.

COETZER, N.; GAZENDAM, I.; OELOFSE, D.; BERGER, D. K. SSHscreen and SSHdb, generic software for microarray based gene discovery: application to the stress response in cowpea. **Plant Methods**, London, v. 6, p. 1-20, 2010.

CONLEY, T. R.; PENG, H. P.; SHIH, M. C. Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 599–607, 1999.

CUI, M.; ZHANG, W.; ZHANG, Q.; XU, Z.; ZHU, Z.; DUAN, F.; WU, R. Induced overexpression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, p. 1384-1391, 2011.

DANYLUK, J.; PERRON, A.; HOUDE, M.; LIMIN, A.; FOWLER, B.; BENHAMOU, N.; SARHAN, F. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 623–638, 1998.

DE PAEPE, A.; VUYLSTEKE, M.; VAN HUMMELEN, P.; ZABEAU, M.; VAN DER, S. D. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 537-559, 2004.

DOLFERUS, R.; DE BRUXELLES E. M., G.; TREVASKIS, B.; HOEREN, F.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Strategies of gene action in *Arabidopsis* during anoxia. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, p. 21–31, 1997.

DOROKHOV, Y. L.; FROLOVA, O. Y.; SKURAT, E. V.; IVANOV, P. A.; GASANOVA, T. V.; SHEVELEVA, A. A.; RAVIN, N. V.; MAKINEN, K. M.; KLIMYUK, V. I.; SKRYABIN, K. G.; GLEBA, Y. Y.; ATABEKOV, J. G. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: The enhancer of RNA silencing. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 3872-3878, 2006.

DURE, L.; GREENWAY, S. C.; GALAU, G. A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 20, p. 4162–4168, 1981.

FAN, S.; LIN, C.; HSU, P.; LIN, S.; TSAY, Y. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, p. 2750–2761, 2009.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, p. 710–720, 2003.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers**, New York, v. 47, p. 479–491, 1998.

GILMOUR, S. J.; ARTUS, N. N.; THOMASHOW, M. F. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes *ofArabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 13-21, 1992.

GONG, Z.; LEE, H.; XIONG L.; JAGENDORF, A.; STEVENSON, B.; ZHU, J. K. RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 99, p. 11507-11512, 2002.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, London, v. 388, p. 151–157, 2005.

GRELET, J.; BENAMAR, A.; TEYSSIER, E.; VELANGE-MACHEREL, M. H.; GRUNWALD, D.; MACHEREL, D. Identification in pea seed mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant protein able to protect enzymes from drying. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, p. 157–167, 2005.

GUY, C. L.; HASKELL, D. Detection of polypeptides associated with the cold acclimation process in spinach. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 9, p. 787-796, 1988.

GUY, C. L.; HASKELL, D. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 872–878, 1987.

GUY, C. L.; HASKELL, D.; NEVEN, L.; KLEIN, P.; SMELSER, C. Hydrationstateresponsive proteins link cold and drought stress in spinach. **Planta**, Berlin, v. 188, p. 265– 270, 1992.

GUY, C. L.; NIEMI, K. J.; BRAMBL, R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 82, p. 787–796, 1985.

GUY, C.; KAPLAN, F.; KOPKA, J.; SELBIG, J.; HINCHA, D. K. Metabolomics of temperature stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 220–235, 2008.

HARA, M.; TERASHIMA, T. F.; FUKAYA, T.; KUBOI, T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 290–298, 2003.

HINCHA, D. K.; SIEG, F.; BAKALTCHEVA, I.; KÖTH, H.; SCHMITT, J. M. Freeze-thaw damage to thylakoid membranes: specific protection by sugars and proteins. In: STEPONKUS, P. L. (ed.). Advances in low-temperature biology. v. 3. London: JAI Press, 1996. p. 141-183.

HU, T.; CAO, K.; XIA, M.; WANG, X. Functional Characterization of a Putative Nitrate Transporter Gene Promoter from Rice. Acta Biochimica and Biophysica Sinica, Shanghai, v. 38, n. 11, p. 795–802, 2006.

HU, Y.; ZHAO, L.; CHONG, K.; WANG, T. Overexpression of *OsERF1*, a novel rice ERF gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in Arabidopsis. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 1717-1725, 2008.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 118–139, 2008.

KAYE, C.; NEVEN, L.; HOFIG, A.; LI, Q.; HASKELL, D.; GUY, C. Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 1367–1377, 1998.

KERK, D.; BULGRIEN, J.; SMITH, D. W.; GRIBSKOV, M. *Arabidopsis* proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. Plant Physiology, Rockville, v. 131, p. 1209-1219, 2003.

KIMURA, M.; YAMAMOTO, Y. Y.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; ABE, T.; YOSHIDA, S.; MANABE, K.; SHINOZAKI, K.; MATSUI, M. Identification of Arabidopsis genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 77, p. 226–233, 2003.

KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of two cDNAs (Erd10 and Erd14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 35, p. 225–231, 1994.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 39, p. 267–294, 1999.

KURKELA S.; FRANCK, M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 15, p. 137-144, 1990.

KURKELA, S.; BORG-FRANCK, M. Structure and expression of *kin2*, one of two cold and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, p. 689-692, 1992.

KURSTEINER, O.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. The *Pyruvate decarboxylase1* gene of arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 968–978, 2003.

KVINT, K.; NACHIN, L.; DIEZ, A.; NYSTROM, T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 140–145, 2003.

LABHILILI, M.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M. F. Characterization of cDNAs encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. **Plant Science**, Shannon, Ireland, v. 112, p. 219-30, 1995.

LANG, V.; HEINO, P.; PALVA, E. T. Low-temperature acclimation and treatment with exogenous abscisic-acid induce common polypeptides in Arabidopsis thaliana (L) Heynh. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 77, p. 729–734, 1989.

LANG, V.; PALVA, E. T. The expression of a Rab-related gene, Rab18, is induced by abscisic-acid during the coldacclimation process of Arabidopsis thaliana (L) Heynh. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 20, p. 951–962, 1992.

LEE, H. J.; KIM, J. S.; YOO, S. J.; KANG, E. Y.; HAN, S. H.; YANG, Y.; KIM, Y. C.; McSPADDEN, G. B.; KANG, H. Different roles of glycine-rich RNA-binding protein7 in plant defense against Pectobacterium carotovorum, Botrytis cinerea, and tobacco mosaic viruses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 60, p. 46–52, 2012.

LEE, J. Y.; LEE, D. H. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis pollen undergoing cold stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 517-529, 2003.

LEE, P.; SLADEK, R.; GREENWOOD, C. M.; HUDSON, T. J. Control genes and variability:absence transcripts in diverse mammalian expression studies. **Genome Research**, Oxford, v. 12, p. 292-297, 2002.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing, and high temperature stresses. In: Kozlowski, T. T. (ed.). **Physiological ecology**: a series of monographs, texts and treaties. 2. ed. New York: Academic Press, 1980. v. 1, p. 23–64.

LEWIN, B. Genes IX. Tradução de Andréa Queiroz Maranhão. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 912 p.

LI, W.; WEI, Y.; WANG, J.; LIU, C.; LAN, X.; JIANG, Q.; PU, Z.; ZHENG, Y. Identification, localization, and characterization of putative USP genes in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 121, p. 907–917, 2010.

LICAUSI, P.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **New Phytologist**, London, v. 199, p. 639–649, 2013.

LIN, C.; THOMASHOW, M. F. DNA sequence analysis of a complementary DNA for coldregulated *Arabidopsis* gene *corl5* and characterization of the COR15 polypeptide. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 519-525, 1992.

LIN, R. C.; PARK, H. J.; WANG, H. Y. Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating lightand ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. **Molecular Plant**, Oxford, v. 1, p. 42–57, 2008.

LIONETTI, V.; RAIOLA, A.; CAMARDELLA, L.; GIOVANE, A.; OBEL, N.; PAULY, M.; FAVARON, F.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 1871-1880, 2007.

LITTLE, D. Y.; RAO, H.; OLIVA, S.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A.; MALAMY, J. E. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, p. 13693–13698, 2005.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI. K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 391–406, 1998.

LOHR, B.; STREITNER, C.; STEFFEN, A.; LANGE, T.; STAIGER, D. A glycine-rich RNA-binding protein affects gibberellin biosynthesis in Arabidopsis. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 41, p. 439–445, 2014.

LOUKEHAICH, R.; WANG, T.; OUYANG, B.; ZIAF, K.; LI, H.; ZHANG, J.; LU, Y.; YE, Z. *UpUSP*, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 5593–5606, 2012.

MÄNTYLÄ, E.; LÅNG, V.; PALVA, E. T. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 141–148, 1995.

MAQBOOL, A.; ZAHUR, M.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. GUSP1 and GUSP2, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 109-114, 2009.

MARTY, P.; JOUAN, B.; BERTHEAU, Y.; VIAN, B.; GOLDBERG, R. Charge density in stem cell walls of solanum tuberosum genotypes and susceptibility to blackleg. **Phytochemistry**, Oxford, v. 44, p. 1435-1441, 1997.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 982–993, 2004.

MINIC, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 723–740, 2008.

MIROUZE, M.; SELS, J.; RICHARD, O.; CZERNIC, P.; LOUBET, S.; JACQUIER, A.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; LEBRUN, M.; BERTHOMIEU, P.; MARQUE` S, L. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, Arabidopsis halleri, confers zinc tolerance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, p. 329–342, 2006.

MOHAPATRA, S. M.; WOFRAIM, L. A.; POOLE, R. J.; DHINDSA, R. S. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold acclimation-specific genes of alfalfa. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, p. 375-380, 1989.

MOSCATIELLO, R.; MARIANI, P.; SANDERS, D.; MAATHUIS, F. J. M. Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2847-2865, 2006.

MOUILLON, J. M.; GUSTAFSSON, P.; HARRYSON, P. Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 638–650, 2006.

NDONG, C.; DANYLUK, J.; WILSON, K. E.; POCOCK, T.; HUNER, N. P. A.; SARHAN, F. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1368-1381, 2002.

NORDIN, K.; VAHALA, T.; PALVA, E. T. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 641-653, 1993.

NYLANDER, M.; SVENSSON, J.; PALVA, E. T.; WELIN, B. Stress-induced accumulation and tissue specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 45, p. 263–279, 2001.

PALVA, E. T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, p. 743-53, 2004.

PELAH, D.; WANG, W.; ALTMAN, A.; SHOSEYOV, O.; BARTELS, D. Differential accumulation of water stress related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in Populus species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 99, p. 153-159, 1997.

PUHAKAINEN, T.; HESS, M. V.; MAKELA, P.; SVENSSON, J.; HEINO, M. Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 723-740, 2008.

RASHID, M.; GUANGYUAN, H.; GUANGXIAO, Y.; HUSSAIN, J.; XU, Y. AP2/ERF Transcription Factor in Rice: genome-wide canvas and syntenic relationships between monocots and eudicots. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 8, p. 321-55, 2012.

REYES, J. L.; RODRIGO, M.-J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; GIL, J.-V.; GARAY-ARROYO, A.; CAMPOS, F.; SALAMINI, F.; BARTELS, D.; COVARRUBIAS, A. A. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 709–718, 2005.

ROBINSON, N. J.; TOMMEY, A. M.; KUSKE, C.; JACKSON, P. J. Plant metallothioneins. **Biochemical Journal**, London, v. 95, p. 1–10, 1993.

RODRÍGUEZ-VALENTÍN, R.; CAMPOS, F.; BATTAGLIA, M.; SOLÓRZANO, R. M.; ROSALES, M. A.; COVARRUBIAS, A. A. Group 6 Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in monocotyledonous plants: genomic organization and transcript accumulation patterns in response to stress in *Oryza sativa*. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 32, p. 198–208, 2014.

ROUSE, D. T.; MAROTTA, R.; PARISH, R. W. Promoter and expression studies on an Arabidopsis thaliana dehydrin gene. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 381, p. 252–256, 1996.

ROUSE, D.; GEHRING, C. A.; PARISH, R. W. Structure and sequence of a dehydrin-like gene in Arabidopsis thaliana. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, p. 531–532, 1992.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought responsive gene expression. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1292–1309, 2006.

SAMARDZIC, J. T.; NIKOLIC, D. B.; TIMOTIJEVIC, G. S.; JOVANOVIC, Z. S.; MILISAVLJEVIC, M. D.; MAKSIMOVIC, V. R. Tissue expression analysis ofFeMT3, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (Fagopyrum esculentum). Journal of Plant Physiology, Jena, v. 167, p. 1407–1411, 2010.

SCHMIDT, F.; MARNEF, A.; CHEUNG, M. K.; WILSON, I.; HANCOCK, J.; STAIGER, D.; LADOMERY, M. A proteomic analysis of oligo (dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced Arabidopsis thaliana RNA-binding proteins ATGRP7 and ATGRP8. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 37, p. 839–845, 2010.

SCHOMBURG, F. M.; PATTON, D. A.; MEINKE, D. W.; AMASINO, R. M. FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, n. 6, p. 1427-1436, 2001.

SCHONING, J. C.; STREITNER, C.; MEYER, I. M.; GAO, Y.; STAIGER, D. Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. **Nucleic Acids Reserch**, London, v. 36, p. 6977–6987, 2008.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 327-334, 1997.

SINGH, S.; CORNILESCU, C. C.; TYLER, R. C.; CORNILESCU, G.; TONELLI, M.; LEE, M. S.; MARKLEY, J. L. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from Arabidopsis thaliana, a cellular stress-related protein. **Protein Science**, New York, v. 14, p. 2601–2609, 2005.

SIVAMANI, E.; BAHIELDIN, A.; WRAITH, J. M.; AL-NIEMI, T.; DYER, WE.; HO, T-HD.; QU, R. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. **Plant** Science, Shannon, Ireland, v. 155, p. 1-9, 2000.

SPITZ F.; FURLONG, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. **Nature Reviews**, London, v. 13, p. 613-627, 2012.

STAIGER, D. RNA-binding proteins and cyrcadian rhythms in Arabidopsis thaliana. **Philos Trans Royal Society Biomolecular Biology Science**, London, v.356, n.1415, p.1755–1759, 2001.

STITT M.; HURRY V. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 5, p. 199–206, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 30-55.

TAJ, G.; AGARWAL, P.; GRANT, M.; KUMAR, A. MAPK machinery in plants recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, p. 1370-1378, 2010.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 417-426, 2002.

THALHAMMER, A.; HUNDERTMARK, M.; POPOVA, A. V.; SECKLER, R.; HINCHA, D. K. Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1798, p. 1812–1820, 2010.

THOMASHOW, M. F. Genes induced during cold acclimation in higher plants. In: STEPONKUS, P. L. (ed.). Advances in low-temperature biology. v. 2. London: JAI Press, 1993. p. 183-210.

THOMASHOW, M. F. Molecular genetics of cold acclimatation in higher plants. Advances in Genetics, Amsterdam, v. 28, p. 99–131, 1990.

THOMMA, B. P.; CAMMUE, B. P.; THEVISSEN, K. Plant defensins. Planta, Berlin, v. 216, p. 193–202, 2002.

TSAY, Y.-F.; SCHROEDER, J. I.; FELDMANN, K. A.; CRAWFORD, N. M. The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate inducible nitrate transporter. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 705–713, 1993.

TSAY, Y. F.; CHIU, C. C.; TSAI, C. B.; HO, C. H.; HSU, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2290-2300, 2007.

TUNNACLIFFE, A.; HINCHA, D. K.; LEPRINCE, O.; MACHEREL, D. LEA proteins: versatility of form and function. In: LUBZENS, E.; CERDA, J.; CLARK, M. (ed.). **Sleeping beauties**: dormancy and resistance in harsh environments. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 91–108.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of LEA proteins. Naturwissenschaften, Berlin, v. 94, p. 791–812, 2007.

VOLGER, H. G.; HEBER, U. Cryoprotective leaf proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 412, p. 335-349, 1975.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 203-209, 2004.

WANG, H.; DATLA, R.; GEORGES, F.; LOEWEN, M.; CUTLER, A. J. Promoters from kin1 and cor6.6, two homologous Arabidopsis thaliana genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, p. 605-617, 1995.

WEAKE, V. M.; WORKMAN, J. L. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. **Nature Reviews**, London, v. 11, p. 426-437, 2010.

WELIN, B. V.; OLSON, A.; PALVA, E. T. Structure and organization of two closely-related low- temperature-induced Dhn/Lea/Rab-like genes in Arabidopsis thaliana L Heynh. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 29, p. 391–395, 1995.

WILHELM, K. S.; THOMASHOW M. F. *Arabidopsis thaliana corl5b*, an apparent homologue of *corl5a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 1073-1077, 1993.

WONG, H. L.; SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, T.; UMEMURA, K.; SHIMAMOTO, K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1447–1456, 2004.

WU, Y.; WANG, Q.; MA, Y.; CHU, C. Isolation and expression analysis of salt up-regulated ESTs in upland rice using PCRbased subtractive suppression hybridization method. **Plant Science**, Shannon, Ireland, v. 168, p. 847–853, 2005.

XU, D.; DUAN, X.; WANG, B.; HONG, B.; HO, T-HD.; WU, R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 249-257, 1996.

XU, Z. S.; CHEN, M.; LI, L.C.; MA, Y. Z. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, Victoria, v. 53, p. 570–585, 2011.

XUE, T.; LI, X.; ZHU, W.; WU, C.; YANG, G.; ZHENG, C. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 339–349, 2009.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 251–264, 1994.

YANG, Z.; WU, Y.; LI, Y.; LING, H. Q.; CHU, C. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 70, p. 219–229, 2009.

YEAN, S.; JONG-BEUM, P.; YEON-JEONG, C.; CHOONKYUN, J.; HAK, S.; SOON-KI, P.; BAEK, N.; JONG, S. Overexpression of the ethylene-responsive factor gene BrERF4 from Brassica rapa increases tolerance to salt and drought in Arabidopsis plants. **Molecules & Cells**, Seoul, v. 30, p. 271-277, 2010.

ZHANG, X. X.; TANG, Y. J.; MA, Q. B.; YANG, C. Y.; MU, Y. H.; SUO, H. C.; LUO, L. H.; NIAN, H. OsDREB2A, a Rice Transcription Factor, Significantly Affects Salt Tolerance in Transgenic Soybean. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. 1-7, 2013.

ZHAO, P.; LIU, F.; MA, M.; GONG, J.; WANG, Q.; JIA, P.; ZHENG, G.; LIU, H. Overexpression of *AtLEA3_3* Confers Resistance to Cold Stress in *Escherichia coli* and Provides Enhanced Osmotic Stress Tolerance and ABA Sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Biology of the Cell**, Amsterdam, v. 45, p. 785–796, 2011.

ZHOU M.; MA, J.; ZHAO, Y.; WEI, Y. B.; TANG Y.; WU, Y. Improvement of drought and salt tolerance in Arabidopsis and Lotus corniculatus by overexpression of a novel DREB transcription factor from Populus euphratica. **Gene**, Philadelphia, v. 506, p. 10–17, 2012a.

ZHOU, Y.; CHU, P.; CHEN, H.; LI, Y.; LIU, J.; DING, Y.; EDWARD, W. T.; TSANG L. J.; KEQIANG, WU.; HUANG, S. Overexpression of Nelumbo nucifera metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in Arabidopsis. **Planta**, Berlin, v. 235, p. 523–537, 2012b.