



SINARA OLIVEIRA DE AQUINO

**ANÁLISE FUNCIONAL DA REGIÃO
PROMOTORA DE HAPLÓTIPOS DO GENE
CcDREB1D DE *Coffea canephora* VIA
TRANSFORMAÇÃO DE
Nicotiana tabacum cv. SRI**

LAVRAS – MG

2014

SINARA OLIVEIRA DE AQUINO

**ANÁLISE FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DE HAPLÓTIPOS
DO GENE *CcDREB1D* DE *Coffea canephora* VIA TRANSFORMAÇÃO
DE *Nicotiana tabacum* cv. SRI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Pierre Roger Marraccini

Coorientador

Dr. Alan Carvalho Andrade

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Aquino, Sinara Oliveira de.

Análise funcional da região promotora de haplótipos do gene *CcDREB1D* de *Coffea canephora* via transformação genética de *Nicotiana tabacum* cv. SRI / Sinara Oliveira de Aquino. – Lavras : UFLA, 2014.

114p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Pierre Roger Marraccini.

Bibliografia.

1. Café. 2. DREB. 3. Transformação genética. 4. Resistência à seca. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.520415

SINARA OLIVEIRA DE AQUINO

**ANÁLISE FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DE HAPLÓTIPOS
DO GENE *CcDREB1D* DE *Coffea canephora* VIA TRANSFORMAÇÃO
DE *Nicotiana tabacum* cv. SRI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014.

Dr. Alan Carvalho Andrade	EMBRAPA
Dra. Polyana Kelly Martins	EMBRAPA

Dr. Pierre Roger Marraccini
Orientador

**LAVRAS – MG
2014**

DEDICO

A todos que me fizeram acreditar nesse sonho e que trabalharam muito para que eu pudesse realizá-lo. Em especial aos meus pais, Lourival e Silvana, pela importância incondicional que têm na minha vida, sempre abdicando de suas próprias vontades para que meus sonhos e objetivos se realizem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Santíssima Virgem Maria pela oportunidade, proteção e fidelidade.

A toda minha família e, em especial, aos meus pais, Lourival e Silvana, e a minha irmã Taynara, meus exemplos de vida! Agradeço pela paciência, compreensão, amor incondicional, carinho e apoio. Com vocês aprendi a acreditar nos meus sonhos e batalhar para alcançá-los.

A Danusa, irmã e amiga, por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor me fazendo enxergar Deus nos olhos de cada pessoa que passa pela minha vida.

À comunidade Mariana Resgate, em particular aos amigos Breno e Sílvia, que sempre estiveram ao meu lado.

Às amigas Paulyene e Valéria, pela amizade verdadeira, pelo apoio em minhas decisões, conselhos e por serem tão especiais.

À Universidade Federal de Lavras, aos professores do curso de Biotecnologia Vegetal, pelos valiosos ensinamentos, em especial ao professor Luciano, coordenador do curso de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À CAPES, ao Consórcio Pesquisa Café e Cirad pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular, o meu muito obrigada por todo apoio nos experimentos, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil!

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela infraestrutura de trabalho.

Às companheiras do Laboratório de Genética Molecular, Edriana, Érica, Fernanda, Karoline, Michelle, Tatiana e Vanessa, o meu muito obrigada!

Agradeço de maneira particular a Fernanda, pelo apoio nas horas de desespero, pelas ajudas nas montagens dos experimentos e correções dos

trabalhos, pela parceria até altas horas no laboratório, desvendar protocolos e até mesmo por me ensinar que DNA também pode voar.

Aos colegas da EMBRAPA Agroenergia, Ana Paula, Bárbara, Dr. Adilson, Dr. Hugo e Dra. Polyana, muito obrigada por toda colaboração e parceria.

A Dra. Leila Maria Gomes Barros, pela atenção, disponibilidade e paciência.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Alan Carvalho Andrade, Dr. Pierre Marraccini e Dra. Polyana Kelly Martins por aceitarem fazer parte da banca, contribuindo construtivamente com o meu trabalho. Agradeço em especial pelas correções e preciosas sugestões.

Ao Dr. Alan pelos ensinamentos, orientações, sugestões, puxões de orelha e claro, momentos de descontração e grandes sustos, nos quais sempre dei muitas risadas. Em apenas um ano de convivência tive a oportunidade de aprender muito, tanto no que diz respeito à capacitação profissional quanto ao crescimento pessoal. Em uma frase posso dizer: “A simplicidade de um mineiro fez com que a saudade de casa fosse um pouco menor”.

Ao Dr. Pierre Marraccini pelas orientações, dedicação, extrema paciência, disponibilidade, compreensão, apoio, “cascudos na cabeça” e divertidas avaliações de campo. Muito obrigada pela dedicação incondicional, por ter me ensinado tanto sobre pesquisa e por estar ao meu lado encorajando e dizendo para eu não desistir. Agradeço por cada minuto de dedicação a me ensinar e a me ajudar neste trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

Estudos recentes resultaram na identificação de vários genes candidatos para tolerância à seca que apresentaram expressão diferencial contrastante entre genótipos. Dentre esses, encontram-se genes integrantes da via de resposta ao estresse hídrico, tais como os fatores de transcrição *DREB*. Resultados da expressão do gene *CcDREB1D* nas folhas dos clones 14 (tolerante) e 22 (sensível) de *Coffea canephora* Conilon mostraram uma maior expressão desse gene em condição de déficit hídrico no clone 14 comparado ao clone 22. Após sequenciamento, polimorfismos na região promotora do gene *CcDREB1D*, que podem indicar a participação de três haplótipos (15, 16 e 17) no controle genético da tolerância à seca, foram identificados nos clones 14 e 22. Visando estudar a participação dos polimorfismos na resposta à seca, várias construções gênicas, com diferentes fragmentos da região promotora do gene *CcDREB1D*, foram arquitetadas no vetor binário pBI101 e testadas via transformação genética de *Nicotiana tabacum* cv. SRI, a fim de avaliar a capacidade dos fragmentos de controlarem a expressão do gene repórter β -glucuronidase (*uidA*). Testes histoquímicos indicaram uma forte atividade GUS (forte coloração) correspondente ao controle positivo (pBI121) enquanto que nenhuma atividade GUS foi detectada para o controle negativo (pBI101). Tanto nas folhas, como nas raízes, uma expressão basal do gene *uidA* foi verificada nas plantas T0 sem estresse, sobretudo para as construções contendo as versões mais longas (D) do pDREB1D. Para verificar se a região promotora dos haplótipos do gene *CcDREB1D* responderiam aos estresses abióticos, as plantas transformadas de tabaco foram submetidas a ensaios de desidratação e de temperatura elevada e a expressão do gene repórter *uidA* foi analisada por testes histoquímicos GUS e PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Experimentos de qPCR confirmaram uma leve indução do gene *uidA* nas folhas das plantas T0 transformadas com pD22-hp17D. No entanto, os níveis de expressão deste gene foram muito inferiores aos das plantas transformadas com o controle positivo (pBI121). Nenhuma indução do gene repórter foi observada nas plantas transformadas com as diferentes construções contendo os outros haplótipos (15 e 16) do promotor *CcDREB1D*. Contudo, esses resultados mostraram que (1) os promotores pDREB1D de *C. canephora* são fracos em tabaco, (2) o promotor do haplótipo 17 oriundo do clone 22 de *C. canephora* é induzido com estresses abióticos nas folhas de tabaco, mostrando que os mecanismos moleculares implicados na regulação da expressão gênica em resposta à seca são (pelo menos parcialmente) conservados entre cafeeiro e tabaco, e que (3) o funcionamento dos promotores pDREB1D dos clones 14 e 22 de cafeeiro é diferencial em tabaco, sugerindo que os polimorfismos identificados nesses promotores participam da regulação destas sequências.

Palavras-chave: *Coffea*. DREB. Promotor. Transformação gênica. Tolerância à seca.

ABSTRACT

Recent studies resulted in the identification of many candidate genes for drought tolerance presenting contrasted differential expression profiles between genotypes. Among those are found the genes involved in the water stress response pathway, such as the DREB transcription factors. Results of CcDREB1D gene expression in the leaves of clones 14 (tolerant) and 22 (sensitive) of *Coffea canephora* Conilon, showed higher expression for clone 14 than clone 22 under water stress conditions. After sequencing, the polymorphisms identified in the promoter region of CcDREB1D gene in clones 14 and 22, may indicate the participation of three haplotypes (15, 16 and 17) in the genetic control for drought tolerance. With the aim of studying the participation of these polymorphisms in the response to drought, several genetic constructions of the CcDREB1D promoter regions were made in the pBI101 binary vector and tested via genetic transformation of *Nicotiana tabacum* cv. SRI, in order to evaluate the capacity of such fragments in controlling the expression of the β -glucuronidase (*uidA*) reporter gene. Histochemical tests indicated a strong GUS activity (high coloration) for the positive control (pBI121) while no GUS activity was detected for the negative control (pBI101). In both leaves and roots, a basal expression of *uidA* gene was observed for the T0 plants without drought stress, especially for the constructions containing the longest versions (D) of the pDREB1D. To verify if the promoters of the CcDREB1D gene haplotypes would respond to abiotic stresses, transformed tobacco plants were submitted to dehydration and elevated temperature assays, and subsequently analyzed for the expression of the *uidA* reporter gene by GUS histochemical tests and real time quantitative PCR (qPCR). A slight induction of the *uidA* gene in the leaves of transformed T0 plants was confirmed with pD22-hp17D in qPCR experiments. However, the expression levels of this gene were highly inferior to those of the plants transformed with the positive control (pBI121). No induction of the reporter gene was observed in plants transformed with the different constructions containing the other haplotypes (15 and 16) of the CcDREB1D promoter. Altogether, these results showed that: (1) the pDREB1D promoters of *C. canephora* are weak in tobacco; (2) the promoter for haplotype 17, derived from *C. canephora* clone 22, is induced with abiotic stresses in the tobacco leaves, demonstrating that the molecular mechanisms implicated in the regulation of the gene expression in response to drought are (at least partially) conserved between coffee and tobacco plants; and (3) that the functioning of the pDREB1D promoters of coffee clones 14 and 22 is different in tobacco, suggesting that the polymorphisms identified in these promoters participate in the regulation of these sequences.

Keywords: *Coffea*. DREB. Promoter. Genetic transformation. Tolerance to drought.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Expressão do gene *CcDREB1D* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas dos clones 14 (tolerante) e 22 (sensível) de *C. canephora* submetidos (NI: Não irrigado) ou não (I: Irrigado) à seca. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene endógeno (expressão constitutiva) e a amostra 14I como calibrador interno (expressão relativa = 1)..... 27
- Figura 2 Grupos de distribuição da diversidade de *Coffea canephora*. As linhas pontilhadas delimitam regiões com distribuição pluviométrica distintas. O Subgrupo SG1 originou-se em uma região de clima mais árido, enquanto o SG2 é típico de uma região de clima equatorial 31
- Figura 3 História evolutiva do alotetraploide *C. arabica*. (A) Origem de *C. arabica*. Os genomas dos progenitores estão representados pelos diploides *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu há cerca de 1 milhão de anos (m.a.a) a partir do cruzamento de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*. (B) Origem das principais cultivares atuais de *C. arabica* 33
- Figura 4 Genes induzidos durante o estresse hídrico, salino e ao frio e suas possíveis funções na tolerância e resposta ao estresse 37
- Figura 5 Redes transcricionais reguladoras de sinais de estresses biótico e abiótico e da expressão gênica 39
- Figura 6 Pontos de controle da expressão gênica: (1) Controle transcricional; (2) Controle de processamento de RNA; (3) Controle do transporte de RNA; (4) Controle da tradução; (5) Controle pós-traducional 40

- Figura 7 O promotor mínimo da RNA polimerase II pode apresentar um TATA box a aproximadamente 30 pb a montante do sítio de iniciação da transcrição (Inr). Os promotores sem TATA box podem apresentar o elemento promotor a jusante (DPE). O TATA box possui geralmente a sequência consenso TATAA. O Inr possui bases pirimídicas (Y) ao redor de um núcleo conservado de CA (citosina e adenina). A sequência apresenta a fita codificadora..... 41
- Figura 8 Sequência consenso do promotor, excluindo INDELS (inserções/deleções), de haplótipos de *DREB1D* e seus elementos *cis* implicados na resposta das plantas aos estresses térmicos e de déficit hídrico. A sequência do promotor representa uma sequência consenso dos clones 14 e 22 e o código IUPAC (R = A/G, Y = C/T, M = A/C, K = G/T, S = G/C, B = G/T/C, V = G/A/C) indica os sítios polimórficos entre esses dois clones. Sombreamento preto indica o local de início de transcrição (+1). A seta de cabeça para baixo (↓) indica os diferentes fragmentos do promotor usado nos experimentos de transformação genética de *Nicotiana tabacum*. Inserções são indicadas por (▼) e (→) indica repetições de núcleo de microsatélite..... 44
- Figura 9 Mapa esquemático das construções utilizadas neste estudo..... 51
- Figura 10 Representação esquemática do T-DNA com os pares de *primers* usados (APÊNDICE A)..... 51
- Figura 11 Estágios da cultura de tecidos envolvendo a transformação de *N. tabacum*. Plântula estabelecida a partir de semente (A e B). Explantes excisados após a co-cultura em inóculo de *A. tumefaciens* EHA105 contendo os plasmídeos recombinantes pDREB1D::*uidA*. (C e D) Brotos regenerando a partir dos discos

foliares em meio MS com agente de seleção (canamicina 100 mg.mL⁻¹) após seis semanas. (E) Plântula em meio MS enraizando após oito semanas. (F). Planta *in vitro* com 11 semanas, pronta para ser aclimatizada. (G). Aclimatização- Plantas jovens de *N. tabacum* que foram transferidas dos meios de seleção para substrato vegetal (H). Crescimento e desenvolvimento das plantas T0 em terra adubada (I, J e K)..... 59

Figura 12 Planta transgênica retirada do cultivo *in vitro* e submetida à desidratação em temperatura ambiente sobre um papel filtro, por um período de seis horas. Em A, a planta acabou de sair do cultivo *in vitro* e a primeira coleta das amostras para teste histoquímico e extração de RNA foi feita. Em B, a planta já se encontra a duas horas em temperatura ambiente sobre papel filtro, as mesmas coletas foram realizadas. Em C, o período é de quatro horas sobre papel filtro em temperatura ambiente, novamente as amostras foram coletadas para teste histoquímico e extração de RNA. Em D, as plantas já estão a seis horas no mesmo ambiente, sendo possível notar a murcha da planta. As amostras foram coletadas e as plantas transferidas para vasos com terra adubada para, depois de 168 horas, coletar novamente amostras das plantas em condições normais 62

Figura 13 Ensaio de estresse térmico (40°C) realizado para teste histoquímico GUS e extração de RNAs totais em plantas de *N. tabacum* transformadas (T0) com diferentes fragmentos da região promotora de alelos do gene *CcDREB1D*, isolada do clone 14 (tolerante) e do clone 22 (sensível) 63

- Figura 14 (A) Sítios de restrição da enzima *PvuII* nos vetores pBI101 e pBI121.(B) Análise *in silico* do perfil de digestão dos vetores pBI101 e pBI121. (C) Análise dos fragmentos obtidos após a digestão dos pDREB com enzima de restrição *PvuII*. Confirmação da estrutura dos vetores pBI101 e pBI121 com base na análise *in silico* (indicado em vermelho). A = 3072 pb + 2009 bp = 5081pb; B = 1699pb; C* = fragmento de tamanho variável, D = 457 pb; E = 4218 pb 68
- Figura 15 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das construções pDREB e controles (pBI121 e pBI101) com o par de *primer* pBIrev/RevMax. Os nomes das construções e os tamanhos obtidos (em vermelho) são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII* (ver também Figura 10)..... 69
- Figura 16 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir dos plasmídeos extraídos das baterias recombinantes, utilizando o par de *primer* pBIrev/RevMax. Os nomes das construções e os tamanhos obtidos (em vermelho) são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (ver também Figura 10)..... 70
- Figura 17 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das colônias de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas utilizando o par de *primer* GUS. Os nomes das construções são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Ladder 100 pb. O tamanho do fragmento amplificado (120 pb) é indicado por uma seta..... 72

- Figura 18 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das colônias de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas utilizando o par de *primer* NPTI. Os nomes das construções são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado Ladder 100 pb. O tamanho do fragmento amplificado (130 pb) é indicado por uma seta..... 72
- Figura 19 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das colônias de *A. tumefaciens* EHA105, utilizando o par de *primer* pBIrev/RevMax. Os nomes das construções e os tamanhos obtidos (em vermelho) são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (ver também Figura 10) 73
- Figura 20 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR das amostras de DNA genômico de *N. tabacum* dos eventos das diferentes construções utilizadas neste trabalho, utilizando o par de *primer* pBIrev/RevMax. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (ver também figuras 10, 12, 14 e 17)..... 74
- Figura 21 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR das amostras de DNA genômico de *N. tabacum* dos eventos das diferentes construções utilizadas neste trabalho, utilizando o par de *primer* GUS (120 pb). Marcador utilizado: Ladder 100 pb..... 75
- Figura 22 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR das amostras de DNA genômico de *N. tabacum* dos eventos das diferentes construções utilizadas neste trabalho, utilizando o par de *primer* NPTII (780 pb). Marcador utilizado: Ladder 100 pb..... 75

- Figura 23 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas de plantas transformadas de *N. tabacum* com diferentes fragmentos da região promotora de alelos do gene *CcDREB1D* em condições normais..... 78
- Figura 24 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) em raízes de plantas transformadas de *N. tabacum* com diferentes fragmentos da região promotora de alelos do gene *CcDREB1D* em condições normais..... 78
- Figura 25 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas de plantas transformadas de *N. tabacum* com as construções pD14-hp15D (A1-E1), pD14-hp16D (A2-E2), pD22-hp17D (A3-E3) e os vetores controles pBI121 (A4-E4) e pBI101 (A5-E5), submetidas à desidratação (A = 0 hora; B = 2 horas; C = 4 horas; D = 6 horas; E = recuperação = 168 horas)..... 80
- Figura 26 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR convencional das amostras de cDNA de plantas de *N. tabacum* transformadas com pD22-hp17D e pBI121, submetidas ao estresse de desidratação, utilizando o par de *primer* GUS. Os nomes das construções, os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; 6h = 6 horas; R = recuperação = 168 horas) e a posição dos controles (positivo = DNA plasmidial e negativo = reação com água) são indicados acima de cada poço. A banda específica do cDNA *uidA* (120 pb) é indicada com a seta do lado esquerdo. Marcador utilizado: Ladder 100 pb..... 82

- Figura 27 Expressão do gene *GUS* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas à desidratação. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes dos vetores e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; 6h = 6 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico..... 83
- Figura 28 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (*GUS*) nas folhas de plantas transformadas de *N. tabacum* com os vetores pD14-hp15P (A1-D1), pD14-hp15D (A2-D2), pD14-hp16P (A3-D3), pD14-hp16M (A4-D4), pD14-hp16D (A5-D5), pD22-hp17P (A6-D6), pD22-hp17D (A7-D7), pBI121 (A8-D8), pBI101 (A9-D9), submetidas ao estresse térmico (40°C). (A = 0 hora; B = 2 horas; C = 4 horas D = recuperação = 168 horas)..... 86
- Figura 29 Expressão do gene *GUS* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17 D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes das construções e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico..... 88

Figura 30 Expressão do gene *PIP2;1* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes das construções e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico..... 91

Figura 31 Expressão do gene *AQP* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes das construções e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Elementos nucleicos <i>cis</i> implicados na resposta das plantas aos estresses térmicos e de déficit hídrico (ALVES, comunicação pessoal).....	45
Tabela 2	Eventos confirmados com os pares de <i>primers</i> pBIrev/RevMax, GUS e NPTII.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
ABA	Ácido abcísico
ABREs	<i>ABA-Responsive Elements</i>
ACC	1-carboxílico-1-aminociclopropano
BAP	6-benzilaminopurina
<i>CaLTP3</i>	<i>Coffea arabica</i> Lipid Transfer Protein
<i>Cc</i>	<i>Coffea canephora</i>
cDNA	DNA complementar
CE	<i>Coupling Elements</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	DNA genômico
DRE/CRT	<i>Drought Response Element/C-repeat</i>
<i>DREB</i>	<i>Dehydration Responsive Element Binding Protein</i>
ERD1	<i>Early Responsive to Dehydration 1</i>
FTs	Fatores de Transcrição
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
GUS (<i>uidA</i>)	Gene da β -glucuronidase
hp	Haplótipo
I	Irrigado
INDELS	Inserções/deleções
LB	Meio Luria-Bertani
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i>
LRE	<i>Light Responsive Element</i> "
M	Molar

mL	Mililitro
MS	Meio de cultura Murashige e Skoong
ng	Nanogramas
NI	Não irrigado
NMT	N-metil transferase
<i>NOS</i>	Nopalina sintase
<i>Npt</i>	Neomicina fosfotransferase
<i>NtACT</i>	Actina
OCS	Octopina sintetase
OD	Densidade óptica
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pDREB	Promotor <i>Dehydration Responsive Element Binding Protein</i>
PGMs	Plantas geneticamente modificadas
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de nucleotide único
<i>UBQ</i>	Gene da ubiquitina
YEB	<i>Yeast Extract Broth</i>

LISTA DE SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
ICO	International Coffee Organization
LGM	Laboratório de Genética Molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
2.1	O cafeeiro.....	29
2.1.1	Importância e economia.....	29
2.1.2	Taxonomia e genômica.....	30
2.2	Estresse abiótico (aspectos gerais).....	33
2.2.1	Respostas ao estresse abiótico.....	35
2.3	Regulação transcricional em eucariotos.....	39
2.4	Elementos <i>cis</i> da região promotora do gene <i>CcDREB1D</i> de <i>C. canephora</i>	43
2.5	Promotores de genes do cafeeiro.....	45
2.6	Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro.....	46
3	OBJETIVO GERAL.....	49
3.1	Objetivos específicos.....	49
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1	Confirmação da identidade dos plasmídeos recombinantes pDREB1D:: <i>uidA</i>	52
4.2	Preparo dos explantes.....	53
4.3	Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i> e transformação por choque térmico.....	53
4.4	Miniextração de plasmídeos.....	54
4.5	Preparo de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 e transformação por eletroporação.....	55
4.6	Preparo das cepas de <i>Agrobacterium</i> contendo os plasmídeos para a transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SRI.....	57
4.7	Transformação genética e regeneração.....	57
4.8	Enraizamento e aclimatização.....	58
4.9	Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS).....	59
4.10	Extração de DNA.....	60
4.11	Tratamentos por estresses abióticos.....	61
4.11.1	Ensaio de desidratação.....	61
4.11.2	Ensaio de estresse térmico.....	62
4.12	Extração de RNAs totais.....	63
4.13	Tratamento com DNase.....	64
4.14	Transcriptase reversa (RT).....	65
4.15	Testes dos pares de <i>primers</i>	65
4.15.1	Ensaio de qPCR.....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67

5.1	Verificação dos plasmídeos recombinantes	67
5.2	Amplificação das construções recombinantes em <i>E. coli</i> XL10 GOLD.....	70
5.3	Amplificação dos vetores recombinantes em <i>A. tumefaciens</i> EHA105.....	71
5.4	Análise molecular das plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i>	73
5.5	Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β - glucuronidase (GUS) nas folhas e raízes de plantas transformadas de <i>N. tabacum</i> em condições normais	76
5.6	Ensaio de estresses abióticos realizados nas folhas das plantas transformadas de <i>N. tabacum</i>	78
5.6.1	Estresse desidratação.....	79
5.6.2	Estresse térmico (40°C)	85
6	CONCLUSÕES	93
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	95
	REFERÊNCIAS	96
	APÊNDICES	109
	ANEXO	112

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes mundialmente e é o principal meio de subsistência para mais de 125 milhões de pessoas, sendo produzido em mais de 60 países (BAKER et al., 2001). Enquanto que 125 espécies dos gêneros *Coffea* e *Psilanthus* são conhecidas atualmente (DAVIS et al., 2011), a produção de café comercial baseia-se principalmente em duas espécies: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, cada uma representando aproximadamente 65% e 35% da produção mundial respectivamente. O Brasil detém a liderança mundial em produção e exportação de café (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2014).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB a primeira estimativa da produção brasileira de café (Arábica e Conilon), para a safra 2014, indica que o país deverá colher entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. A área plantada com a cultura destes cafés, no país, totaliza mais de 2,2 milhões de hectares.

A crescente demanda global por alimentos de melhor qualidade tem promovido um avanço significativo em diversas áreas da produção vegetal (NELSON et al., 2009). Contudo, condições climáticas desfavoráveis e a crescente expansão da cafeicultura para regiões marginais, onde tais condições intensificam-se, contribuem significativamente para a redução da produtividade, sendo a seca o principal estresse abiótico que afeta a produção dos países cafeicultores. No caso de seca severa, a floração pode ser afetada, levando ao aborto de frutos em desenvolvimento, ou até mesmo causar a morte da planta (DAMATTA;RAMALHO, 2006). As mudanças climáticas podem conduzir a um acréscimo da temperatura média e também no aumento da frequência dos eventos de estiagem, fazendo com que regiões cafeicultoras cheguem a sofrer

deslocamentos geográficos, levando a importantes problemas ambientais, econômicos e sociais (ASSAD et al., 2004).

Atualmente, muitas pesquisas têm objetivado a compreensão dos mecanismos de resposta (como tolerância) das plantas à seca (BLUM, 2011; XOCONOSTLE-CAZARES et al., 2011). Diferente da resistência aos estresses bióticos, cuja maioria é dependente de características monogênicas, as repostas genéticas aos estresses abióticos são multigênicas, e assim mais complexas e difíceis de controlar (VINOCUR; ALTMAN, 2003).

O déficit hídrico desencadeia respostas variadas nas plantas, tais como alterações na expressão gênica, acúmulo de compostos de baixo peso molecular (metabólitos ou componentes osmóticos) e a síntese de proteínas específicas (proteínas hidrofílicas, chaperonas, etc.) (RAMACHANDRA-REDDY et al., 2004).

Uma das estratégias básicas de engenharia genética para tolerância à seca visa à introdução de genes funcionais envolvidos diretamente nesses eventos (UMEZAWA et al., 2006; LAWLOR, 2013). No entanto, por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é lento e a introdução de uma nova característica em uma variedade elite, por meio de técnicas de melhoramento convencional, é um processo demorado (BORÉM; ALMEIDA, 2011).

Técnicas de biologia avançada tais como a genômica estrutural e funcional, a proteômica e a bioinformática podem oferecer alternativas para reduzir o tempo de obtenção de novos genótipos e atuarem como ferramentas auxiliares nos programas de melhoramento genético. Além disso, a possibilidade de produzir plantas transgênicas de cafeeiro com alta eficiência abre novas perspectivas ao melhoramento convencional, permitindo a rápida incorporação de características desejáveis às espécies perenes (RIBAS et al., 2006; MISHRA; SLATER, 2012).

Um requisito primordial para a aplicação destas técnicas biotecnológicas é a identificação e a caracterização funcional de genes com potencial utilização nestes processos (HORAN et al., 2008). Desta forma, a realização de uma análise exploratória e discriminatória dos genes ou fatores genéticos, associados com uma determinada característica fenotípica de interesse agrônomo é de grande importância para a aplicação prática destas ferramentas no melhoramento genético das plantas (ASHRAF, 2010), como nesse caso, do cafeeiro.

Os efeitos transcricionais quantitativos e qualitativos ocasionados por promotores podem ser ajustados benéficamente com a seleção de promotores mais apropriados considerando as características da planta, o tipo de transgene e o tecido onde ele deve se expressar. Genes induzidos por estresse têm contribuído para a caracterização de promotores úteis na engenharia genética para a expressão direcionada sob condições controladas, evitando os efeitos secundários indesejáveis na ausência do estresse e o silenciamento gênico, às vezes, resultante da utilização de promotores constitutivos (TANG; GALILI, 2004).

Além disso, a transgenia de plantas tem sido uma estratégia interessante para analisar a regulação dos elementos *cis* em regiões promotoras e a indução desses genes responsivos ao estresse hídrico (UMEZAWA et al., 2006).

Genes candidatos (GCs) apresentando perfis de expressão diferenciais em relação à seca em folhas foram descritos em estudos anteriores em *C. arabica* (FREIRE; 2010; FREIRE et al., 2013; MARRACCINI et al., 2009; VIDAL et al., 2013) e *C. canephora* (MARRACCINI et al., 2009; MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013; VINECKY et al., 2011).

Freire (2010) analisou a diversidade nucleotídica *in vivo* de alguns genes candidatos, dentre eles o gene *DREB1D* (*Dehydration Responsive Element Binding Protein*), identificando SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), em várias cultivares e clones de *Coffea sp.* Uma quantidade limitada de SNPs foi

encontrada na sequência codante deste gene, como foi também observado recentemente para os genes *DREB1* e *DREB2* de vários cereais (NAYAK et al., 2009; WEI et al., 2006), demonstrando o papel crucial desses genes nas respostas das plantas à seca e assim explicando a conservação das sequências nucleicas correspondentes.

Marraccini et al. (2012) demonstraram que o gene *CcDREB1D* de *C. canephora* apresenta uma maior expressão em condições de déficit hídrico nas folhas do clone 14 (tolerante) comparado ao clone 22 (susceptível) à seca (Figura 1).

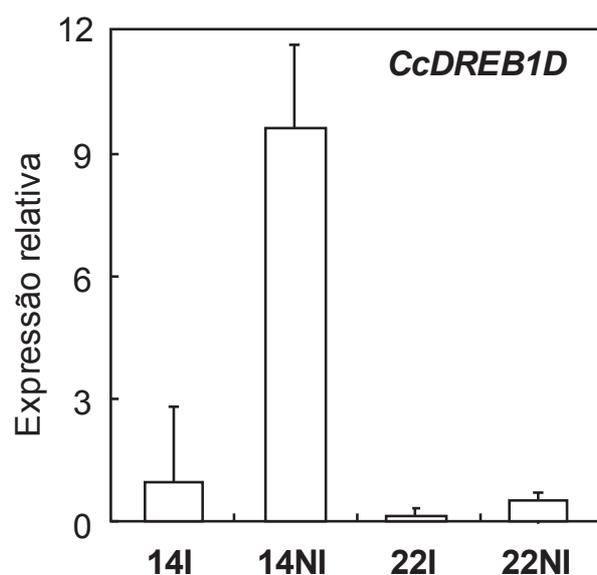


Figura 1 Expressão do gene *CcDREB1D* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas dos clones 14 (tolerante) e 22 (sensível) de *C. canephora* submetidos (NI: Não irrigado) ou não (I: Irrigado) à seca. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene endógeno (expressão constitutiva) e a amostra 14I como calibrador interno (expressão relativa = 1)

Fonte: Marraccini et al. (2012).

Essas diferenças de expressão do gene *CcDREB1D* poderiam estar correlacionadas com a presença de polimorfismos identificados na região promotora dos genes *CcDREB1D* dos clones tolerante (clone 14) e sensível (clone 22) (ALVES, 2011). No entanto, para confirmar essa hipótese, experimentos adicionais necessitam ser realizados. Assim, o presente trabalho visa avaliar, por meio da transformação de *Nicotiana tabacum* cv. SRI, a funcionalidade das regiões promotoras de diferentes alelos do gene *CcDREB1D* de *C. canephora*, por meio da capacidade de controlar a expressão do gene repórter β -glucuronidase (*uidA*) e usando várias construções formadas por deleções das extremidades 5' das mesmas sequências.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro

Nativo do continente africano, o cafeeiro chegou ao Brasil em 1723 através de mudas oriundas da Guiana Francesa. No ano seguinte, foi introduzido no Maranhão propagando-se, para os estados vizinhos, em pequenas plantações, tendo atingindo a Bahia em 1773. Algumas sementes de café foram transportadas do Maranhão para o Rio de Janeiro onde se fomentou a ampliação da cultura na Serra do Mar (ALONSO-SALCES et al., 2009).

Em 1825, as plantações alcançaram o Vale da Paraíba e os estados de São Paulo e Minas Gerais. Posteriormente, a produção se estendeu para o centro-sul cujas condições climáticas eram altamente favoráveis, atingindo o norte do Rio de Janeiro e o Espírito Santo em 1920. A cadeia produtiva do café brasileiro se destaca na história econômica e social do país desde a época colonial, contudo, a exportação de café apresentou grande êxito até o ano de 1930, quando começou a decrescer em virtude do surgimento de crises internacionais (ALONSO-SALCES et al., 2009).

2.1.1 Importância e economia

Atualmente, o café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo, sendo responsável por quase metade do total das exportações de produtos tropicais além de ser o segundo maior, no mercado mundial de produtos naturais, depois do petróleo, e fonte de renda para muitos países em desenvolvimento (BAKER et al., 2001).

As duas espécies do gênero *Coffea* que são responsáveis por quase toda a produção dos grãos de café são: *C. arabica* (Arábica) e *C. canephora*

(Robusta), representando, respectivamente, 65% e 35% da produção mundial (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2013), sendo o Arábica considerado superior em termo de qualidade ao Conilon devido às suas propriedades organolépticas e, portanto, possui um preço de mercado valorizado. No Brasil, o Robusta é conhecido com o nome de Conilon produzido principalmente no estado do Espírito Santo.

O Brasil, o Vietnã e a Indonésia são responsáveis por mais de 50% da produção mundial desta cultura, sendo o Brasil com 35%, o maior produtor. (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2013). O café é de primordial importância tanto para os países produtores localizados nas áreas tropicais e subtropicais, como para os países consumidores localizados principalmente na Europa e América do Norte, onde o café é torrado, misturado e embalado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013; INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2013).

2.1.2 Taxonomia e genômica

O café é uma planta perene que pertence à ordem *Gentianales*, à família *Rubiaceae*, à subfamília *Ixoroideae* e à tribo *Coffea* que é composta por dois gêneros: *Coffea* e *Psilanthus*, estes juntos, abrangem mais de 125 espécies (DAVIS et al., 2011). O gênero *Coffea*, que teve seu centro de origem na África, contém as três espécies utilizadas na produção de bebida do café: *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica* (DAVIS et al., 2006). Em nível botânico, as plantas de *Coffea* são dicotiledôneas, de folhas persistentes e flores hermafroditas, de porte arbustivo ou arbóreo e caule lenhoso (FAZUOLI et al., 2000). Evolutivamente, o início da diversificação deste gênero ocorreu entre 5 e 25 milhões de anos atrás (CUBRY et al., 2008).

As plantas da espécie *C. canephora* são diploide ($2n = 2 \times = 22$), alógamas e possui uma alta variabilidade genética e capacidade de se adaptar às mais variadas condições climáticas (BERTRAND et al., 2003). Elas são adaptadas às planícies equatoriais com ambientes quentes e úmidos. Esta espécie é agrupada em dois grupos distintos denominados Congolês e Guineano, estabelecidos de acordo com sua origem geográfica (DUSSERT et al., 1999; MONTAGNON et al., 2012) (Figura 2). O grupo Congolês apresenta vários subgrupos dentre os quais existem dois de maior importância (MONTAGNON, 2000; FAZUOLI et al., 2007):

- O subgrupo SG1 (tolerante à seca), localizado na região mais litorânea da bacia do rio Congo, com períodos de seca;
- O subgrupo SG2 (sensível à seca) localizado na floresta equatorial com índices pluviométricos elevados e bem distribuídos ao longo do ano.

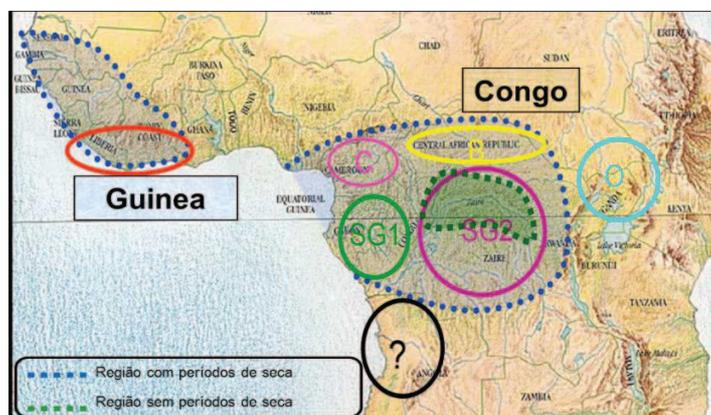


Figura 2 Grupos de distribuição da diversidade de *Coffea canephora*. As linhas pontilhadas delimitam regiões com distribuição pluviométrica distintas. O Subgrupo SG1 originou-se em uma região de clima mais árido, enquanto o SG2 é típico de uma região de clima equatorial

Fonte: MONTAGNON, 2000.

Estudos de filogenia mostram que as plantas de Conilon presentes no Brasil são geneticamente semelhantes àquelas do subgrupo SG1 de *C. canephora* (LAMBOT et al., 2008). Na variedade Conilon, encontram-se plantas tolerantes à seca por proporcionar um maior controle de transpiração (DAMATTA; RAMALHO, 2006) e também plantas altamente resistentes ao fungo *Hymeleia vastatrix* causador da ferrugem das folhas (CARVALHO et al., 2001). Assim, plantas de Conilon são alvos de várias pesquisas que objetivam a introdução desta variedade em regiões de baixa altitude, que possuem temperaturas médias anuais elevadas (de 22°C a 26°C) e, principalmente, em regiões com um período seco mais prolongado (FAZUOLI, 1986).

A bebida preparada a partir dos grãos de *C. canephora* dá um café neutro, de fraco sabor e, ocasionalmente, com um amargor forte e pronunciado (LEROY et al., 2006).

Do outro lado, *C. arabica* é uma espécie alotetraploide ($2n = 4x = 44$) originada a 1 milhão de anos a partir da hibridização natural de dois genomas ancestrais diploides: *C. canephora* e *C. eugenioides* (LASHERMES et al., 1999) (Figura 3). Ela destaca-se como a espécie cultivada principalmente em ambientes de planalto. A origem de *C. arabica*, a partir de duas espécies com genomas muito parecidos, faz com que a meiose nessa espécie tetraploide seja como uma meiose de espécie diploide, apresentando um pareamento regular dos bivalentes cromossômicos (HERRERA et al., 2004). Como consequência de sua história evolutiva e autogamia, as plantas de *C. arabica* têm uma estreita base genética, pois a difusão inicial a partir de seu centro de origem, a Etiópia, para o Iêmen, baseou-se em uma população limitada. Esta característica é ampliada nos principais genótipos cultivados como, Mundo Novo, Catuaí e Caturra, que foram selecionados a partir de apenas duas populações base: Typica e Bourbon (ANTHONY et al., 2002).

C. arabica é a espécie mais cultivada devido à qualidade da bebida superior quando comparada com outras espécies (LEROY et al., 2006). Essa qualidade depende principalmente da quantidade de compostos, tais como açúcares e outros bioquímicos precursores da qualidade, armazenados no endosperma do fruto durante a maturação (GEROMEL et al., 2006; JOËT et al., 2009; PRIVAT et al., 2008) dando uma bebida leve, frutada e acidulada.

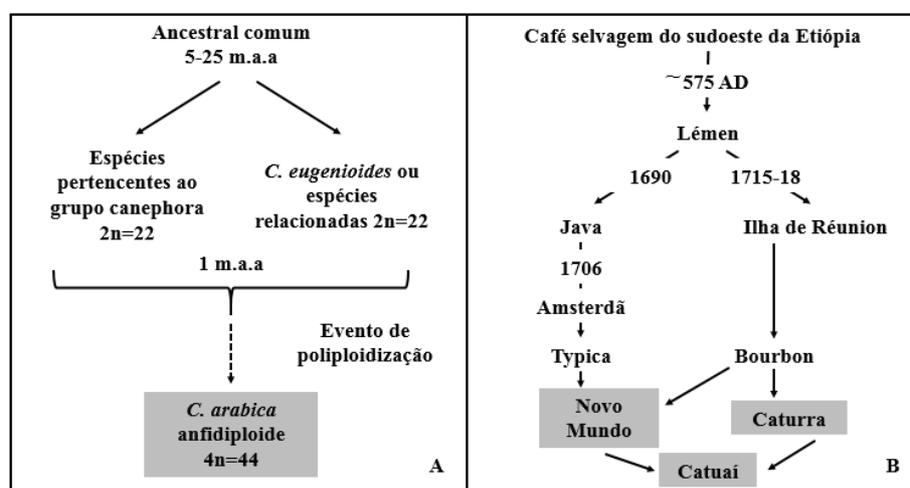


Figura 3 História evolutiva do alotetraploide *C. arabica*. (A) Origem de *C. arabica*. Os genomas dos progenitores estão representados pelos diploides *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu há cerca de 1 milhão de anos (m.a.a) a partir do cruzamento de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*. (B) Origem das principais cultivares atuais de *C. arabica*

Fonte: Adaptado de VIDAL et al. (2010).

2.2 Estresse abiótico (aspectos gerais)

As plantas podem ser expostas a vários estresses abióticos (condições ambientais adversas) tais como a seca, o excesso de salinidade e as temperaturas extremas (tanto altas como baixas) durante seu ciclo de vida. Esses fatores

ambientais limitam severamente o crescimento e a reprodução das plantas e, conseqüentemente, a produtividade agrícola em caso de plantas de cultivo intenso. Dentre todos os tipos de estresses abióticos, a desidratação e os extremos de temperatura são os que mais afetam o desenvolvimento vegetal. As plantas respondem ao déficit hídrico, como também às altas e baixas temperaturas, com diversas respostas fisiológicas e moleculares (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Uma das respostas é a expressão de um grande número de genes, cujos produtos (as proteínas) podem estar envolvidos em diversas funções adaptativas (THOMASHOW, 1999). Genes induzidos durante os estresses abióticos codificam proteínas que funcionam no controle da expressão gênica e na transdução de sinal, bem como as proteínas envolvidas, por exemplo, na proteção e na detoxificação das células (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; SHINOZAKI et al., 2003).

Múltiplas vias de sinalização regulam as respostas de estresse nas plantas (KNIGHT; KNIGHT, 2001) e existe uma sobreposição entre os padrões de expressão de genes que são induzidos em resposta a diferentes fatores de estresses (SEKI et al., 2001; CHEN et al., 2002). Embora sejam conhecidos, razoavelmente, os efeitos gerais da seca no crescimento das plantas, os efeitos primários do déficit hídrico em níveis bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (ZHU, 2002; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

A fim de evitar perdas adicionais de água, a planta promove o fechamento dos estômatos resultando no bloqueio de dióxido de carbono (CO₂) e conseqüente alteração na taxa fotossintética. Nas espécies mais susceptíveis, o estresse oxidativo ocasiona a desintegração das membranas e promove a redução do conteúdo de clorofila (DAMATTA et al., 2003). A redução do fluxo de vapor e da absorção de água e nutrientes pelo sistema radicular resultam na diminuição

da produção (MATIELLO e DANTAS, 1987; KUMAR, 1999). A escassez de água no ambiente leva à perda do turgor celular, ao aumento da concentração do citossol e à consequente desidratação do protoplasma (PINHEIRO et al., 2005).

Estudos prévios, no gênero *Coffea*, sugerem que os mecanismos fisiológicos responsáveis pela manifestação da tolerância em cafeeiro estão diretamente relacionados à sensibilidade dos estômatos ao déficit hídrico no solo ou na atmosfera (PINHEIRO et al., 2005). A sensibilidade da condutância estomática em *C. arabica*, apresentando oscilações à variação de 1/3 do aporte de água no solo, faz dessa propriedade fisiológica um ótimo indicador do nível de água acessível à planta. Plantas de *C. canephora*, por sua vez, apresentam controle estomático menos responsivo às variações no nível de água do solo (FAHL et al., 2001).

2.2.1 Respostas ao estresse abiótico

O déficit hídrico em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). Uma mudança no potencial osmótico, através da membrana plasmática, pode ser a maior causa de respostas ao estresse hídrico em nível molecular (BRAY, 1993). Também, alterações na conformação da membrana celular provocam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modifica a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais embebidas nas membranas celulares, e altera a continuidade entre a parede e a membrana celular (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). A percepção do déficit hídrico (seca) celular precisa ser traduzida em compostos

bioquímicos e metabólitos, gerando uma consequente resposta fisiológica ao estresse (INGRAM; BARTELS, 1996).

As proteínas sintetizadas em resposta à seca podem ser classificadas em três grandes grupos (SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005):

- a) Proteínas que protegem a planta contra os estresses ambientais;
- b) Proteínas implicadas na transdução de sinais de resposta aos estresses e na regulação (fatores de transcrição) da expressão gênica;
- c) Proteínas de funções desconhecidas.

O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam protegendo as células da desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores tais como prolina e betaínas, proteínas LEA (*“Late Embryogenesis Abundant”*), chaperonas e enzimas detoxificadoras. Os níveis de moléculas osmoprotetoras geralmente aumentam durante o estresse (Figura 4).

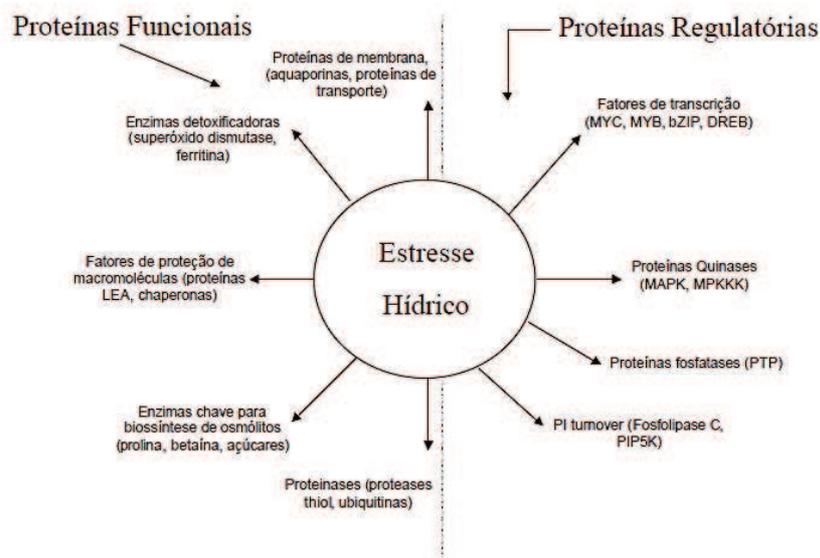


Figura 4 Genes induzidos durante o estresse hídrico, salino e ao frio e suas possíveis funções na tolerância e resposta ao estresse

Fonte: SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007 (adaptado).

O segundo grupo inclui os fatores de transcrição (FTs) que desempenham um papel fundamental na resposta da planta ao estresse, por meio da ativação de genes específicos (SEKI et al., 2003). Até o momento, foram descritas quatro vias de transdução de sinais envolvidas na resposta da planta ao déficit hídrico: duas vias (I e II) ABA (ácido abscísico) dependentes e as outras (III e IV) ABA não dependentes (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

A via ABA dependente de tipo I requer a síntese de certas proteínas para ativar os FTs MYC/MYB (ABE et al., 1997) e/ou bZIP, os quais se ligam a regiões do DNA como os ABREs (*ABA-Responsive Elements*) e elementos tais

como CE1 e CE3 (*Coupling Elements*) (SHEN; HO, 1995; SHEN et al., 1996). A via ABA dependente tipo II ativa o fator de transcrição bZIP (NAKAGAWA et al., 1996; HOLLUNG et al., 1997) o qual aciona a expressão gênica pela ligação com os elementos ABA responsivos ABREs.

A via ABA não dependente tipo III compreende alguns genes induzidos pela seca que não respondem ao ABA nem ao frio. Estes genes incluem o ERD1 (*Early Responsive to Dehydration 1*), que codifica para uma subunidade regulatória da protease Clp (NAKASHIMA et al., 1998). A via ABA não dependente tipo IV induz a expressão gênica pela ativação das proteínas DREB (*Dehydration-Response-Element-Binding*) que se ligam ao elemento de resposta à seca DRE/CRT (*Drought Response Element/C-repeat*), levando a ativação da expressão dos genes pelo frio, excesso de salinidade e seca. Os fatores de transcrição DREBs se dividem em duas classes (CHINI et al., 2004):

- a) Os DREB1s que estão envolvidos na expressão gênica em resposta ao frio,
- b) Os DREB2s envolvidos na resposta à desidratação e à alta salinidade. Entretanto, relatos de interações entre as vias já foram descritos.

Além destas vias, muitos outros sistemas de regulação transcricional estão envolvidos na expressão de genes responsivos ao estresse. De maneira paralela, estas quatro principais vias se relacionam e convergem para a ativação de genes envolvidos na resposta ao estresse. A Figura 5 mostra um modelo das vias de transdução dos sinais de estresses bióticos e abióticos desde a percepção até a expressão gênica.

Esse esquema também permite observar que existem comunicações cruzadas (*cross-talks*) entre estas vias de sinalização, implicando fatores de

transcrição comuns para os estresses bióticos e abióticos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

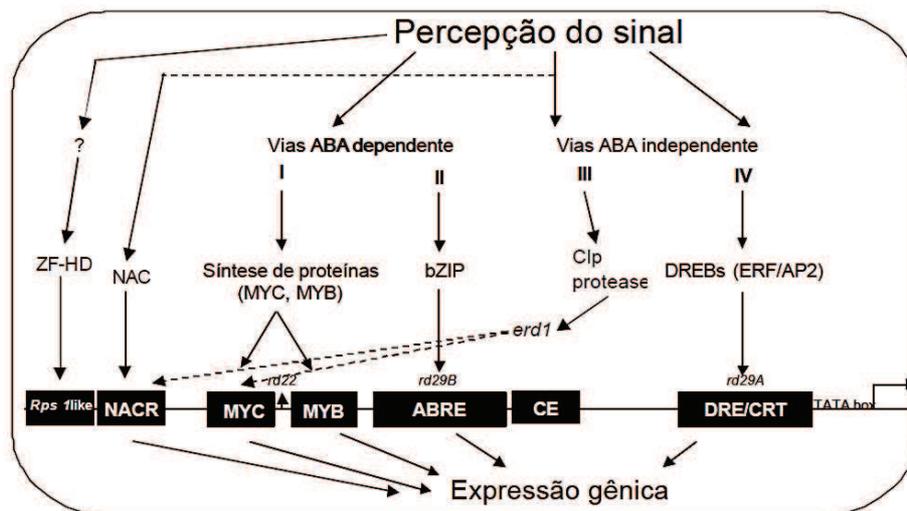


Figura 5 Redes transcricionais reguladoras de sinais de estresses biótico e abiótico e da expressão gênica

Fonte: SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007(adaptado).

Muitos genes reguladores chave são capazes de controlar um subgrupo de genes, FTs e sinalizadores celulares envolvidos na tolerância aos estresses em plantas já foram descritos e seu uso pode ser interessante no melhoramento de várias espécies via engenharia genética (UMEZAWA et al., 2006).

2.3 Regulação transcricional em eucariotos

A regulação da expressão gênica pode ocorrer em diferentes estádios e, pode ser particularmente importante durante a transcrição (Figura 6). Para a maioria dos genes que codificam proteínas, o início da transcrição inclui a

ligação e ativação da RNA polimerase II que é responsável pela síntese dos RNA mensageiros (mRNAs).

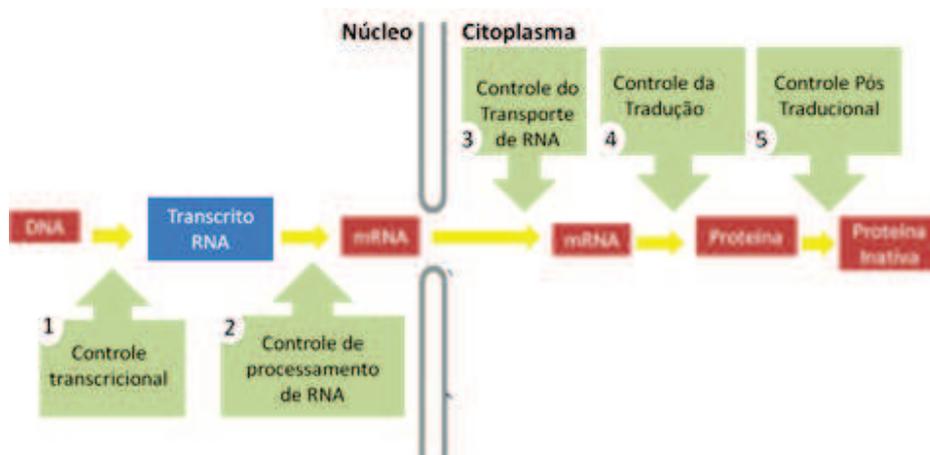


Figura 6 Pontos de controle da expressão gênica: (1) Controle transcricional; (2) Controle de processamento de RNA; (3) Controle do transporte de RNA; (4) Controle da tradução; (5) Controle pós-traducional
Fonte: ALBERTS, 2002 (adaptado).

O processo de transcrição ao nível basal é dependente de sequências encontradas no promotor mínimo (núcleo promotor) (Figura 7), onde estão os sítios de ligação para fatores de transcrição (FTs) e da RNA polimerase.

Elementos *cis*, encontrados em regiões a montante do núcleo promotor, permitem a ligação de proteínas regulatórias ativadoras ou repressoras responsáveis por modular os níveis da transcrição. A junção de todos esses elementos compõe um conjunto de módulos importantes no controle do perfil de expressão global de um gene, direcionando ou prevenindo a transcrição temporal e espacial apropriada. Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e ocorrem por meio de uma intrincada rede de interações envolvendo todos esses elementos (ALBERTS et al., 2002; LEWIN, 2009).

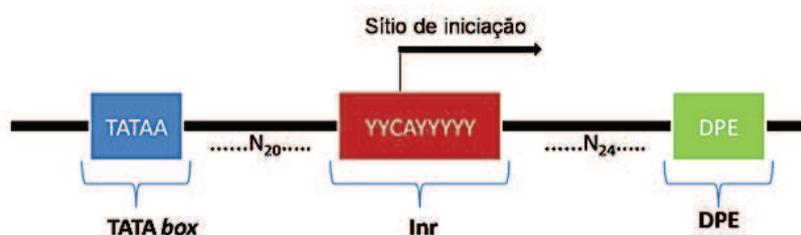


Figura 7 O promotor mínimo da RNA polimerase II pode apresentar um TATA box a aproximadamente 30 pb a montante do sítio de iniciação da transcrição (Inr). Os promotores sem TATA box podem apresentar o elemento promotor a jusante (DPE). O TATA box possui geralmente a sequência consenso TATAA. O Inr possui bases pirimídicas (Y) ao redor de um núcleo conservado de CA (citosina e adenina). A sequência apresenta a fita codificadora

Fonte: LEWIN, 2009 (adaptada).

A região promotora de um gene eucarioto, em geral, possui sequências semiconservadas. Uma destas sequências denominada “TATA Box” (T/A) A (A/T) AAT) encontra-se a aproximadamente 30 pb a montante do sítio de início da transcrição. Elementos promotores proximais também estão localizados a cerca de 100 (CCAAT Box) e 200 pb (GC Box) a montante do ponto de início da transcrição. Os elementos contidos em tais sequências normalmente determinam o ponto correto de início da transcrição, bem como o local e o momento em que esse processo biológico deverá ocorrer.

Os elementos *cis* podem estar localizados a centenas ou milhares de pares de base de distância do gene que controlam. Eles podem ser encontrados à montante, à jusante, ou no interior da região codificadora, e mesmo em regiões de cromossomos estruturalmente adjacentes. Os elementos ativadores ou potencializadores são motivos de sequências curtas que contêm locais de ligação para os FTs e ativam genes-alvo independente da orientação (KOLOVOS et al., 2012). Enquanto muitos dos elementos *cis* ativadores mostram-se necessários para a máxima ativação da transcrição de um gene, poucos elementos *cis*

repressores, referidos como silenciadores, têm a capacidade de reprimir a expressão gênica (ALBERTS et al., 2002; LEWIN, 2009).

Promotores apresentam inúmeros sítios de ligação para FTs específicos, que por sua vez são ativados sob diversos estímulos, tais como hormônios endógenos (auxinas, giberilinas, ácido salicílico, dentre outros) e fatores exógenos (luz, pressão, umidade e temperatura). Destacam-se entre os promotores constitutivos usualmente empregados na produção de plantas geneticamente modificadas (PGMs) o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S), os promotores dos genes que codificam respectivamente a nopalina sintetase (NOS) e octopina sintetase (OCS) de *A. tumefaciens*. Apesar dos avanços com o uso desses promotores, os padrões de expressão dos transgenes submetidos à regulação dos mesmos são variados e, baixos em alguns casos (ZHENG; MURAI, 1997; GREEN et al., 2002), não havendo garantia de expressão no órgão/tecido adequado (NEUTEBOOM et al., 2002). O uso desses promotores ubíquos determina a expressão do produto gênico em todos os órgãos da planta, o que nem sempre é desejável.

De acordo com o tipo de regulação da expressão gênica, os promotores usados na engenharia genética de plantas são tradicionalmente divididos em três categorias:

- a) Promotores constitutivos (ativos continuamente na maioria ou em todos os tecidos);
- b) Promotores espaço-temporais (desenvolvimento estágio-específico ou atividade tecido-específica);
- c) Promotores induzíveis (regulados por sinais físicos ou químicos externos).

A utilização de vários genes em uma única planta transgênica requer o uso de diferentes promotores para evitar o silenciamento de genes o que ocorre, muitas vezes, em plantas transgênicas com múltiplas cópias do mesmo promotor (MOURRAIN et al., 2007). Para resolver esse problema, é necessário isolar promotores tecido-específicos ou induzíveis para controlar a expressão do gene-alvo (YE et al., 2000).

2.4 Elementos *cis* da região promotora do gene *CcDREB1D* de *C. canephora*

Vários elementos *cis* conservados participam na regulação da expressão gênica em *C. canephora* como, TATA-, CATA- e CGCG-BOX.

Outros elementos *cis* comumente encontrados em promotores de genes responsivos ao déficit hídrico e ao frio também são observados em *C. canephora*, dentre os quais, os motivos ABRE, DRE, MYB e MYC que são reconhecidos pelos FTs pertencentes às famílias bZIP, ERF/AP2, bHLH e CE1, respectivamente (Tabela 1). Esses elementos estão presentes na sequência consenso oriunda da montagem *in silico* das regiões promotoras dos clones 14 e 22 de *C. canephora* (Figura 8).

Os FTs pertencentes às famílias bZIP, bHLH e CE1 são conhecidos como atuantes na via de resposta à desidratação dependente de ABA. Entretanto, a família ERF/AP2 de FTs, na qual estão incluídas as proteínas DREB, participa da via independente de ABA (LIU et al.; 1998). Essa aparente contradição pode ser explicada pelo fato de que existem interações (corregulações) entre as vias dependente e independente de ABA (AGARWAL et al., 2006). Dubouzet et al.(2003) e Shen et al. (2003) comprovaram que os genes isolados de arroz (*OsDREB2A*) e de trigo (*TaDREB1*) codificando os FTs DREB2 são induzidos pela adição de ABA exógeno.

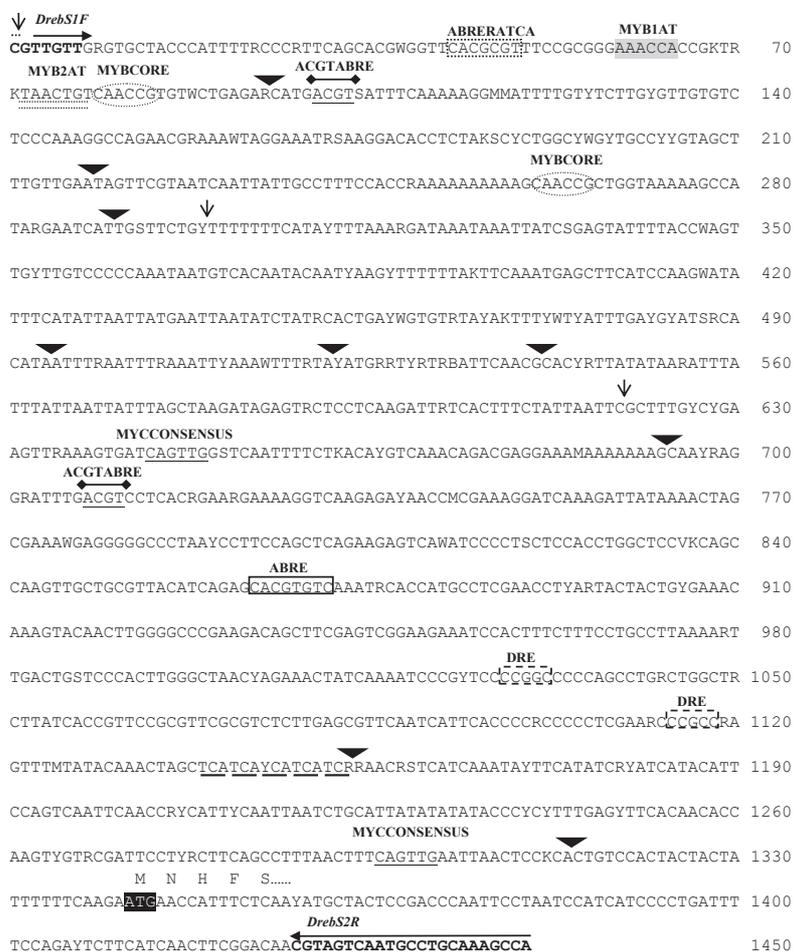


Figura 8 Sequência consenso do promotor, excluindo INDELS (inserções/deleções), de haplótipos de *DREB1D* e seus elementos *cis* implicados na resposta das plantas aos estresses térmicos e de déficit hídrico. A sequência do promotor representa uma sequência consenso dos clones 14 e 22 e o código IUPAC (R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=G/C, B=G/T/C, V=G/A/C) indica os sítios polimórficos entre esses dois clones. Sombreamento preto indica o local de início de transcrição (+1). A seta de cabeça para baixo (↓) indica os diferentes fragmentos do promotor usado nos experimentos de transformação genética de *Nicotiana tabacum*. Inserções são indicadas por (▼) e (—) indica repetições de núcleo de microsatélite.
 Fonte: (ALVES, comunicação pessoal).

Tabela 1 Elementos nucleicos *cis* implicados na resposta das plantas aos estresses térmicos e de déficit hídrico (ALVES, comunicação pessoal)

Elementos <i>cis</i>	Sequências	Tipo de fatores de transcrição que se ligam aos elementos <i>cis</i>	Gene	Condições de estresse
ABRE	CACGTGTC	bZIP	O sem	Défice hídrico, ABA
ABRERATCA	CACGCGT	bZIP	RAB16	Défice hídrico, ABA
ACGTABRE	ACGTGTC	bZIP	RD29B	ABA
DRE	CCGNC	ERF/AP2	RD29A	Défice hídrico, frio
MYB	CNGTTR	bHLH	RD22	Défice hídrico, ABA
MYB1AT	AAACCA	bHLH	RD22	Défice hídrico, ABA
MYB2AT	TAACTG	bHLH	RD22	Défice hídrico, ABA
MYC	CAGTTG	CE1	RD22	Défice hídrico

2.5 Promotores de genes do cafeeiro

Proteínas de armazenamento de sementes são expressas em níveis elevados e seus promotores tornaram-se alvo atraente para uso em PGMs. Ensaio de atividade enzimática GUS com o promotor do gene *CaCSPI*, responsável por codificar a proteína de armazenamento globulina 11S em sementes de *C. arabica*, bem como de suas deleções 5', foram inseridas em *N. tabacum* e revelaram a capacidade de forte regulação (alta expressão do gene *uidA*), em comparação ao promotor constitutivo CaMV35S (oriundo do vírus do mosaico da couve-flor) além da especificidade no endosperma das sementes (MARRACCINI et al., 1999).

Outros promotores de cafeeiro foram também testados em plantas transgênicas de *N. tabacum* tal como o promotor do gene *CaRBCS1* codificando a subunidade menor da ribulose 1,5-bis-fosfato carboxilase - Rubisco (MARRACCINI et al., 2003) e do gene *CaMXMT-1* codificando a N-metil

transferase (NMT) (SATYANARAYANA et al., 2005). O trabalho de Marraccini et al. (2003) destaca *cis* elementos responsivos à luz (LRE para *light responsive element*) no promotor do gene *CaRBCS1* que se expressa especificamente nas folhas de *C. arabica*. Tal elemento é extremamente conservado em promotores de plantas superiores e apresenta relação direta no controle transcricional inclusive no cafeeiro. Por sua vez, o grupo que isolou o promotor *CaMXMT-1* (SATYANARAYANA et al., 2005) foi o primeiro a relatar a clonagem do promotor de um gene envolvido na via de biossíntese da cafeína e os autores mencionam o interesse na utilização do promotor isolado de *C. canephora*, visando o estudo dos mecanismos moleculares e bioquímicos capazes de regular a produção da cafeína, bem como para a possibilidade de silenciamento do gene que codifica a enzima NMT pela regulação transcricional.

Recentemente, Cotta et al. (2013) isolaram e fragmentaram o promotor do gene *CaLTP3* (*Coffea arabica* Lipid Transfer Protein). O fragmento todo, e uma série de deleções 5' foram fundidos com o gene repórter β -glucuronidase (*uidA*) e analisados em plantas transgênicas de *N. tabacum*. Os fragmentos menor (345 pb) e médio (827pb) da região promotora do gene *CaLTP3* mostraram-se tecido-específicos, dirigindo a expressão do gene *uidA* nas sementes das plantas transgênicas de *N. tabacum*.

Dessa maneira, pode-se afirmar que todos os promotores de cafeeiro que foram testados sem *N. tabacum* funcionam corretamente (tanto em força, como em especificidade), o que possibilita testar com sucesso outros promotores tais como o do gene *CcDREB1D*.

2.6 Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro

A introdução direta de genes por engenharia genética em um genoma vegetal receptor, independente de barreiras geográficas e incompatibilidades

biológicas entre espécies, parece uma solução atraente e rápida para melhorar a tolerância a diversos estresses (DUNWELL, 2000) e particularmente à seca (WANG; VINOGRAD; ALTMAN, 2003).

A diversidade genética de cultivares de *C. arabica* é relativamente pequena e a sua ampliação torna-se importante para o futuro do melhoramento do cafeeiro. Assim, a transgenia apresenta-se como uma alternativa promissora para agregar características fenotípicas de interesse como resistência a patógenos, tolerância à seca ou a qualidade da bebida (RIBAS et al., 2006, MISHRA; SLATER, 2012).

As transformações genéticas de cafeeiro obtidas até o momento foram alcançadas usando vários tipos de explantes (folhas, calos embriogênicos, embriões somáticos, protoplastos, etc.) e métodos de transferência de genes como a transformação mediada por *A. tumefaciens* ou por *A. rhizogenes* e biobalística (REZENDE et al., 2012).

Alguns grupos de pesquisa (SPIRAL et al., 1993; VAN BOXTEL et al., 1995) obtiveram sucesso na transformação genética de plantas de cafeeiro, mas ainda se trata de um processo difícil, no qual apenas alguns genes foram transferidos com êxito para genótipos de cafeeiro (SPIRAL et al., 1999).

As primeiras plantas transgênicas de café foram obtidas expressando o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cryIAc*) que confere resistência a lepidópteros (SPIRAL et al., 1999; LEROY et al., 2000). O bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) é um exemplo de lepidóptero responsável pela degradação das folhas e, conseqüente, queda de produção. Através da transformação via *A. tumefaciens*, Spiral et al. (1999) obtiveram êxito na transferência do gene *cryIAc* em genótipos de *C. canephora* e de *C. arábica*. A caracterização molecular evidenciou que 69% das plantas transformadas continham uma única cópia do T-DNA e que a expressão da proteína CryIAc foi obtida nas folhas de 18 das 23 plântulas testadas (LEROY et al., 2000).

A transgenia também tem sido empregada para modificar a biossíntese de etileno e de cafeína. Pesquisadores da Universidade do Havaí patentearam a introdução do gene que codifica as enzimas ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) sintase e ACC oxidase em orientação antisense para reduzir a síntese de etileno e, assim, controlar a maturação dos frutos (STILES et al., 2003).

Assim, genes e promotores específicos devem ser testados primeiramente em plantas heterólogas com alta capacidade de regeneração *in vitro*, compatibilidade com sistemas de transformação e ciclo de vida curto, como plantas de *N. tabacum*.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente a região promotora de diferentes haplótipos do gene *CcDREB1D*, isolados a partir dos clones 14 (tolerante) e 22 (sensível) de *C. canephora*, por meio da capacidade em controlar a expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas de *N. tabacum*.

3.1 Objetivos específicos

- a) Estabelecer plantas *in vitro* de *N. tabacum* para a etapa de transformação genética;
- b) Transformar plantas de *N. tabacum* com as diferentes construções pDREB::*uidA*;
- c) Regenerar e caracterizar molecularmente essas plantas transgênicas de *N. tabacum*;
- d) Estabelecer condições ideais de estresse térmico e hídrico para testar a funcionalidade das construções pDREB1D::*uidA*;
- e) Analisar a expressão do gene repórter *uidA* das plantas regeneradas por meio de ensaios histoquímicos visando detectar a atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) em tecido foliar exposto ou não a diferentes ensaios de estresse abiótico (térmico e hídrico);
- f) Avaliar a expressão do gene *uidA* pela técnica de PCR (convencional e quantitativa em tempo real-qPCR).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, credenciado pela CTNBio para desenvolver trabalhos de pesquisa com organismos geneticamente modificados.

Alves (2011) em seu trabalho identificou *in silico* polimorfismos nas regiões promotoras do gene *CcDREB1D* nos clones 14 (tolerante) e 22 (sensível). Ambos os clones, 14 e 22, são heterozigóticos. O clone 14 possui os haplótipos, hp15 e hp16, já o clone 22 possui os haplótipos, hp15 e hp17. Ou seja, ambos compartilham um mesmo haplótipo, o hp15. Assim, objetivando compreender a expressão diferencial do gene *CcDREB1D*, o mesmo realizou o isolamento das regiões promotoras dos haplótipos 15 (hp15), 16 (hp16) e 17 (hp17) e uma série de deleções 5' dessas sequências (Figura 9). Os fragmentos resultantes foram subclonados em vetor pGEM-T Easy e sequenciados para verificar se não ocorreu erros e mutações. Os diferentes fragmentos foram inseridos independentemente no sítio de clonagem do vetor binário pBI101 (Clontech) e nomeados da seguinte maneira: pD14-hp15P, pD14-hp15D, pD14-hp16P, pD14-hp16M, pD14-hp16D, pD22-hp17P e pD22-hp17D, sendo P (-762/+1), M (-1113/+1), D (-1466/+1) (ALVES, comunicação pessoal) e assim, transferidos para o laboratório ao LGM.

Paralelamente aos ensaios descritos a seguir, todas as construções enviadas ao LGM foram utilizadas em ensaios de transformação realizados por Alves em plantas homólogas de *C. arabica*.

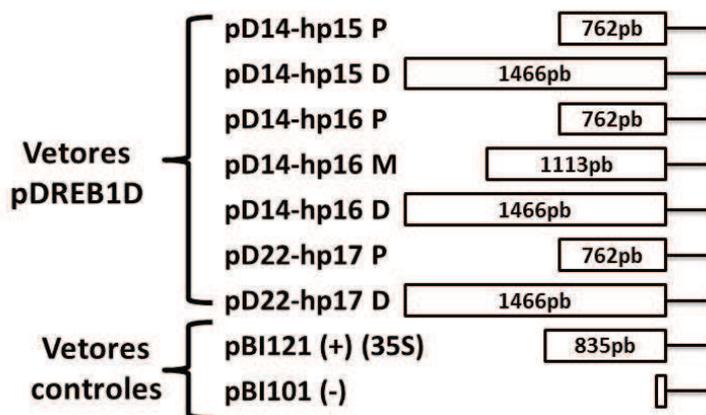


Figura 9 Mapa esquemático das construções utilizadas neste estudo
Fonte: (ALVES, comunicação pessoal).

Resumidamente temos os vetores binários recombinantes construídos da seguinte maneira: o gene *NPTII* codificando para a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência à canamicina das células vegetais transformadas, um dos fragmentos promotores do gene *CcDREB1D* clonados no lugar do promotor constitutivo CaMV35S, a região codificadora do gene *uidA* e o gene *NPTI* codificando para a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência à canamicinadas células bacterianas transformadas (Figura 10).

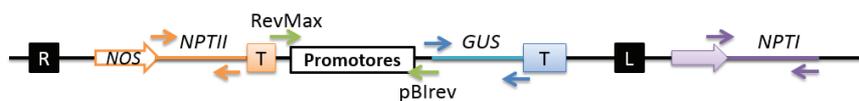


Figura 10 Representação esquemática do T-DNA com os pares de *primers* usados (APÊNDICE A)

4.1 Confirmação da identidade dos plasmídeos recombinantes pDREB1D::*uidA*

Objetivando confirmar a identidade dos (7) plasmídeos recombinantes pDREB1D::*uidA* recebidos antes que eles fossem amplificados em *E. coli* XL10 GOLD e transferidos em *A. tumefaciens* EHA105 para realizar a transformação genética das plantas de *Nicotiana tabacum* cv. SRI, as construções foram testadas por digestão enzimática usando a enzima de restrição *PvuII* e por PCR usando o par de *primer* pBIrev/RevMax (APÊNDICE A).

A digestão enzimática foi realizada para um volume final de 20 μL utilizando a enzima *PvuII* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. A reação da digestão foi incubada a 37 °C por 2 horas.

A PCR foi realizada para um volume final de 25 μL utilizando a enzima GoTaq® DNA polimerase (Promega). Todas as amplificações foram realizadas seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram incubadas no termociclador T100 (Bio Rad) programado com temperatura de desnaturação inicial de 95°C, por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C, por 3 minutos, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da digestão enzimática e da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose acrescido de brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), posteriormente visualizados sob luz ultravioleta. A imagem foi captada pelo foto-documentador da Loccus Biotecnologia.

Após confirmação da identidade, cada plasmídeo recombinante e dois controles (pBI121: expressão constitutiva do gene *uidA* por meio do uso do promotor CaMV35S, pBI101: controle negativo com expressão nula do gene *uidA*) foram introduzidos em *E. coli* para multiplicação do plasmídeo e em seguida introduzidos em *A. tumefaciens* EHA105 para transformação genética

das plantas de *Nicotiana tabacum* cv. SRI, advindas de sementes cedidas pela EMBRAPA – Agroenergia, conforme descrição a seguir.

4.2 Preparo dos explantes

Sementes de *N. tabacum* cv. SRI foram esterilizadas com hipoclorito 1% acrescido de Tween-20 0,01% por 15 minutos e lavadas seis vezes em água estéril. As sementes foram semeadas individualmente em frascos de vidro contendo 50 mL de meio constituído de MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas a 28°C por 4 semanas. As folhas das plântulas foram removidas após o período descrito e cortadas em segmentos de 1 cm² com o auxílio de lâmina de bisturi estéril, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril para manter os explantes hidratados e estes usados nos experimentos de transformação genética.

4.3 Preparo de células competentes de *Escherichia coli* e transformação por choque térmico

Com a alça de platina foram feitas estrias do estoque em glicerol da cepa bacteriana *E. coli* XL10 GOLD em placa contendo meio LB sólido (Anexo) (Miller, 1972) e a mesma foi incubada durante 16 horas, a 37°C. Uma colônia isolada foi transferida para 5 mL de meio LB e incubado por mais 16 horas, a 37°C, em agitador rotativo com 500 rpm (Tecnal TE-421). Foi transferido 1 mL desse inóculo para 50 mL de LB e incubado por um período de 3 horas, a 37°C, sob agitação (500 rpm). Em seguida, a densidade óptica foi medida para assegurar que o número de células não ultrapassasse 10⁸ células/mL (OD₆₀₀ = 0,5). Assim que a OD₆₀₀ foi atingida, o inóculo foi centrifugado por 5 minutos, a

3300 g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 15 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos, a 3300 g a 4°C e novamente o sobrenadante foi descartado e outra lavagem com 15 mL de CaCl₂ 0,1 M foi feita. Após centrifugar (5 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de CaCl₂ 0,1 M acrescido de glicerol 10% e aliquotadas.

Foi adicionado aproximadamente 20 ng de DNA de cada plasmídeo recombinante (pD14-hp15P, pD14-hp15D, pD14-hp16P, pD14-hp16M, pD14-hp16D, pD22-hp17P e pD22-hp17D) e dois controles (pBI121 e pBI101) em 100 µL da suspensão celular, misturados cuidadosamente e incubados por 30 minutos em gelo. Em seguida, os tubos contendo o DNA plasmidial e a suspensão de células competentes foram transferidos para banho seco a 42°C durante 90 segundos e rapidamente transferidos para gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio SOC (Anexo) (SAMBROOK; RUSSELL, 1989) em cada tubo e estes incubados a 37°C, por 45 minutos em agitador rotativo com 500 rpm. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (16100 g, 30 segundos), sendo 800 µL de meio eliminados e as células ressuspensas e plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (100 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

4.4 Miniextração de plasmídeos

Após verificar o crescimento das colônias nas placas, uma colônia de cada plasmídeo recombinante foi inoculada em 3 mL de meio LB acrescido de canamicina (100 mg.L⁻¹) e incubadas a 37°C por 16 horas, em agitador rotativo com 500 rpm. Foram aliquotados 1,5 mL de cada cultura e estes centrifugados a 16100 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos invertidos sobre papel toalha por alguns minutos. Foram adicionados 150 µL de

solução I (Anexo) em cada tubo e estes agitados em vórtex até que as células fossem ressuspensas. Em seguida, foi adicionado 1 μL de RNase A ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e os tubos deixados em temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 250 μL de solução II (Anexo) e a mistura homogeneizada nos tubos por inversão (10x). Adicionou-se também 150 μL de solução III (Anexo) em cada tubo e foi feita a homogeneização por inversão (10x). Durante 10 minutos, os tubos foram deixados no gelo e depois centrifugados por 10 minutos, a 16100 g a 4°C . O volume total do lisado foi transferido para novos tubos. Foi adicionado 1 mL de isopropanol 100% gelado a cada tubo e novamente centrifugou-se por 10 minutos a 16100 g , 4°C . O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial foi lavado com adição de 1 mL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação de 5 minutos. O sobrenadante foi removido e os tubos foram incubados em banho seco a 37°C por 15 minutos para evaporação dos resíduos de etanol. O DNA foi ressuspendido em 50 μL de água deionizada.

Para verificar a identidade das amostras, os plasmídeos extraídos foram quantificados em espectrofotômetro (NanoVue Plus spectrophotometer) pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm e submetidos à eletroforese em gel de agarose.

Uma PCR com o par de *primer* pBIrev/RevMax também foi feita de acordo com o protocolo descrito anterior (ver sessão 4.1).

4.5 Preparo de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e transformação por eletroporação

Com a alça de platina, uma colônia isolada da cepa de *A. tumefaciens* receptora EHA105 foi coletada e transferida para 3 mL de meio YEB (Anexo) acrescido de rifampicina ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e incubado a 28°C , em agitador rotativo

com 300 rpm, por 6 horas. Após o período de incubação, retirou-se 2 mL desse pré-inóculo e uma nova cultura celular foi iniciada em 50 mL de meio YEB acrescido de rifampicina (100 mg.L^{-1}) e incubado a 28°C (300 rpm), por 16 horas.

Em seguida, a densidade óptica (OD_{600}) foi medida para assegurar que o número de células não ultrapassasse 10^8 células/mL ($\text{OD}_{600}=0,5$). Assim que a OD_{600} foi atingida, o inóculo foi centrifugado a 13400 g por 1 minuto, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 0,5 mL de HEPES/KOH 1mM (mantido a 4°C) e novamente a suspensão foi centrifugada por 1 minuto a 13.400 g. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Após as duas lavagens com HEPES/KOH, as células foram ressuspensas em 500 μL de glicerol 10% mantido a 4°C . As células foram centrifugadas por mais 1 minuto, a 13.400 g, o sobrenadante descartado e finalmente as células ressuspensas em 20 μL de glicerol 10%. O volume de dois tubos foi misturado, resultando em um volume final de 40 μL .

Aproximadamente 1 μg de DNA de cada plasmídeo recombinante (pD14-hp15P, pD14-hp15D, pD14-hp16P, pD14-hp16M, pD14-hp16D, pD22-hp17P e pD22-hp17D) e dois controles (pBI121 e pBI101) foi adicionado ao tubo com 40 μL de células competentes previamente descongeladas e em seguida o tubo foi incubado no gelo por 2 minutos.

Para a eletroporação, foram utilizadas cuvetas de 0,1 cm de espessura contendo a suspensão de células e o DNA plasmidial. A eletroporação ocorreu em *Gene Pulser* da BIO-RAD nas condições de 1.800 volts, 25 mFD de capacitância e 400 OHMs. Imediatamente após o pulso, 1 mL de meio SOC foi adicionado à suspensão que foi incubada a 28°C por 6 horas.

Foram plaqueados 100 μL da suspensão celular em meio YEB sólido contendo rifampicina (100 mg.L^{-1}) e canamicina (100 mg.L^{-1}). As placas foram

incubadas a 28 °C para crescimento bacteriano. Colônias transformadas foram coletadas para conferir a identidade das construções inseridas.

Colônias de cada evento pré-selecionadas foram testadas por PCR (ver sessão 4.1) com os pares de *primers* pBIrev/RevMax, GUS e NPTI (APÊNDICE A).

4.6 Preparo das cepas de *Agrobacterium* contendo os plasmídeos para a transformação de *Nicotiana tabacum* cv. SRI

Colônias isoladas da *A. tumefaciens* EHA105 transformadas com os plasmídeos recombinantes (pD14-hp15P, pD14-hp15D, pD14-hp16P, pD14-hp16M, pD14-hp16D, pD22-hp17P e pD22-hp17D) e os dois controles (pBI121 e pBI101) foram cultivados em 5 mL de meio de cultura líquido YEB acrescido com rifampicina (100 mg.L⁻¹) e canamicina (100 mg.L⁻¹) a 28°C em agitador rotativo com 300 rpm por 6 horas. Após 6 horas de incubação, 3 mL desse pré-inóculo foi transferido para 7 mL de meio YEB contendo os antibióticos apropriados (rifampicina e canamicina) para crescimento a 28°C (300 rpm) até atingir OD₆₀₀ = 0,6 (aproximadamente 16 horas).

As células bacterianas foram precipitadas a 2300 g por 10 minutos e ressuspensas para OD₆₀₀ 0,2 em meio YEB suplementado com 200 µM de acetoseringona.

4.7 Transformação genética e regeneração

Foi adicionado 1 mL de cultura diluída de *A. tumefaciens* em 10 mL de YEB. Os explantes foliares de *N. tabacum* cv. SRI foram imersos no inóculo e mantidos em co-cultura à temperatura ambiente por 5 minutos sob leve agitação manual. Os explantes foram transferidos para placas de Petri com papel filtro

estéril para retirar o excesso de bactérias e posteriormente inoculados em placas contendo meio MS sólido suplementado com 3% de sacarose e BAP 5 μM por 48 horas a 28°C, no escuro, mantendo a face adaxial dos explantes em contato com o meio.

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de regeneração [MS suplementado com 3% de sacarose, BAP 10 μM , cefotaxima (300 mg L⁻¹) e canamicina (100 mg L⁻¹)] e mantidos em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 28°C por duas semanas.

Os calos formados foram repicados e transferidos para novo meio de regeneração contendo agente seletivo.

4.8 Enraizamento e aclimatização

Os brotos regenerados de *N. tabacum* cv. SRI, com aproximadamente 2 cm², foram transferidos para frascos de vidro contendo meio MS suplementado com 3% de sacarose e canamicina (100 mg L⁻¹). Os brotos foram mantidos neste meio até o enraizamento.

As plantas que enraizaram (com 8-10 cm de comprimento) nos frascos de vidro foram transferidas para vasos (copos) pequenos com solo adubado quimicamente. Após a lavagem das raízes com água para retirar o meio de cultura, a planta foi colocada na terra e coberta com saco plástico transparente. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e os sacos plásticos abertos progressivamente em suas extremidades a partir do segundo dia, para permitir a aclimatização gradativa das plantas às condições da casa de vegetação (temperatura entre 27 – 30 °C e umidade controlada entre 70-80%). Após sete dias, os sacos plásticos foram completamente retirados e, posteriormente, as plantas transferidas para vasos maiores.

De maneira simplificada e ilustrativa, todos os estágios da cultura de tecidos podem ser observados na Figura 11.

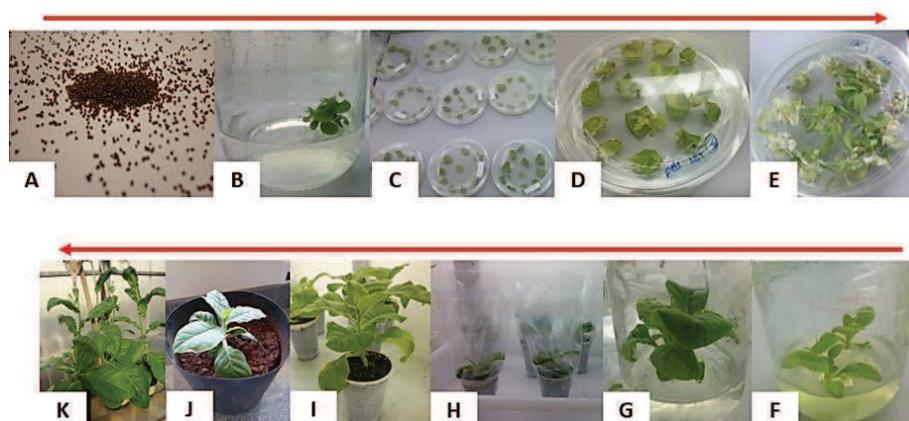


Figura 11 Estágios da cultura de tecidos envolvendo a transformação de *N. tabacum*. Plântula estabelecida a partir de semente (A e B). Explantes excisados após a co-cultura em inóculo de *A. tumefaciens* EHA105 contendo os plasmídeos recombinantes pDREB1D::*uidA*. (C e D) Brotos regenerando a partir dos discos foliares em meio MS com agente de seleção (canamicina 100 mg.mL⁻¹) após seis semanas. (E) Plântula em meio MS enraizando após oito semanas. (F). Planta *in vitro* com 11 semanas, pronta para ser aclimatizada. (G). Aclimatização- Plantas jovens de *N. tabacum* que foram transferidas dos meios de seleção para substrato vegetal (H). Crescimento e desenvolvimento das plantas T0 em terra adubada (I, J e K)

4.9 Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS)

Após a caracterização molecular, ensaios histoquímicos para a detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) foram realizados em folhas de *N. tabacum* transformadas, um evento por construção escolhido ao acaso, com os pDREB1D::*uidA* e com os vetores pBI121 (controle positivo de expressão do gene *uidA*) e pBI101 (controle negativo de expressão do gene *uidA*).

Os ensaios histoquímicos foram realizados segundo o protocolo descrito por Jefferson et al. (1987). Segmentos foliares e radiculares de *N. tabacum* foram colocados em solução contendo o substrato da enzima 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronídeo (X-glucA): tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7.0, ferrocianeto de potássio 0,5 mM, 0,1% de Triton[®]X-100, EDTA 10 mM pH 7.0, X-glucA 1 mM dissolvido em 1 mL de DMSO. Os tecidos foram incubados nesta solução durante 24 horas a 37 °C. Em seguida, foram transferidos para solução de etanol 70% (v/v) durante 48 horas com trocas esporádicas do etanol 70% (v/v), para a remoção da clorofila a fim de facilitar a observação da coloração azul.

4.10 Extração de DNA

O DNA genômico de folhas de *N. tabacum* foram extraídos pelo método de Doyle e Doyle (1987) modificado como descrito a seguir. Uma vez que as amostras foram coletadas, estas foram transferidas para tubos de 2 mL (aproximadamente 100 mg de amostra) com três esferas de aço inox e 750 μ L de tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM; CTAB 2%; EDTA 0,05 M; PVP 1%; β -mercaptoetanol 2%). No equipamento Mini-BeadBeater 96 (Biospec), o tecido foi macerado por 90 segundos e, em seguida, os tubos foram incubados a 65°C por 1 hora. Após o período de incubação, foi adicionado 750 μ L do volume da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados em vórtex por aproximadamente 30 segundos. O material foi centrifugado por 10 minutos a 16.900 g, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo contendo 0,6 do volume de isopropanol, misturado por inversão. Os tubos foram deixados a -20°C por 1 hora e, logo após, centrifugados por 30 minutos, a 16.900 g. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μ L de etanol 70% para lavar o *pellet*. Após centrifugar (5

minutos, 16.900 g), o etanol foi descartado e o *pellet* foi seco a 37°C. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE pH 8 (Tris-HCl 1M pH 8, EDTA 500 mM pH 8) autoclavado e acrescido com 1 µL de RNase A (10 mg.L⁻¹). Após a extração, foi feita a quantificação do DNA em espectrofotômetro (NanoVue Plus spectrophotometer) pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm e em seguida o DNA genômico foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

Para verificar a integração do T-DNA nas amostras de DNA genômico extraídas das plantas T0, reações de PCR (ver sessão 4.1) foram realizadas utilizando os pares de *primers* pBIrev/RevMax, GUS e NPTII (APÊNDICE A).

4.11 Tratamentos por estresses abióticos

A seguir são descritos os ensaios preliminares de estresses abióticos que foram realizados nas plantas transgênicas de *N. tabacum* contendo os pDREB1D::*uidA* a fim de aumentar a expressão do gene *uidA* e verificar se as mesmas responderiam ao tratamento.

4.11.1 Ensaio de desidratação

Com o intuito de aumentar a expressão do gene *uidA* nas plantas transgênicas contendo os pDREB1D::*uidA*, um ensaio preliminar de estresse de desidratação foi realizado baseado no trabalho de Xia et al. (2013) como detalhado na Figura 12. Neste ensaio, apenas plantas transformadas com os vetores positivo (pBI121), negativo (pBI101) e as plantas transformadas com os fragmentos maiores (D) das construções *pDREB1::uidA* foram utilizadas.

Plantas recém-cultivadas *in vitro* foram retiradas do meio de cultura, lavadas com água corrente e submetidas à desidratação em temperatura ambiente

(24°C), sobre papel filtro, por um período de 6 horas. As amostras foram coletadas em 0, 2, 4, 6 horas e, após 168 horas de cultivo em solo, submetidas a teste histoquímico e extração de RNA.

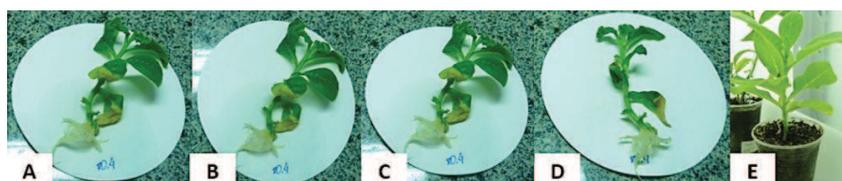


Figura 12 Planta transgênica retirada do cultivo *in vitro* e submetida à desidratação em temperatura ambiente sobre um papel filtro, por um período de seis horas. Em A, a planta acabou de sair do cultivo *in vitro* e a primeira coleta das amostras para teste histoquímico e extração de RNA foi feita. Em B, a planta já se encontra a duas horas em temperatura ambiente sobre papel filtro, as mesmas coletas foram realizadas. Em C, o período é de quatro horas sobre papel filtro em temperatura ambiente, novamente as amostras foram coletadas para teste histoquímico e extração de RNA. Em D, as plantas já estão a seis horas no mesmo ambiente, sendo possível notar a murcha da planta. As amostras foram coletadas e as plantas transferidas para vasos com terra adubada para, depois de 168 horas, coletar novamente amostras das plantas em condições normais

4.11.2 Ensaio de estresse térmico

O segundo ensaio realizado foi um teste de estresse térmico baseado no trabalho de Macková et al. (2013). Neste ensaio, apenas um evento escolhido ao acaso das plantas transformadas com os vetores positivo (pBI121), negativo (pBI101) e das plantas transformadas com os pDREB1D::*uidA* foram utilizadas.

Plantas de 40 dias de idade foram incubadas a 40°C, em estufa digital de esterilização e secagem (Figura 13), durante quatro horas e as amostras foram coletadas em 0, 2, 4 horas e, após 168 horas em condições de recuperação (temperatura 27°C e umidade relativa de 65%), submetidas a teste histoquímico e extração de RNA.



Figura 13 Ensaio de estresse térmico (40°C) realizado para teste histoquímico GUS e extração de RNAs totais em plantas de *N. tabacum* transformadas (T0) com diferentes fragmentos da região promotora de alelos do gene *CcDREB1D*, isolada do clone 14 (tolerante) e do clone 22 (sensível)

4.12 Extração de RNAs totais

Folhas de *N. tabacum* transformadas (T0) e submetidas aos estresses abióticos foram coletadas, acondicionadas em tubos, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C, para posterior extração de RNAs totais.

As amostras foram transferidas para tubos de 2 mL (aproximadamente 100 mg de amostra) com três esferas de aço inox e 1 mL de TRI Reagent® (Ludwing). Os tubos foram para o macerador, Mini-BeadBeater 96 (Biospec), por 45 segundos. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por mais 15 segundos e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio em cada tubo, misturou-os por inversão lentamente e estes foram incubados por 3

minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para novo tubo com 500 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 70% armazenado a -20°C foi adicionado ao tubo para lavagem das amostras.

Após centrifugar (5 minutos, 7500 g e 4°C), o etanol 70% foi descartado e o *pellet* foi seco a 37°C. Os RNAs foram ressuspensos em 50 µL de H₂O deionizada e armazenados a -20°C.

Para avaliar a integridade dos RNAs extraídos, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, onde foi possível ser visualizadas as bandas individuais de RNA ribossomal 26S e 18S. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue Plus spectrophotometer) pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm.

4.13 Tratamento com DNase

Todas as amostras foram tratadas com o Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante, para retirada dos vestígios de DNA genômico que poderiam restar nas amostras de RNA. As reações foram realizadas utilizando o termociclador. Ao tubo contendo 2,5 µg de RNA total, foram adicionados 1 µL de tampão 10x (presente no kit) e 2,5 µL da enzima RQ1 RNase Free. Essa reação foi incubada a 37°C por 30 minutos para ativação da enzima. Para inativar a enzima, foi adicionado 1 µL de RQ1 RNase Stop Solution (EGTA 20 mM pH 8) e a reação foi incubada aos 65°C por 10 minutos.

4.14 Transcriptase reversa (RT)

A síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir dos RNAm utilizando o *primer* oligo dT₁₅, o kit ImProm™ Reverse Transcriptase (Promega) e o termociclador. Em tubos estéreis, adicionou-se 4 µL de RNA total tratado com DNase e 1 µL de oligo dT₁₅ concentração final de 0,5 µg. A reação foi incubada a 70°C por 5 minutos e rapidamente levada a 4°C por 5 minutos. Após esse período, acrescentou-se ao mesmo tubo 4 µL do tampão ImProm-II™ 5x Reaction Buffer, 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL do mix de dNTP 10 mM, 1 µL da enzima e água deionizada para completar o volume para 20 µL. Os tubos foram incubados no termociclador, a 25°C, durante 5 minutos para a fase de anelamento. A reação foi incubada a 42 °C por 60 minutos para a síntese da primeira fita de cDNA, sendo posteriormente incubada a 70 °C durante 15 minutos para inativar a enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C.

4.15 Testes dos pares de *primers*

Após a síntese dos cDNAs, utilizando o protocolo recomendado para o Fast 7.500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), os cDNAs preparados foram diluídos nas condições 1/10 e testados por qPCR, utilizando pares de *primers* (APÊNDICE A) desenhados pelo *software* Primer Express v. 3.0 (Applied Biosystems). Preliminarmente, os *primers* foram testados por sua eficiência com diluições seriadas de um mix de cDNA oriundo de RNA extraídos de folhas de *N. tabacum* transformadas com o vetor pBI121 (controle positivo). A especificidade dos mesmos *primers* foi testada usando o mesmo mix e analisando a curva de dissociação (*Melt Curve*).

4.15.1 Ensaios de qPCR

Para cada reação, foi utilizado 1 μL das diluições adequadas de cDNA, 0,2 μL do *primer forward*, 0,2 μL do *primer reverse* a 10 mM cada e 5 μL do mix x2 concentrado de SYBR[®] green (SYBRGreen qPCR MIX-UDG/ROX, Introvigen). A reação foi completada com 3,6 μL de água deionizada para um volume final de 10 μL por reação. Uma etapa de pré-incubação para ativação da enzima UDGase é aplicada ao mix, que corresponde a dois minutos a 50°C (tratamento da uracil DNA-Glycosylase), em seguida, 5 minutos a 95°C para inativação da uracil DNA-Glycosylase. Logo após, é aplicada a etapa de amplificação propriamente dita que compreende 40 ciclos de amplificação de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Os dados foram analisados utilizando o *software* 7.500 e o *software* 2.0.6 (Applied Biosystems) para determinar o valor do CT (*Cycle Threshold*).

Para a obtenção do coeficiente de expressão de cada gene analisado, os valores de expressão são obtidos por meio da quantificação relativa. Para tal, os dados obtidos foram normalizados pelos níveis de expressão do gene *NtACT* codificando para a actina (KRAINER et al., 2009), utilizada como uma referência constitutiva. A expressão relativa é quantificada pela aplicação da fórmula $(1+E)^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct do gene alvo (uidA)} - \text{Ct do gene endógeno (NtACT)}$ e $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct da amostra} - \Delta\text{Ct do calibrador}$. O calibrador é uma das amostras analisadas, seleciona-se uma amostra controle, ou seja, que não sofreu nenhum tipo de estresse. Para certificar que o mix utilizado nas reações não contém DNA contaminante, em todas as reações foram utilizados controles negativos (NTC *no template control*) para cada gene analisado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Verificação dos plasmídeos recombinantes

Objetivando confirmar a identidade dos sete plasmídeos recombinantes pDREB1D::*uidA* recebidos antes que eles fossem amplificados em *E. coli* XL10 GOLD e transferidos para *A. tumefaciens* EHA105, afim de realizar a transformação genética das plantas de *Nicotiana tabacum* cv. SRI, essas construções foram testadas por meio de:

- a) Digestão enzimática usando a enzima de restrição *PvuII*, que permitiu gerar um número limitado de fragmentos de restrição e avaliar os tamanhos completos de todas as construções (Figura 14);
- b) PCR usando o par de *primer* pBIrev/RevMax que permitiu verificar o tamanho das sequências clonadas anteriormente ao gene repórter *uidA* (Figura 15).

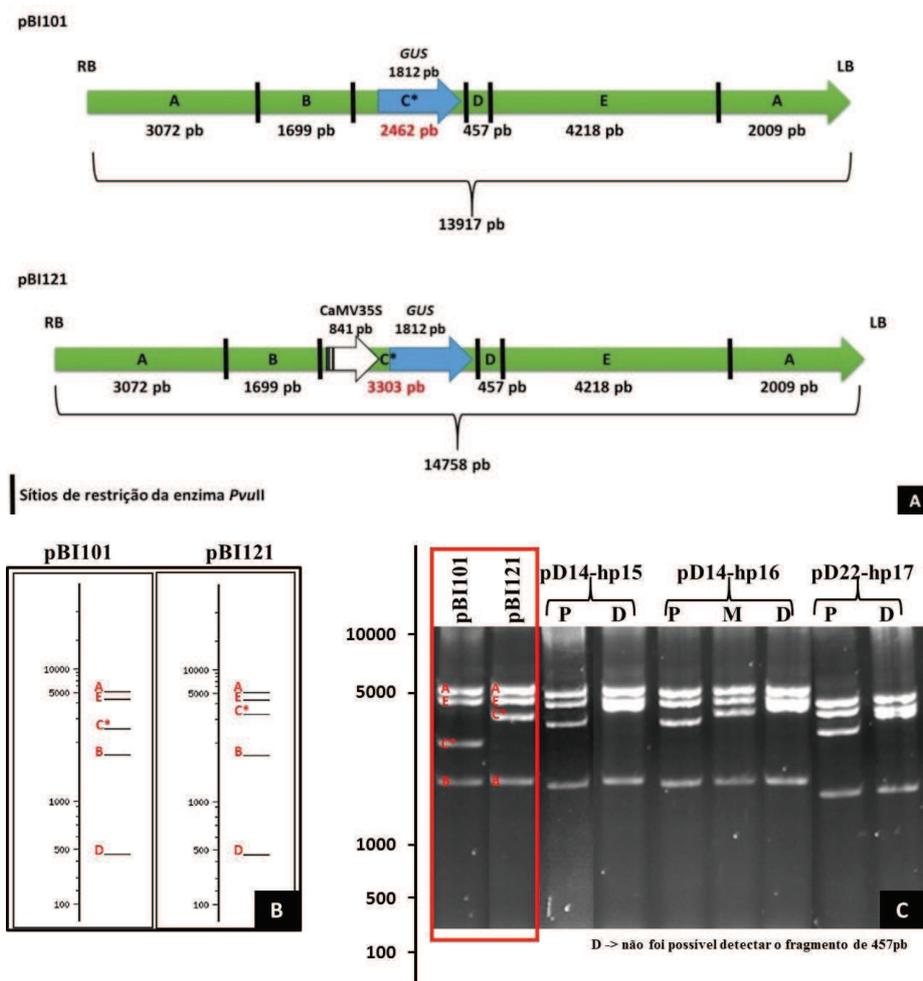


Figura 14 (A) Sítios de restrição da enzima *PvuII* nos vetores pBI101 e pBI121. (B) Análise *in silico* do perfil de digestão dos vetores pBI101 e pBI121. (C) Análise dos fragmentos obtidos após a digestão dos pDREB com enzima de restrição *PvuII*. Confirmação da estrutura dos vetores pBI101 e pBI121 com base na análise *in silico* (indicado em vermelho). A = 3072 pb + 2009 bp = 5081pb; B = 1699pb; C* = fragmento de tamanho variável, D = 457 pb; E = 4218 pb

Digeridas as construções com a enzima de restrição *PvuII*, foi possível estimar os pesos moleculares das construções e confirmar que elas estavam de

acordo como esperado para cada plasmídeo recombinante. A digestão com a enzima *PvuII* gerou quatro fragmentos de mesmo tamanho e um de tamanho variável indicando os diferentes fragmentos da região promotora do gene *CcDREB1D* presentes nos sete plasmídeos recombinantes.

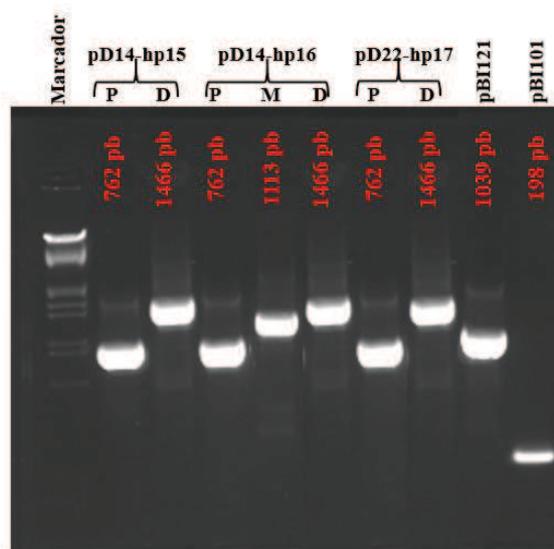


Figura 15 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das construções pDREB e controles (pBI121 e pBI101) com o par de *primer* pBIrev/RevMax. Os nomes das construções e os tamanhos obtidos (em vermelho) são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII* (ver também Figura 10)

O fragmento de 198 pb amplificado a partir do vetor pBI101, utilizando-se o par de *primer* pBIrev/RevMax confirma a ausência de promotor clonado na frente do gene *uidA* enquanto o fragmento de 1039 pb obtido a partir do vetor pBI121, utilizando o mesmo par de *primer*, corresponde ao promotor CaMV35S (Figura 15).

A análise da eletroforese em gel de agarose (Figura 15) possibilitou também conferir que o tamanho das sequências promotoras clonadas

anteriormente ao gene repórter *uidA*, para todas as construções, estavam conforme o esperado e de acordo com a nomenclatura correspondente.

5.2 Amplificação das construções recombinantes em *E. coli* XL10 GOLD

Uma vez confirmada a identidade das construções pDREB1D::*uidA*, elas foram amplificadas em *E. coli*. A confirmação das construções presentes nas bactérias transformadas foi verificada extraíndo o DNA plasmidial (miniprep) e realizando novamente a reação de PCR com o par de *primer* pBIrev/RevMax (Figura 16), que permitiu caracterizar o tamanho dos fragmentos promotores pDREB1D.

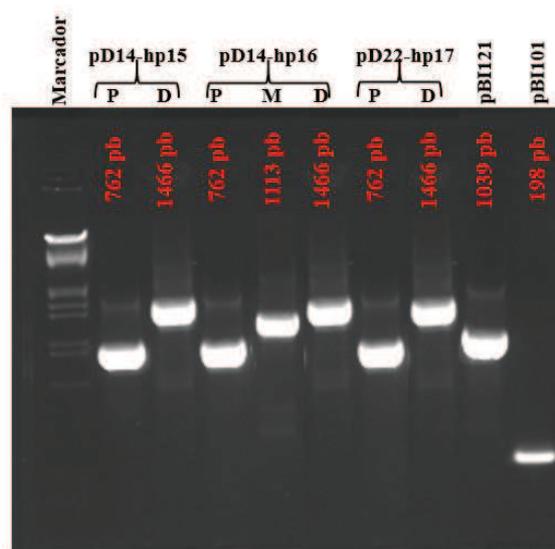


Figura 16 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir dos plasmídeos extraídos das baterias recombinantes, utilizando o par de *primer* pBIrev/RevMax. Os nomes das construções e os tamanhos obtidos (em vermelho) são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (ver também Figura 10)

Esses resultados permitiram confirmar a identidade das construções após a transformação em *E. coli* e verificar que não houve alterações nos fragmentos pDREBs.

5.3 Amplificação dos vetores recombinantes em *A. tumefaciens* EHA105

Confirmados os plasmídeos recombinantes clonados em *E. coli* estes foram usados para transformar *A. tumefaciens* EHA105. A confirmação do DNA plasmidial inserido nas colônias transformadas de *A. tumefaciens* foi verificada por reações de PCR usando os pares de *primers* GUS (Figura 17), NPTI (Figura 18) e pBIrev/RevMax (Figura 19).

Para todas as colônias, as reações de PCR usando os pares de *primer* GUS e NPTI permitiram a amplificação de fragmentos com os tamanhos esperados de 120 pb e 130 pb, respectivamente.

Os resultados obtidos com a reação de PCR usando o par de *primers* pBIrev/RevMax são idênticos aos resultados previamente obtidos (Figuras 16 e 19) corroborando que não houve troca dos plasmídeos recombinantes e que, os fragmentos pDREBs não foram alterados durante essas etapas de amplificação das construções em *E. coli* e transferência para *A. tumefaciens* EHA105.

Uma vez concluída essas etapas essenciais de confirmação das construções presentes em *A. tumefaciens*, essas cepas foram utilizadas para o preparo do inóculo e posterior transformação das plantas de *N. tabacum* cv. SRI.

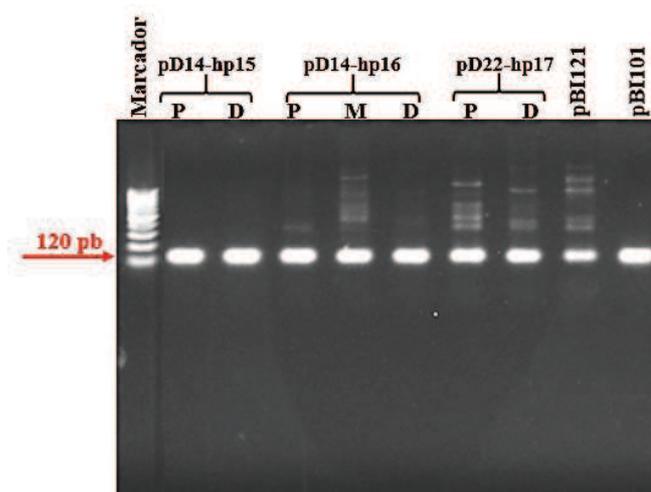


Figura 17 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das colônias de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas utilizando o par de *primer* GUS. Os nomes das construções são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Ladder 100 pb. O tamanho do fragmento amplificado (120 pb) é indicado por uma seta

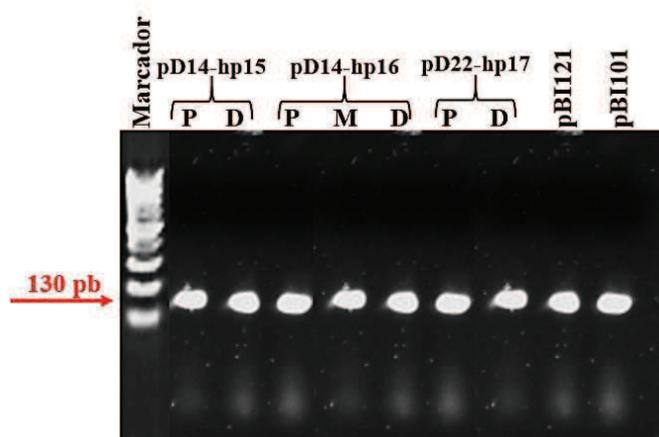


Figura 18 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das colônias de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas utilizando o par de *primer* NPTI. Os nomes das construções são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado Ladder 100 pb. O tamanho do fragmento amplificado (130 pb) é indicado por uma seta

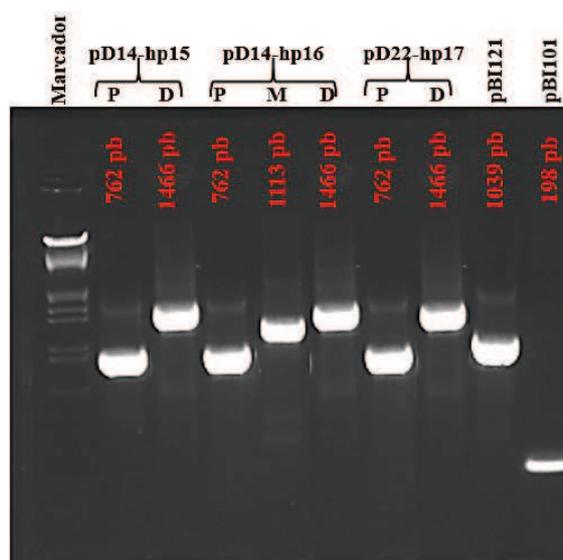


Figura 19 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir das colônias de *A. tumefaciens* EHA105, utilizando o par de *primer* pBIrev/RevMax. Os nomes das construções e os tamanhos obtidos (em vermelho) são indicados acima de cada poço. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (ver também Figura 10)

5.4 Análise molecular das plantas transgênicas de *N. tabacum*

A caracterização molecular das plantas transgênicas regeneradas foi realizada por PCR convencional utilizando os pares de *primer* pBIrev/RevMax, GUS, NPTII (Figuras 20, 21 e 22, respectivamente) para testar o DNA genômico extraído de 61 plantas. Para analisar esses resultados, o DNA genômico de plantas de *N. tabacum* não transformadas (*Wild Type* - WT) foi usado como controle negativo durante esses ensaios, enquanto o uso da água (C-) permitiu confirmar a ausência de contaminações nas reações de PCR.

Os resultados das reações de PCR usando os pares de *primers* GUS, NPTII e pBIrev/RevMax mostraram a ausência de produtos amplificados a partir do DNA genômico WT (Figuras 20, 21 e 22). A presença dos fragmentos de 120

e 780 pb amplificados, respectivamente com os pares de *primers* GUS e NPTII, possibilitaram confirmar que as plantas foram realmente transformadas. Os resultados das reações de PCR usando o par de *primer* pBIrev/RevMax permitiram verificar a inserção dos fragmentos pDREB1D nas plantas transformadas pois, o par de *primer* pBIrev/RevMax flanqueia os fragmentos das regiões promotoras.

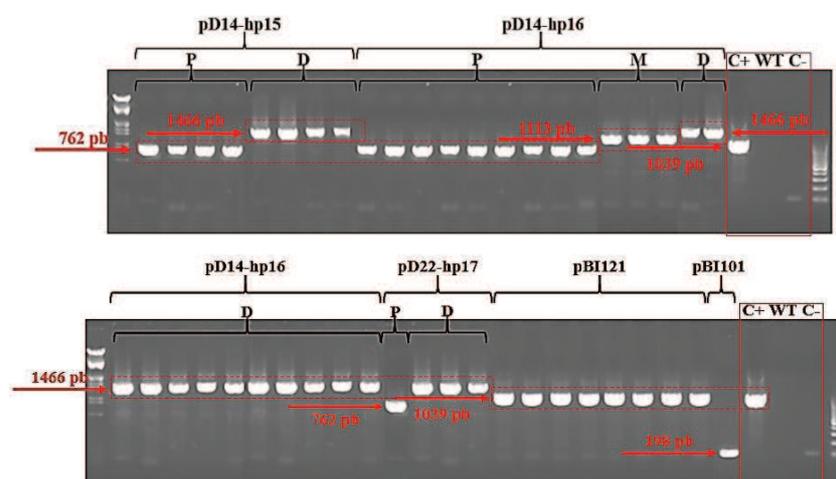


Figura 20 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR das amostras de DNA genômico de *N. tabacum* dos eventos das diferentes construções utilizadas neste trabalho, utilizando o par de *primer* pBIrev/RevMax. Marcador utilizado: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* (ver também figuras 10, 12, 14 e 17)

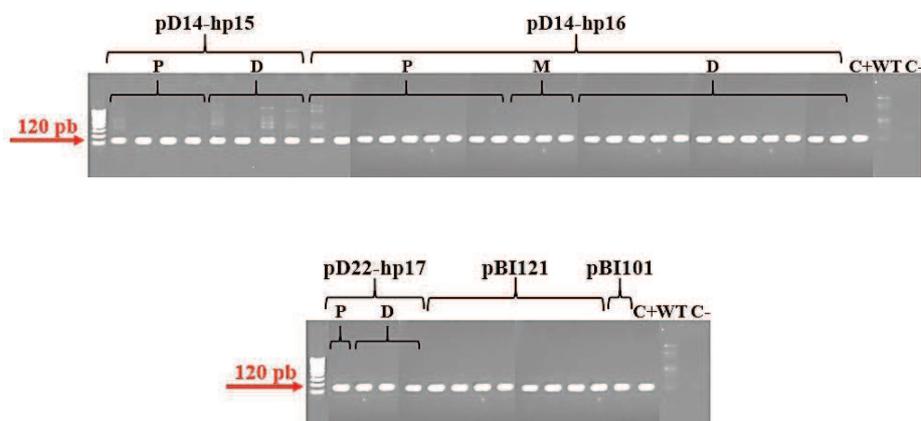


Figura 21 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR das amostras de DNA genômico de *N. tabacum* dos eventos das diferentes construções utilizadas neste trabalho, utilizando o par de *primer* GUS (120 pb). Marcador utilizado: Ladder 100 pb

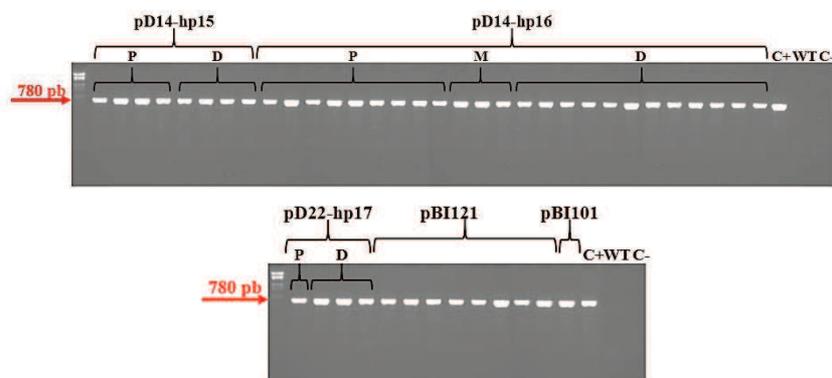


Figura 22 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR das amostras de DNA genômico de *N. tabacum* dos eventos das diferentes construções utilizadas neste trabalho, utilizando o par de *primer* NPTII (780 pb). Marcador utilizado: Ladder 100 pb

Após todas as verificações, as plantas para as quais não foram observados os amplicons específicos dos pares de *primers* pBIrev/RevMax, GUS, NPTII foram descartadas. O total de 45 plantas transformadas das

diferentes construções foi confirmado (Tabela 2) e as plantas utilizadas nos ensaios histoquímicos, de desidratação, estresse térmico e, também, na produção de sementes.

Tabela 2 Eventos confirmados com os pares de *primers* pBIrev/RevMax, GUS e NPTII

Construções	Número de eventos
pD14-hp15P	04
pD14-hp15D	04
pD14-hp16P	09
pD14-hp16M	03
pD14-hp16D	12
pD22-hp17P	01
pD22-hp17D	03
pBI121	08
pBI101	01
Total	45

5.5 Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas e raízes de plantas transformadas de *N. tabacum* em condições normais

Após a caracterização molecular, ensaios histoquímicos para a detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) foram realizados em folhas e raízes de *N. tabacum* transformadas, um evento por construção escolhido ao acaso, com os pDREB1D::*uidA* e com os vetores pBI121 (controle positivo) e pBI101 (controle negativo) (Figura 23 e 24).

Uma forte coloração, caracterizando uma alta expressão do gene repórter, foi observada tanto em folha como em raiz para a planta

correspondente ao controle positivo (pBI121, p35S::*uidA*). Ao contrário, para a planta correspondente ao controle negativo (pBI101), nenhuma atividade GUS foi detectada.

Para as plantas transformadas com os vetores pD14-hp15D, pD14-hp16M, pD14-hp16D e pD22-hp17D, foi possível observar uma leve (fraca) atividade GUS nas folhas, localizada principalmente ao redor das nervuras secundárias (Figura 23). Esses resultados sugerem que os promotores pDREB (pD14-hp15D, pD14-hp16D e pD22-hp17D) de cafeeiro são funcionais nas folhas de *N. tabacum* em condições normais, indicando baixa expressão, isso quando comparado à expressão constitutiva do promotor CaMV35S. Ao contrário, para as plantas transgênicas transformadas com as construções pD14-hp15P, pD14-hp16P, pD14-hp16M e pD22-hp17P, nenhuma atividade enzimática β -glucuronidase foi detectada (Figura 23).

Foi possível também, observar uma leve atividade GUS nas raízes de *N. tabacum* transformadas com os vetores pD14-hp15P, pD14-hp15D, pD14-hp16M e pD14-hp16D, diferenciando dos resultados encontrados para folhas, no qual não se observou expressão do gene *uidA* sendo direcionada pelo menor fragmento (P). Ao contrário, nenhuma atividade GUS foi detectada nas raízes das plantas transformadas com as construções pD14-hp16P, pD22-hp17P e pD22-hp17D (Figura 24).

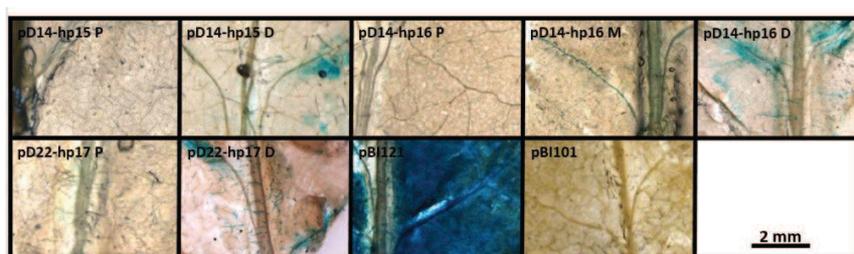


Figura 23 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas de plantas transformadas de *N. tabacum* com diferentes fragmentos da região promotora de alelos do gene *CcDREB1D* em condições normais

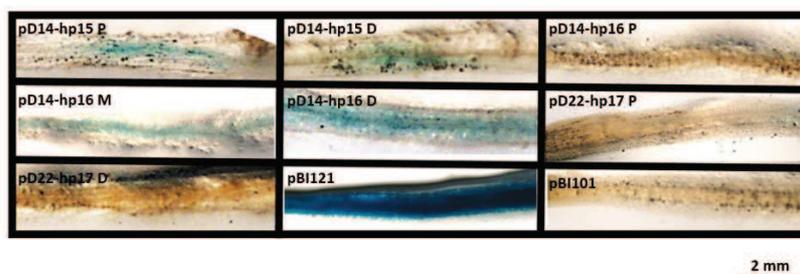


Figura 24 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) em raízes de plantas transformadas de *N. tabacum* com diferentes fragmentos da região promotora de alelos do gene *CcDREB1D* em condições normais

5.6 Ensaios de estresses abióticos realizados nas folhas das plantas transformadas de *N. tabacum*

Objetivando verificar se os promotores pDREB podem ser induzidos com estresses abióticos, a expressão do gene *uidA* foi testada por meio de ensaios histoquímicos para a detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas das plantas transgênicas submetidas a ensaios preliminares de estresses abióticos.

5.6.1 Estresse desidratação

O primeiro ensaio realizado foi um teste de desidratação baseado no trabalho de Xia et al. (2013). Neste ensaio, apenas um evento escolhido ao acaso das plantas transformadas com os vetores positivo (pBI121), negativo (pBI101) e com as plantas transformadas com os fragmentos maiores (D) de cada construção pDREB1D::*uidA* foram utilizados.

Para a planta testada e correspondente ao controle positivo (pBI121, p35S::*uidA*), uma forte coloração, caracterizando uma alta expressão do gene repórter, foi observada. Ao contrário, para a planta correspondente ao controle negativo (pBI101), nenhuma atividade enzimática GUS foi detectada (Figura 25).

Uma leve (fraca) atividade GUS localizada, principalmente, ao redor das nervuras secundárias foi observada na planta transformada com a construção pD22-hp17D nas condições normais (0 hora, planta retirada do cultivo *in vitro*).

Aparentemente houve uma indução do gene *uidA* e esta parece aumentar com o tempo de estresse aplicado à planta (atingindo o máximo em 4 horas) nas nervuras central e secundárias das folhas, até não ser mais evidenciada visualmente em 6 horas. Como foi observado para a planta transformada com a construção pD22-hp17D nas condições normais (0 hora, planta retirada do cultivo *in vitro*), uma expressão basal pode ser notada na folha da planta recuperada (cultivada em substrato).

Os níveis de expressão de gene *uidA* detectados nas folhas das plantas transformadas com a construção pD22-hp17D foram bem inferiores, quando comparado aos níveis de expressão da planta transformada com o controle positivo pBI121 (p35S::*uidA*), contudo, já possibilitou demonstrar que o promotor pD22-hp17D de cafeeiro é funcional em folhas de *N. tabacum*.

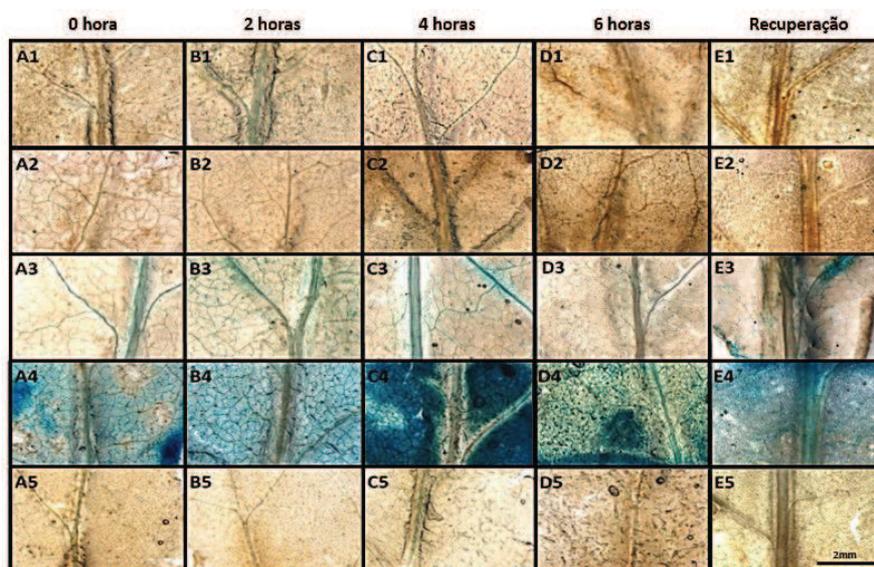


Figura 25 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas de plantas transformadas de *N. tabacum* com as construções pD14-hp15D (A1-E1), pD14-hp16D (A2-E2), pD22-hp17D (A3-E3) e os vetores controles pBI121 (A4-E4) e pBI101 (A5-E5), submetidas à desidratação (A = 0 hora; B = 2 horas; C = 4 horas; D = 6 horas; E = recuperação = 168 horas)

Para analisar a expressão do gene *uidA* nas plantas previamente testadas durante o ensaio de desidratação, os RNAs totais das mesmas foram extraídos e analisados por PCR convencional (Figura 26) e PCR quantitativa em tempo real [qPCR] (Figura 27).

Baseado nos resultados prévios obtidos no ensaio histoquímico (Figura 25), a princípio, apenas as amostras de cDNA das plantas transformadas com a construção pD22-hp17D submetidas ao ensaio de desidratação foram analisadas por PCR convencional e qPCR, pois quando comparado o perfil histoquímico do ensaio de desidratação desta construção com as demais construções pDREB1D::*uidAD*, esta é a que possui uma maior atividade GUS.

Ao analisar a eletroforese em gel de agarose, tem-se como resultado da PCR convencional (Figura 26) o fragmento de 120 pb, produto de amplificação da amostra utilizada como controle positivo (C⁺ = DNA plasmidial pBI121). Esta permitiu constatar que a reação de amplificação funcionou como esperado. O mesmo foi observado para as amostras de cDNA da planta transformada com o vetor pBI121 independentemente do tempo de estresse aplicado, confirmando a expressão constitutiva do gene *uidA* quando controlado pelo promotor CaMV35S. A ausência do fragmento amplificado no controle negativo da reação (C⁻ = água) possibilita afirmar que não houve contaminação das reações.

Para as amostras de cDNA da planta transformada com a construção pD22-hp17D, observa-se o fragmento de 120 pb amplificado e um aumento na intensidade da banda de acordo com o tempo de exposição da planta ao estresse, indicando a presença do produto transcrito (mRNA) que aparentemente aumenta quando o material vegetal é submetido à desidratação.

Analisando a eletroforese em gel de agarose, é possível observar a presença do produto de amplificação da reação de PCR com o par de *primer* GUS menos intensamente na amostra coletada em condições normais (0h). A presença do produto de amplificação é verificada de maneira mais intensa durante o ensaio de desidratação (2h, 4h, 6h) e se mantém quando a planta já se encontra em condições normais (R).

Esses dados, aliados às análises histoquímicas (Figura 25), permitiram constatar que aparentemente houve uma indução e um aumento na expressão do gene *uidA*.

Comparando os resultados do ensaio histoquímico e da PCR convencional, na amostra coletada em 6 horas de desidratação, somente na PCR foi possível verificar a expressão do gene *uidA* a partir do fragmento amplificado, podendo provavelmente ser resultante da amplificação deste gene

em uma região diferente daquela utilizada no ensaio histoquímico ou pode estar relacionado à baixa expressão do gene *uidA* quando regulado pelo pD22-hp17D.

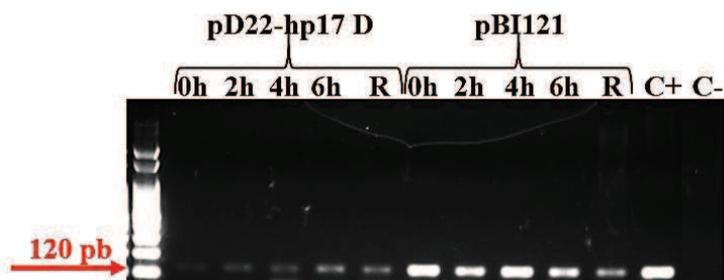


Figura 26 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR convencional das amostras de cDNA de plantas de *N. tabacum* transformadas com pD22-hp17D e pBI121, submetidas ao estresse de desidratação, utilizando o par de *primer* GUS. Os nomes das construções, os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; 6h = 6 horas; R = recuperação = 168 horas) e a posição dos controles (positivo=DNA plasmidial e negativo = reação com água) são indicados acima de cada poço. A banda específica do cDNA *uidA* (120 pb) é indicada com a seta do lado esquerdo. Marcador utilizado: Ladder 100 pb

Antes de analisar os resultados de qPCR, as curvas de dissociação (*melt curve*) dos pares de *primers* GUS (específico do gene *uidA*) e *NtACT* (gene endógeno *NtACT*), codificando para a actina e considerado de expressão constitutiva em folhas de tabaco (KRAINER et al., 2009) foram feitas para verificar a especificidade desses pares por meio da presença de um único pico caracterizando a T_m dos amplicons (APÊNDICE B).

Por meio da análise de qPCR (Figura 27), foi possível observar a expressão do gene *uidA* em todas as amostras de folhas da planta transformada com o vetor pBI121, o que confirma a expressão alta e constitutiva do gene repórter p35S::*uidA*. Para a planta transformada com a construção pD22-hp17D, os resultados de qPCR mostraram:

- a) Uma expressão basal do gene *uidA* nas folhas antes (0h), durante (6h) e após (R) o ensaio de desidratação;
- b) Uma leve expressão (indução) do gene *uidA* nas folhas coletadas quando a planta encontrava-se há 2 horas em condição de estresse (desidratação). Neste caso, observa-se que a expressão do gene *uidA* é muito menor, isso quando comparada com as amostras p35S::*uidA* das plantas transformadas com o vetor pBI121. Esses resultados sugerem que o promotor DREB da construção pD22-hp17D foi levemente induzido durante o ensaio de desidratação nas folhas das plantas transgênicas de *N. tabacum* e que, quando funcionando, ele se comporta como um promotor fraco em comparação ao promotor CaMV35S.

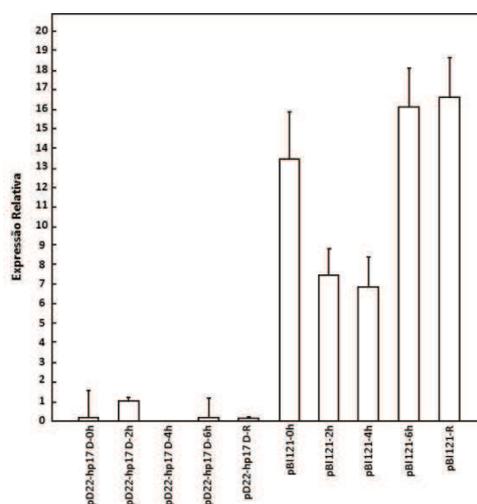


Figura 27 Expressão do gene *GUS* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas à desidratação. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes dos vetores e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; 6h = 6 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico

Com base nos resultados da análise, pode-se observar que o promotor pD22-hp17D não direciona altos níveis de expressão como o promotor CaMV35S presente no pBI121. Isso pode ser confirmado nas três análises realizadas (ensaio histoquímico, PCR convencional e qPCR).

A baixa indução do promotor *DREB* pode ser explicada devido o mesmo, ser um fator de transcrição que auxilia e amplifica a expressão de genes responsivos a determinados estresses, e ainda infere que a exposição por longos períodos ao estresse pode suprimir a ação deste gene (SOUZA, 2012).

Os primeiros *DREBs* foram isolados da *Arabidopsis thaliana*, sendo o *DREB1A* e o *DREB2A* (LIU et al., 1998). Desde então, diversos *DREBs* e seus genes similares têm sido identificados em outras espécies vegetais. Recentemente, outros genes também homólogos a essa família, OsDREB1A, OsDREB1B, OsDREB1C, OsDREB1D, e OsDREB2A foram isolados em arroz (DUBOUZET et al., 2003), GmDREBa, GmDREBb e GmDREBc, em soja (LI et al., 2005) e ZmDREB1A em milho (QIN et al., 2004). A expressão de tais genes, *AtDREB2A* e *AtDREB1*, foi observada em raízes, folhas e caule (menos expressos), porém sob estresse, suas expressões aumentaram (AGARWAL et al., 2006).

Segundo Liu et al. (1998), os fatores de transcrição *DREB1A* e *DREB2A* estão envolvidos na expressão do *RD29A*, dependente de DRE (Dehydration Responsive Element). Tais fatores de transcrição se ligam às DREs e ativam a região promotora do gene *RD29A*, a qual é responsável por diversas respostas ao estresse hídrico, salino e ao frio. De acordo com os dados do referido autor, quando as plantas de *Arabidopsis* foram submetidas ao estresse hídrico, em apenas 2 horas de tratamento foi possível observar picos de expressão do *DREB2A*, entretanto mesmo com 24 horas sob estresse, o *DREB1A* não apresentou expressão significativa.

5.6.2 Estresse térmico (40°C)

O segundo ensaio realizado foi um teste de estresse térmico baseado no trabalho de Macková et al. (2013). Neste ensaio, apenas um evento escolhido ao acaso das plantas transformadas (evento diferente dos eventos utilizados no ensaio de desidratação) com as construções do controle positivo (pBI121), controle negativo (pBI101) e das plantas transformadas com os pDREB1D::*uidA* foram utilizados.

Como foi visto previamente, para a planta testada e correspondente ao controle positivo (pBI121, p35S::*uidA*), uma forte coloração, caracterizando uma alta expressão do gene repórter, foi observada. Ao contrário, para a planta correspondente ao controle negativo (pBI101), nenhuma atividade GUS foi detectada (Figura 28).

Para as plantas transformadas com as construções pD14-hp15P, e pD14-hp16M, nenhuma expressão do gene repórter foi observada em 0, 2 e 4 horas. Verifica-se apenas uma leve atividade GUS na planta em condições de recuperação, localizadas principalmente na nervura central e ao redor das nervuras secundárias.

Uma leve expressão do gene repórter *uidA* direcionado pelo promotor pD14-hp15D foi detectada nas amostras das plantas coletadas em 2 horas de estresse térmico e quando a mesma encontrava-se em condições normais (R).

Quando comparada a planta transformada com a construção pD14-hp16P com a planta transformada com o controle negativo (pBI101), não se observou nenhuma atividade GUS pelo teste histoquímico.

De maneira bem fraca, a expressão do gene *uidA* é observada em 0, 2 horas e em condições normais, nas nervuras central e secundárias da planta transformada com a construção pD22-hp17D.

Independentemente do tempo de exposição ao estresse, as plantas transformadas com os vetores pD14-hp16D e pD22-hp17P também apresentaram uma leve expressão nas nervuras secundárias.

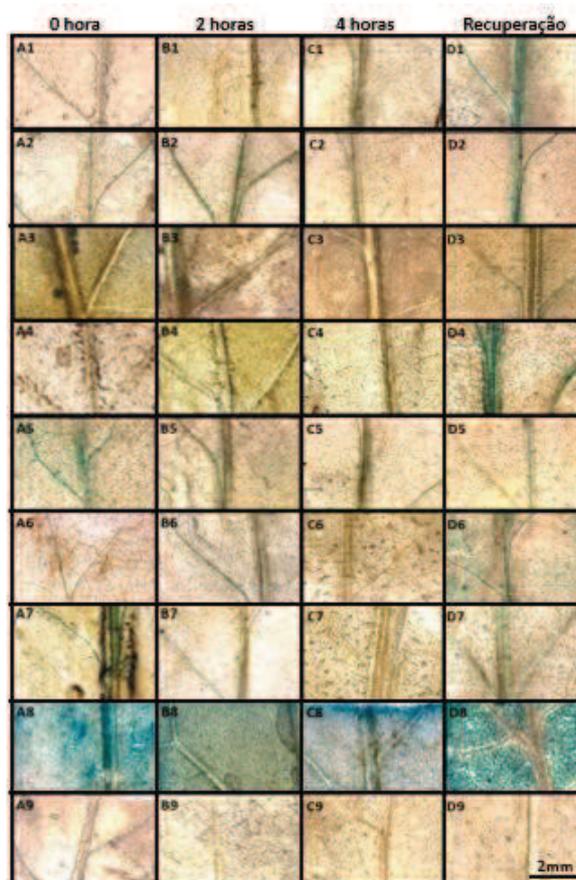


Figura 28 Fotografias do ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas folhas de plantas transformadas de *N. tabacum* com os vetores pD14-hp15P (A1-D1), pD14-hp15D (A2-D2), pD14-hp16P (A3-D3), pD14-hp16M (A4-D4), pD14-hp16D (A5-D5), pD22-hp17P (A6-D6), pD22-hp17D (A7-D7), pBI121 (A8-D8), pBI101 (A9-D9), submetidas ao estresse térmico (40°C). (A = 0 hora; B = 2 horas; C = 4 horas D = recuperação = 168 horas)

Para analisar a expressão do gene *uidA* nas plantas previamente testadas durante o ensaio de estresse térmico, os RNAs totais das mesmas foram extraídos e analisados por PCR quantitativa em tempo real [qPCR] (Figura 29 e 30).

A curva de dissociação (*melt curve*) dos pares de *primers* NtAQP e NtPIP2;1 utilizados foi analisada, permitindo verificar a especificidade desses pares de *primers* por meio da presença de um único pico caracterizando a T_m do amplicon (APÊNDICE B).

A expressão do gene *uidA* em todas as amostras de folhas da planta transformada com o vetor pBI121 foi observada (Figura 29), o que confirma a expressão alta e constitutiva do gene repórter p35S::*uidA*. Visando dar continuidade aos resultados obtidos do ensaio de desidratação para a construção pD22-hp17D, priorizamos as amostras da mesma para este ensaio e os resultados de qPCR mostraram:

- a) Uma expressão basal do gene *uidA* nas folhas antes (0h) e durante (2h) o ensaio de estresse térmico;
- b) Como no ensaio de desidratação, observa-se que a expressão do gene *uidA* é muito menor, isso quando comparada com as amostras p35S::*uidA* das plantas transformadas com o vetor pBI121. No entanto, para esses resultados observa-se que o promotor DREB da construção pD22-hp17D foi levemente induzido durante o ensaio de estresse térmico (2h) nas folhas das plantas transgênicas de *N. tabacum*.

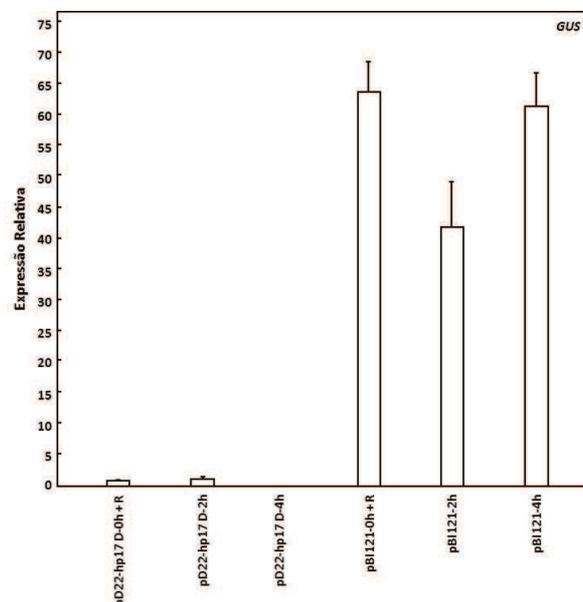


Figura 29 Expressão do gene *GUS* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17 D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes das construções e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico

Os genes *DREB* têm sido isolados e caracterizados de uma grande variedade de plantas, como *Arabidopsis* (LIU et al., 1998), canola (JAGLO et al., 2001), trigo (PARK et al., 2001), cevada (CHOI et al., 2002), arroz (DUBOUZET et al., 2003), soja (LIU et al., 2005) e fumo (PARK et al., 2001).

O gene *GmDREB1a*, em algumas cultivares de soja, mostrou diferenças no nível de expressão em caules, folhas, flores e frutos. Mas, nenhuma expressão foi detectada em raízes por Li et al. (2005), embora diferenças no nível de expressão tenham sido observadas em raízes nas cultivares Conquista e BR16 por STOLF et al. (in press).

Morais (2008), para verificar a funcionalidade do promotor do gene *RcDRED* de mamoneira, realizou um ensaio histoquímico com tecidos foliares colocados em condições de dessecação. A expressão do gene *GUS* foi diferenciada nas folhas de tabaco transformadas com o gene quimérico com o promotor do *RcDRED* controlando o gene *GUS*. Quando as folhas foram expostas a uma condição que simula o estresse hídrico por um período de 4 horas, foi possível observar a expressão gênica mostrando que o promotor tem resposta a esse estresse. A expressão se manteve por um período de 8 horas. Não se observou expressão quando as plantas foram transformadas com o vetor sem promotor ou em plantas não transgênicas. Como esperado, plantas transformadas como o promotor CaMV35S controlando o gene *GUS* mostraram expressão durante todo o período, mesmo quando as folhas não foram submetidas ao estresse.

O estudo da expressão dos genes *DREB* é diferenciado em períodos submetidos ao estresse abiótico. O *DREB1* de *Arabidopsis* foi induzido em 10 minutos a 4°C e *DREB2* foi induzido no mesmo tempo, mas em condições de déficit hídrico e estresse salino (DUBOUZET et al., 2003). Em arroz, a indução do gene *DREB2* foi após 24 horas de desidratação e condições de salinidade (ARGAWAL et al., 2006). Estes trabalhos indicam que o estudo da expressão dos genes *DREB* está relacionado com a exposição ao estresse abiótico, e que a indução ocorrerá nessas condições desfavoráveis.

Dando continuidade ao trabalho de Morais (2008), Cipriano (2012) submeteu as plantas transgênicas T1 de tabaco a vários tratamentos de estresses abióticos (temperaturas baixas e elevadas, seca, salinidade e ABA exógeno) e a expressão de *GUS* foi observada apenas em grãos de pólen, começando durante a abertura da flor e permanecendo no início do processo de senescência, no qual, grãos de pólen maduros são liberados das anteras. As plantas transgênicas analisadas quanto à expressão basal do gene *GUS*, testadas em condições

normais, desenvolveram-se em casa de vegetação, com fotoperíodo de 16 horas, com regime normal de irrigação, porém, nenhuma expressão foi detectada em folhas, caules, raízes, sépalas e ovários.

Apesar das numerosas investigações fisiológicas para descobrir como os fatores de transcrição *DREB* regulam os genes alvo, a regulação da transcrição dos próprios genes *DREB* ainda não foi totalmente caracterizada (ZHANG et al., 2009; KIM et al., 2011). Sabe-se muito pouco sobre a sua expressão espacial durante o desenvolvimento dos órgãos vegetais submetidos ao estresse ambiental. Portanto, existe a necessidade de descobrir como esses fatores de transcrição funcionam durante a regulação de um gene específico de maneira temporal e espacial.

Para verificar a eficácia do método de estresse (estresse térmico), utilizou-se como controle interno de estresse a análise da expressão relativa de dois genes *PIP2;1* e *AQP* que codificam para diferentes tipos de aquaporinas..

Descoberta durante a década de 90, as aquaporinas são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de moléculas de água, formando um verdadeiro canal proteico com esta função (MAUREL; CHRISPEELS, 2001).

As aquaporinas estão ainda relacionadas às respostas a diversos tipos de estresse como salino, hídrico, térmico e de luminosidade, onde são responsáveis pelo controle em nível celular. Quando submetida a tais estresses, as plantas devem se adequar em resposta ao ambiente por meio de alterações do seu fluxo de água, permitindo adaptação das células e tecidos a tais situações. Desta forma, o papel das aquaporinas é extremamente relevante neste aspecto, uma vez que são vistas como componentes centrais nas relações hídricas das plantas e como uma alternativa para difusão facilitada da água pela membrana plasmática, aumentando a permeabilidade da mesma (JAVOT; MAUREL, 2002; TYERMAN et al., 2002; MENESES; NIEMIETZ; BRAMLEY, 2006).

Os resultados apresentados na Figura 30 sugerem que o estresse se realizou de modo que o sistema de resposta ao estresse da planta foi ativado.

Pela caracterização molecular por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico pode-se verificar a expressão do gene *PIP2;1* durante todo o ensaio de estresse térmico. Além disso, nota-se que houve um aumento da expressão do gene em 2 e 4 horas de estresse térmico, indicando a resposta da planta ao estresse durante o ensaio. Resultado semelhante foi observado para o gene *AQP* (Figura 31).

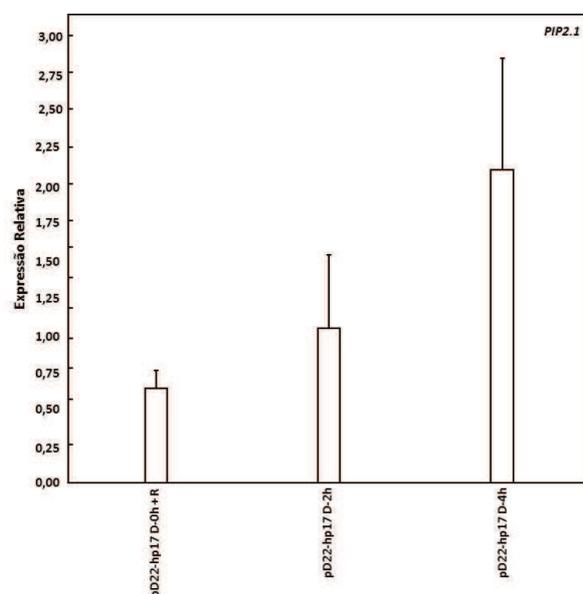


Figura 30 Expressão do gene *PIP2;1* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes das construções e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico

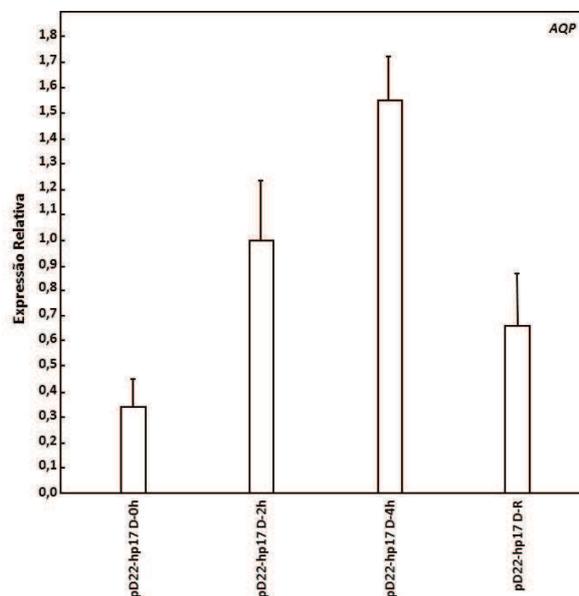


Figura 31 Expressão do gene *AQP* analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas de *N. tabacum* submetidas ao estresse térmico. O gene *NtACT* foi utilizado como gene endógeno (de expressão constitutiva) e a amostra pD22hp17D 2h como calibrador interno (expressão relativa = 1). Os nomes das construções e os tempos de desidratação (0h = 0 hora; 2h = 2 horas; 4h = 4 horas; R = recuperação = 168 horas) estão indicados abaixo do gráfico

Um importante avanço para o entendimento da condutância de água nas células foi a descoberta das proteínas de canais de água, denominadas aquaporinas. A presença de aquaporinas pode aumentar a condutividade hidráulica da membrana (PRESTON et al., 1992) e formar canais de água específicos para íons ou solutos (BRAY, 1993). Sakuray et al. (2005) identificaram 33 genes para aquaporinas no genoma de arroz, os quais 14 demonstraram grandes níveis de expressão constatados pela técnica de PCR em tempo real durante períodos de estresse.

6 CONCLUSÕES

- a) Foi observada uma forte coloração para a planta testada e correspondente ao controle positivo (pBI121, p35S::*uidA*), caracterizando uma alta expressão do gene repórter. Ao contrário, para a planta correspondente ao controle negativo (pBI101), nenhuma atividade GUS foi detectada. O que possibilita afirmar que não há dúvidas em relação aos resultados dos ensaios histoquímicos, visto que as respostas observadas para os controles corresponderam ao esperado;
- b) A atividade GUS observada nas nervuras secundárias e terciárias das folhas e nos vasos condutores das raízes das plantas transformadas de *N. tabacum* (não estressadas), principalmente com as construções contendo os maiores fragmentos (D) dos diferentes haplótipos dos promotores pDREB1D, caracterizam um funcionamento basal dos promotores pDREB1D de cafeeiro em tabaco;
- c) A indução da expressão do gene *uidA* observada nas folhas das plantas T0 transformadas com pD22-hp17D, durante os ensaios de desidratação e de estresse térmico, sugere que a cascata de eventos moleculares implicada na resposta ao estresse em tabaco reconhece este promotor de cafeeiro;
- d) No entanto, o fraco nível de expressão do gene *uidA* controlado com o promotor pD22-hp17D pode ser explicado pela existência de maquinarias transcricionais diferentes entre *C. canephora* e *N. tabacum* pelo reconhecimento e funcionamento do promotor pDREB1D;

- e) A indução do gene *uidA*, somente observada com construção pD22-hp17D e não nas outras construções com pDREB1D, sugere que os polimorfismos nucleicos identificados entre os diferentes haplótipos dos promotores pDREB1D interferem na expressão e talvez na regulação destas sequências.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) O número de cópias de T-DNA inserido nas plantas transformadas de *N. tabacum* T0 será determinado pela análise da segregação das plantas T1 (oriundas da autofecundação das plantas T0), em relação à resistência das plantas à canamicina;
- b) Ensaios de estresses abióticos (desidratação e estresse térmico) poderão ser refeitos em plantas T1 para confirmar os resultados obtidos com as plantas T0. Para esses testes, as análises serão focalizadas nas plantas transformadas com as construções contendo os fragmentos mais longos (construções D) dos promotores pDREB1D. Durante esses testes de estresses abióticos, análises fisiológicas poderão ser realizadas para completar as análises moleculares feitas com as plantas T0;
- c) Ensaios de estresse de “wounding” (ativação da expressão gênica por estresse mecânico) serão realizados, principalmente com plantas jovens (saídas da fase de crescimento *in vitro*) T1;
- d) Para confirmar que os polimorfismos nucleicos identificados entre os diferentes haplótipos dos promotores pDREB1D interferem na expressão e, talvez, na regulação destas sequências, a melhor maneira de testar as mesmas construções são por transformação homóloga (em *Coffea* sp.), o que está justamente em andamento (ALVES, comunicação pessoal).

REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 10, 1859–1868, Oct. 1997.
- AGARWAL, P. K. et al. Role of *DREB* transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, Dec. 2006.
- ALBERTS, B. et al. Control of gene expression. In: (Ed.). **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. p. 375-466.
- ALONSO-SALCES, R. M. et al. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 10, p. 4224-4235, Mar. 2009.
- ALVES, G. S. C. **Identificação e análise de polimorfismos na região promotora do gene *DREB* em vários genótipos do gênero *Coffea***. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- ANTHONY, F. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 5, p. 894-900, Apr. 2002.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 1, p. 169-183, Jan./Fev. 2010.
- ASSAD, E. D. et al. Climatic changes impact in agroclimatic zoning of coffee in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, nov. 2004.
- BAKER, P. et al. The coffee smallholder. In: BAKER, P. S. (Ed.). **Coffee futures: a source book of some critical issues confronting the coffee industry**. Chinchina: CABI-Federacafe, 2001. p. 26-43.
- BERTRAND, B. et al. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 3, p. 387-394, Aug. 2003.

BLUM, A. Drought resistance: is it really a complex trait? **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 38, n. 10, p. 753-757, July 2011.

BORÉM, A.; ALMEIDA, G. D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para Regiões Tropicais**. Viçosa: Editora da UFV, 2011.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.

CARVALHO, L. M. de et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, Mar. 2001.

CHEN, P. Y. et al. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 287-293, May 2003.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 239-264, Mar. 2003.

CHEN, W. Q. et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 3, p. 559-574, Mar. 2002.

CHINI, A. et al. Drought tolerance established by enhanced expression of the *CC-NBSLRR* gene, *ADRI*, requires salicylic acid, *EDSI* and *ABII*. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 810-822, June 2004.

CHOI, D. W.; RODRIGUES, E. M.; CLOSE, T. J. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern, and map location. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 4, p. 1781-1787, Aug. 2002.

CIPRIANO, T. M. **Caracterização de um promotor pólen-específico da família AP2/ERF de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: segunda estimativa**. Brasília: Conab, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_14_09_35_12_boletim_cafe_maio_2013.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2013.

COTTA, M. G. et al. Lipid transfer proteins in coffee: isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 85, n. 1-2, p. 11-31, May 2013.

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: Structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, Ottawa, v. 51, n. 1, p. 50-63, Jan. 2008.

DAMATTA, F. M et al. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 1, p. 111-117, Jan. 2003.

DAMATTA, F.; RAMALHO, J. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 55-81, Jan./Mar. 2006.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, Dec. 2006.

DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, n. 4, p. 357-377, Dec. 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 12, p. 13-15, 1987.

DUBOUZET, J. G. et al. Os *DREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold responsive gene expression. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 751-763, Feb. 2003.

DUFOUR, M. et al. Coffee (*Coffea* sp.) genetic transformation for insect resistance. SERA, T. et al. (Ed.). **Coffee biotechnology and quality**. Oxford: Kluwer Academic Publishers, 2000. Chap. 18, p. 209-217.

DUNWELL, J. M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 487-496, 2000. Suplemento.

DUSSERT, D. et al. Le caféier, *Coffea canephora*. In: HAMON, P. et al. (Ed.). **Diversité génétique des plantes tropicales cultivées**. Montpellier: Cirad, 1999. p. 175-194.

FAHL, J. I. et al. Exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted on to *C. canephora* and *C. congensis*. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 37, n. 2, p. 241-252, 2001.

FAZUOLI, L. C. et al. Cultivares de café arábica do IAC: um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 12-15, 2007.

FAZUOLI, L. C. et al. Seleção antecipada e sua eficiência no café Icatu. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2000. p. 576-582.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 87-113.

FREIRE, L. P. **Análise de polimorfismos nucleicos e estudo da expressão de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro**. 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

FREIRE, L. P. et al. Análise da expressão do gene manose 6 fosfato redutase em cafeeiros submetidos ao déficit hídrico. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 17-23, jan./mar. 2013.

GEROMEL, C. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, Aug. 2006.

GREEN, J. et al. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 197-205, Apr. 2002.

HERRERA, J. C. et al. Factors influencing gene introgression into the allotetraploid *Coffea arabica* L. from its diploid relatives. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 6, p. 1053-1060, Dec. 2004.

HOLLUNG, K. et al. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 35, n. 5, p. 561-571, Nov. 1997.

HORAN, K. et al. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. **Plant Physiology**, Washington, v. 147, n. 1, p. 41-45, May 2008.

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

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Trade statistics**. London: ICO, 2014. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics;%20http://www.ico.org/prices/po.htm>. Acesso em: 08 ago. 2014.

JAGLO, K. R. et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 3, p. 910-917, Nov. 2001.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 301-313, Sept. 2002.

JEFFERSON, R. A et al. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The European Molecular Biology Organization Journal**, Health, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, Dec. 1987.

JOËT, T. et al. Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: *coffea arabica* as a case study. **New Phytologist**, London, v. 182, n. 1, p. 146-162, 2009.

KIM, J. B. et al. Cryopreservation of human adipose tissues using human plasma. **Biotechnology & Biomaterials**, London, v. 1, n. 4, p. 01-05, 2011.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 6, p. 262-267, June 2001.

KOLOVOS, P. et al. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. **Epigenetics & Chromatin**, Elmsford, v. 5, n. 1, p. 959-965, Jan. 2012.

KRAINER, S. et al. **Identification of actin genes from various plant species.** [S.l: s.n], 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/255684853>>. Acesso em: 25 out. 2009.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 2-3, p. 143-182, Sept. 1999.

LAMBOT, C. et al. Evaluation of Conilons for genetic diversity, cup quality and biochemical composition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Switzerland. **Anais...** Switzerland: ASIC, 2008. p. 14-19.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 261, n. 2, p. 259-66, Mar. 1999.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 83-108, Jan. 2013.

LEROY, T. et al. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensiscry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 4, p. 382-385, Mar. 2000.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 229-242, Jan./Mar. 2006.

LEWIN, B. **Genes IX**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LI, J. et al. DGP1, a drought-induced guard cell-specific promoter and its function analysis in tobacco. **Science China Life Sciences**, Beijing, v. 48, n. 2, p. 181-186, Apr. 2005.

LIU, F. et al. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, n. 3, p. 1115-29, Mar. 2005.

LIU, Q. et al. 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*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1391-1406, Aug. 1998.

MACKOVÁ, H. et al. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 2805-2815, July 2013.

MAHDIEH, M. et al. Drought stress alters water relations and expression of *PIP*-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 5, p. 801-813, May 2008.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, Apr. 2012.

MARRACCINI, P. et al. Identificação de genes com expressão diferencial em folhas de cafeeiro *Coffea canephora* e *Coffea arabica* submetidas à diferentes condições de estresse hídrico. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Resumos...** Vitória: SBICafé, 2009.

MARRACCINI, P. et al. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 4, p. 273-282, Apr. 1999.

MARRACCINI, P. et al. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 1, p. 17-25, Jan. 2003.

MATIELLO, J. B.; DANTAS, S. F. Desenvolvimento do cafeeiro e do sistema radicular, com e sem irrigação, em Brejões, PE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 14., 1987, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Ministério da Indústria e Comércio, 1987, p. 165.

MAUREL, C.; CHRISPEELS, M. J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 1, p. 135-138, Jan. 2001.

MENESES, C. H. S. G. et al. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 10, n. 1-2, p. 1039-1072, jan./ago. 2006.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology Research International**, Hindawi, v. 2012, p. 1-17, 2012.

MONTAGNON, C. et al. Amélioration génétique du caféier *Coffea canephora* Pierre: connaissances acquises, stratégies et perspectives. **Cahiers Agricultures**, Elmsford, v. 21, n. 2-3, p. 143-153, 2012.

MONTAGNON, C. **Optimisation des gains génétiques dans le schéma de sélection récurrente réciproque de *Coffea canephora* Pierre**. 2000. 42 p. Thesis (PhD) - Montpellier University, France, 2000.

MORAIS, A. T. **Clonagem e estudo funcional do promotor do gene *DREB* da mamoeira (*Ricinus communis* L.)**. 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MOURRAIN, P. et al. A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. **Planta**, Berlin, v. 225, n. 2, p. 365-379, Jan. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NAKAGAWA, H. et al. A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 217-227, Feb. 1996.

NAKASHIMA, K. et al. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 118, n. 4, p. 1233-1241, Dec. 1998.

NAYAK, S. N. et al. Isolation and sequence analysis of *DREB2A* homologues in three cereal and two legume species. **Plant Science**, Limerick, v. 177, n. 5, p. 460-467, Nov. 2009.

NELSON, G. C. et al. **Climate change: impact on agriculture and costs of adaptation**. Washington: International Food Policy Research Institute, 2009.

NEUTEBOOM, L. W. et al. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, Limerick, v. 163, n. 5, p. 1021-1035, Nov. 2002.

PARK, J. M. et al. Over expression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 5, p. 1035-1046, May 2001.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 101-108, July 2005.

PRESTON, G. M. et al. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 proteins. **Science**, New York, v. 256, n. 5055, p. 385-387, Apr. 1992.

PRIVAT, I. et al. Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. **New Phytologist**, London, v. 178, n. 4, p. 781-797, 2008.

QIN, F. et al. Cloning and functional analysis of a novel *DREB1/CBF* transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 8, p. 1042-1052, Aug. 2004.

RAMACHANDRA-REDDY, A. et al. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 11, p. 1189-1202, Nov. 2004.

REZENDE, J. C. et al. Biotecnologia do cafeeiro. In: CANÇADO, G. M. A.; LONDE, L. N. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Poços de Caldas: Editora Sul de Minas, 2012. p. 227-245.

RIBAS, A. F. et al. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 83-94, 2006.

SAKURAI, J. et al. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 9, p. 1568-1577, Sept. 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SATYANARAYANA, K. V. et al. Isolation of promoter for *N*-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffeacanephora*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 20-25, Sept. 2005.

SEKI, M. et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion of Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 194-199, Apr. 2003.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 1, p. 61-72, Jan. 2001.

SHEN, Q. et al. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in Barley. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 7, p. 1107-1119, July 1996.

SHEN, Q.; HO, T. H. D. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent response complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 3, p. 295-307, Mar. 1995.

SHEN, Z. et al. Polygalacturonase from *sitophilus oryzae*: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 3, p. 24-32, Aug. 2003.

SHINOZAKI, K. et al. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 410-417, Oct. 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, n. 2, p. 327-334, Oct. 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 221-227, Oct. 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants**. Austin: R. G. Lands Company, 1999.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 217-223, June 2000.

SOUZA, F. V. de. **Expressão de genes em resposta a estresse por restrição hídrica em sementes de *Ricinus communis* L. (EUPHORBIACEAE)**. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, 2012.

SPIRAL, J. et al. Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformés par *Agrobacterium rhizogenes*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 316, n. 1, p. 1-6, 1993.

SPIRAL, J. et al. Transgenic coffee (*Coffea* sp.). biotechnology in agriculture and forestry. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 55-76.

STILES, J. I. et al. Purified proteins, recombinant DNA sequences and processes for controlling the ripening of coffee plant. **Requerimento**, n. US 20030084487 A1, maio 2003.

STOLF, R. et al. Physiological responses and differential gene-expression analysis in two contrasting soybean genotypes during drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 2, n. 4, p. 112-121, 2003.

TANG, G.; GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 9, p. 463-469, Sept. 2004.

THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 571-599, June, 1999.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 173-194, Feb. 2002.

UMEZAWA, T. et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion of Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 113-122, Apr. 2006.

VAN BOXTEL, J. et al. Transient expression of β -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 2, p. 748-752, Oct. 1995.

VIDAL, R. et al. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, Washington, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, Nov. 2010.

VIDAL, R. et al. **High-throughput sequencing of cDNA shows that cv. Rubi and Iapar59 of *Coffea arabica* have different molecular response to water privation.** Costa Rica: Association for Science and Information on Coffee, 2013.

VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, Essex, v. 6, n. 4, p. 181-190, Dec. 2013.

VINECKY, F. et al. Análise in silico das bibliotecas de cDNA SH2 e SH3 para a identificação de genes responsivos à seca em cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p.1-19, jan./abr. 2011.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 2, p. 123-132, Abr. 2005.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 1-14, Nov. 2003.

WEI, B. et al. Assaying single nucleotide polymorphism in wheat (*Triticum aestivum* L.) with allele-specific PCR. **Scientia Agricultura Sinica**, Beijing, v. 39, n. 7, p. 1313-1320, May 2006.

XIA, Z. et al. The RING-H2 finger gene 1 (*RHF1*) encodes an E3 ubiquitin ligase and participates in drought stress response in *Nicotiana tabacum*. **Genetica**, Gravenhage, v. 141, n. 1-3, p. 11-21, Mar. 2013.

XOCONOSTLE-CAZARES, B. et al. Drought tolerance in crop plants. **American Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 5, p. 241-256, 2011.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 2, p. 88-94, Feb. 2005.

YE, X. et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, New York, v. 287, n. 5451, p. 303-305, Jan. 2000.

ZHANG, S. B. et al. Purification and characterization of a radical scavenging peptide from rapeseed protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 86, n. 10, p. 959-966, 2009.

ZHENG, Z.; MURAI, N. A distal promoter region of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, Limerick, v. 128, n. 1, p. 59-65, Sept. 1997.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.

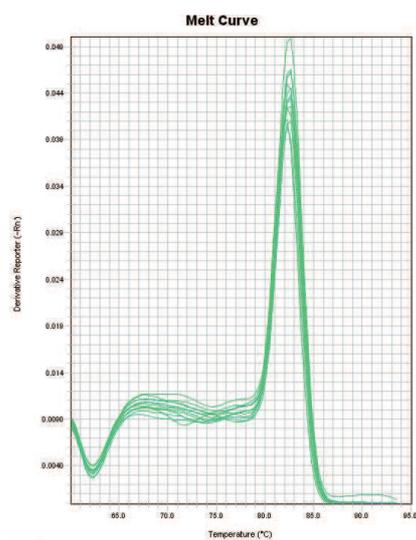
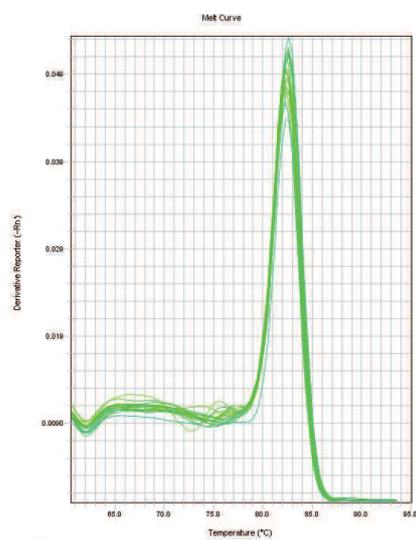
APÊNDICES

APÊNDICE A - Relação de seqüências dos pares de *primers* usados nas reações de PCR e qPCR

Tabela 1 Sequências dos pares de *primers* usados nas reações de PCR (convencional e quantitativa [qPCR])

Nome	Seqüência
GUS F	GCACTAGCGGGACTTTGCAA
GUS R	CGCGAAGCGGGTAGATATCA
NPTI F	CCTGATGCACTCCGCATACA
NPTI R	GCACTTTGAACGGCATGATG
NPTII F	ACAAGATGGATTGCACGCAGG
NPTII R	AACTCGTCAAGAAGGCGATAG
NtACT F	CCACTGCTGAACGGGAAATT
NtACT R	GCTGCTCTTGGCAGTGTCOA
NtAQP F	TTTCCTCAAGAAGCCTTAATCTTT
NtAQP R	TTGAACACAAGAAAATCCACATT
NtPIP2;1-F	TTGCAACCACTACCAGAAAA
NtPIP2;1-R	AATTTGGACAGATGAATGCAA
pBIrev	GCTTTCCCACCAACGCTGATCAAT
RevMax	CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA

APÊNDICE B - Curvas de dissociação

Figura 1 Curva de dissociação (“Melt Curve”) para o par de *primer* GUS.Figura 2 Curva de dissociação (“Melt Curve”) para o par de *primer* NtActin.

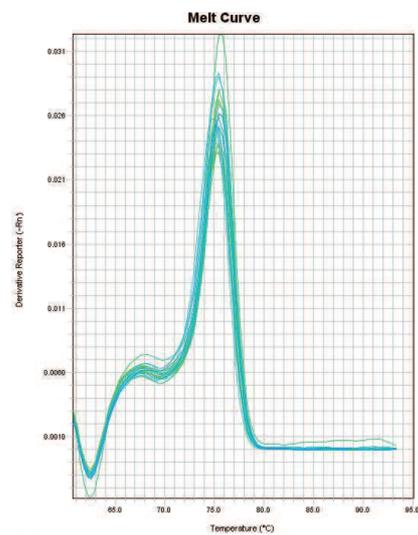


Figura 3 Curva de dissociação (“*Melt Curve*”) para o par de *primer* NtAQP.

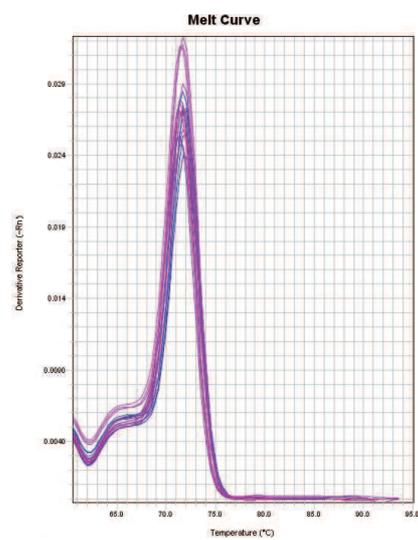


Figura 4 Curva de dissociação (“*Melt Curve*”) para o par de *primer* NtPIP2;1.

ANEXO

ANEXO A–Descrição de protocolos de meios e soluções

1. Soluções para extração de plasmídeos

Solução I (GET)

Para preparar 500 mL de solução usa-se:

- a) 23mL de solução de glicose 1 M
- b) 10mL de solução EDTA 0,5M a pH 8,0
- c) 13mL de solução de Tris 1M a pH 7,4
- d) Completar o volume para 500mL com água deionizada

Estocar a 4°C

Solução II

Preparar somente na hora em que for usar. Para preparar 15 mL de solução usa-se:

- a) 10 mL de água deionizada
- b) 750 µL de solução de NaOH 4M
- c) 1,5 mL de solução SDS 10%
- d) Completar o volume para 15 mL com água deionizada

Não autoclavar a solução depois de pronta.

Solução III

Para preparar 100 mL de solução III usa-se:

- a) 60 mL de solução de acetato de potássio 5M
- b) 11,5 mL de ácido acético glacial.
- c) 28,5 mL de água deionizada(volume final de 100 mL)

Estocar a 4°C

Não autoclavar a solução

2. Preparo de meio SOC

Para preparar 100 mL de meio SOC usa-se.

- a) 2 g de Peptona
- b) 0,5 g de Extrato de levedura
- c) 1 mL de NaCl 1M
- d) 250 μ L de KCl 1M
- e) Completar o volume com água deionizada para 98 mL - (Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M)
- f) Na capela adicionar 1 mL de MgCl₂ 1M (estéril), 1 mL de MgSO₄ 1M e 1 mL de Glicose 2M (filtrada).
- g) Aliquotar em tubos falcon de 15 mL.

3. Preparo de meio LB (Luria-Bertani)

Para preparar 1 L de meio LB usa-se:

- a) 10,0 g de NaCl
- b) 10,0 g de Peptona
- c) 5,0 g de Extrato de levedura
- d) Adicionar 800 mL de água deionizada e ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M
- e) Completar o volume para 1 L com água deionizada
- f) Autoclavar por 20 min.

OBS: Para preparar 1 litro de meio LB sólido acrescentar 16 g de ágar bacteriológico.

4. Preparo de meio YEB (*Yeast Extract Broth*)

Para preparar 1 L de meio YEB usa-se:

- a) 5,0 g de Extrato de carne
- b) 5,0 g de Peptona

- c) 5,0 g de Sacarose
 - d) 1,0 g de Extrato de levedura
 - e) 240 mg de MgSO_4
 - f) Adicionar 800 mL de água deionizada e ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M
 - g) Completar o volume para 1 L com água deionizada
 - h) Autoclavar por 20 min.
- OBS: Para preparar 1 litro de meio YEB sólido acrescentar 16 g de ágar bacteriológico.