

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica**

Clonagem e estudo funcional do promotor do gene *DREB* da mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Angélica Taveira Morais

**Brasília-DF
2008**

Clonagem e estudo funcional do promotor do gene *DREB* de mamoneira (*Ricinus communis* L.)

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA, DO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BOTÂNICA**

**Angélica Taveira Moraes
Orientador: Francisco José Lima Aragão**

**Brasília-DF
2008**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Dr. Francisco José Lima Aragão.

Clonagem e estudo funcional do promotor do gene *DREB* de mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Angélica Taveira Morais

Esta dissertação foi julgada e adequada para obtenção do título de Mestre em Botânica e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília.

Comissão Examinadora

Dr. Francisco José Lima Aragão

Presidente da Banca Examinadora-Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Dr. Luis Alfredo Rodrigues Pereira

Membro-Universidade de Brasília-UnB

Dra. Kenny Bonfim

Membro- Ministério da Saúde-MS

Dedicatória

A DEUS, por toda proteção e graça...

...o milagre da vida...

Aos meus pais Dina & Tião, pelo amor,

apoio e entendimento...

À minha irmã Leila, pelo carinho...

Ao meu amado Alípio pelo carinho e

compreensão...

Agradecimentos

À DEUS pela vossa existência em minha vida com graças e bênçãos e por proporcionar-me pessoas maravilhosas ao meu redor, como...

Meus pais amáveis, Geraldina e Sebastião por toda a dedicação, carinho e ensinamentos em toda esta jornada e na realização deste projeto,

Minha irmã Leila pelo carinho cotidiano,

O Pesquisador e Orientador Francisco José Lima Aragão pelo seu imenso apoio, amizade e credibilidade na realização deste trabalho,

O Pesquisador Giovanni Rodrigues Vianna, por sua infinita amizade e incentivo durante o trabalho,

O Pesquisador e amigo Sérgio pela confiança e auxílio,

O pesquisador Dr. Elíbio Rech;

O pesquisador Dr. Cristiano Lacorte pelas conversas esclarecedoras,

O pesquisador Dr. Luiz Alfredo pelas contribuições engrandecedoras no projeto,

Os técnicos do laboratório Luiz e Warley, pela amizade e ensinamentos,

À dona Izabel pelo carinho e orações,

À amiga simplesmente Elsa, pelo apoio e dedicação,

À amiga, companheira e animadora Thais Cipriano (conseguimos amiga!),

Os amigos do laboratório de transferência de genes, por toda a convivência, Nayche, Cristina, Vânia, Aline, Daniele, Emanuel (aulas de botânica!), Gabriela, Fernanda, Andréa Rachel, Well, Renata, Hugo,

Bárbara Dias, Margareth, Luisa, Natália, Betúlia, Paula, Gustavo, Nicolau, Sharon, Érica os quais proporcionam um ambiente agradável e descontraído,

Às amigas Maria Laine, Kenny e Aysi, pelo apoio e palavras positivas,

Aos colegas do laboratório de Apomixia,

À colega e Dra. Marli Catarina do laboratório nutrigenômica vegetal-LGN pelo incentivo e conversas descontraídas de apoio!

À amiga Bruna pela amizade e apoio ("o fumo será transformado!"),

Às amigas Thais Palácio, Franciele e Renatinha pela amizade acolhedora e fiel,

À amiga paraense Cibelle pela grande amizade, compreensão e apoio (transformaremos este fumo amiga!),

À amiga e fisioterapeuta Marilza pela amizade e ensinamentos de "boa postura colunar!"

Aos meus colegas de curso de Mestrado pelas conversas culturais...

Aos professores do Departamento de Botânica pelos incentivos e orientações,

Aos meus tios e tias, primos e primas, minha vovó Ângela e demais familiares que sempre me incentivaram à conclusão deste projeto,

Ao meu sogro Seu Raimundo e minha sogra Dona Ceíça pelo carinho, amizade e apoio inestimável,

A minha querida cunhada Aline por toda amizade,

Ao meu amado, querido e companheiro Alípio, por todo amor, ternura, apoio e paciência e compreensão por toda esta jornada por sempre acreditar e animar dia-a-dia! Amo-te!

E...

*À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por oferecer a
capacidade de realização deste trabalho.*

Muito obrigada....

“O mundo não deve ter fronteiras, mas horizontes”.

André de Botton

“Não se aprende bem a não ser pela experiência”

Bacon

“A vida é uma obra de arte que não permite ensaios”

Charlie Chaplin

Índice

Índice de figuras.....	XII
Índice de tabelas.....	XIII
Abreviaturas.....	XIV
Resumo.....	XV
Abstract.....	XVI
1. Introdução	1
1.1. Relações hídricas da célula vegetal	3
1.2. Mecanismos que proporcionam a ocorrência do déficit hídrico.....	5
1.3. Principais efeitos ao vegetal ocasionada durante o estresse hídrico.....	6
1.4. Respostas moleculares e bioquímicas durante o estresse hídrico.....	8
1.5. Reconhecimento do estresse hídrico.....	9
1.6. Mecanismos de proteção à maquinaria celular.....	11
1.7. Gene <i>DREB</i>	13
1.8. A espécie <i>Ricinus communis</i> L.-Mamoneira.....	14
1.9. Importância econômica da cultura da mamoneira.....	16
1.10. Transformação genética de plantas	18
1.11. Utilização de genes marcadores de seleção.....	21
2. Objetivos.....	24
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1. Clonagem de fragmento da região codificante do gene <i>DREB</i> de <i>Ricinus communis</i> L.....	25
3.2. Clonagem do promotor do gene <i>DREB</i> de <i>Ricinus communis</i> L.	26
3.3. Construção do vetor de expressão para a transformação genética de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	30

3.4. Transformação genética de plantas de <i>Nicotiana</i>	
<i>tabacum</i>	32
3.4.1. Transferência do vetor para <i>Agrobacterium</i>	
<i>tumefaciens</i>	32
3.4.2. Co-cultura com fragmentos foliares de <i>Nicotiana</i>	
<i>tabacum</i>	32
3.4.3. Regeneração das plantas transformadas.....	33
3.5. Análises da presença da proteína PAT.....	34
3.6. Análise da expressão do promotor do gene <i>DREB</i> de mamona em plantas transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i> sob condições de estresse hídrico.....	34
3.7. Análise filogenética da região codificante do gene <i>RcDREB</i> de mamona.....	35
4. Resultados e Discussão.....	36
4.1. Clonagem e sequenciamento do promotor do gene <i>DREB</i> de mamona.....	36
4.2. Construção do vetor e transformação genética de plantas de fumo via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
4.3. Detecção da proteína PAT no tecido foliar de plantas de fumo regeneradas.....	40
4.4. Estudo da expressão do promotor do gene <i>RcDREB</i> em folhas de fumo transgênico.....	42
4.5. Estudo filogenético do promotor do gene <i>DREB</i> de <i>Ricinus communis</i> L.	46
5. Conclusão.....	51
6. Perspectiva do trabalho.....	52
7. Referências Bibliográficas.....	53
Anexo 1. Soluções e Reagentes	
Anexo 2. Resumo do trabalho apresentado no 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais- 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas- 1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas	

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo de percepção do estresse hídrico.....	10
Figura 2. Esquema da clonagem de fragmento da região codificante e posterior obtenção do promotor <i>DREB</i>	30
Figura 3. TAIL-PCR.....	37
Figura 4. Seqüência do promotor (em vermelho) e do fragmento da região codificante (verde) do gene <i>DREB</i> de <i>R. communis</i> L.	38
Figura 5. Vetor final pRCDREB1pro utilizado para a transformação genética de fumo.....	39
Figura 6. Estágios de desenvolvimento dos fragmentos foliares de fumo após a transformação com <i>Agrobacterium</i>	40
Figura 7. Teste realizado com extrato de folhas de fumo para detecção da proteína PAT.....	42
Figura 8. Expressão do gene <i>gus</i> em plantas de fumo sob condições de estresse hídrico.....	43
Figura 9. Análise filogenética das seqüências do gene <i>DREB</i>	50

Índice de Tabelas

Tabela 1. Primers específicos degenerados utilizados na amplificação do fragmento da região codificante do gene <i>DREB Ricinus communis</i> L.....	26
Tabela 2. Seqüência dos primers da série operon utilizada no ensaio TAIL-PCR.....	27
Tabela 3. Seqüência dos Nested primers utilizados na técnica da TAIL-PCR.....	28
Tabela 4. Programa realizado em cada ensaio da TAIL-PCR.....	29

Abreviaturas

°C	graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
DREB/CBF	Dehydration-responsive element binding protein/C-repeat-binding factor
DRE/CRT	Dehydration-responsive element/C-repeat
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
E.U.A.	Estados Unidos da América
M	Molar
Pb	Pares de bases
p/v	Peso por volume
Kb	Quilo base (1.000 bases)
RNA	Ácido ribonucléico
Xg	Força gravitacional
Rpm	Rotação por minuto
μ	Micro (10^{-6})
η	Nano (10^{-9})
U	Unidades de enzima
Ω	Ohms (unidade de resistência elétrica)
mL	mililitros
tail-PCR	Thermal asymmetric interlaced-Polymerase Chain Reaction

RESUMO

Um dos principais estresses que restringem a capacidade e a eficiência da planta realizar os processos bioquímicos importantes é a falta de água. As conseqüências para o vegetal vão desde alterações no volume celular à desnaturação de importantes proteínas, e dependendo da intensidade do estresse, poderá ocasionar a morte da planta. Com isso, as plantas apresentam mecanismos bioquímicos que respondem ao estresse hídrico. Estas respostas envolvem as funções de muitos genes que podem ocorrer em segundos ou levar horas, conferindo ao vegetal a capacidade de tolerar aquela condição desfavorável. Um dos mecanismos gênicos envolvidos na geração de respostas ao estresse hídrico em plantas, é mediado pela expressão do gene *DREB-CBF* (*Dehydration-responsive element binding protein/C-repeat-binding factor*). Este gene codifica para uma proteína regulatória, proteína DREB, um fator de transcrição que está envolvido na ativação de outros genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico. Então, iniciamos um trabalho para a obtenção e caracterização biológica do promotor do gene *DREB* da mamoneira (*Ricinus communis* L.), conhecidamente uma planta com grande tolerância à seca, por meio da técnica da TAIL-PCR. Com a finalidade de estudar a expressão deste promotor sob condições de estresse hídrico, realizamos a construção quimérica do promotor ao gene repórter *gus*, originando um vetor final denominado pRCDREB1pro, utilizado para transformar plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*). Folhas de uma planta transgênica foram utilizadas em um ensaio de simulação de estresse hídrico. Os resultados revelaram a expressão do gene *gus*, sob o controle do promotor *DREB*, apenas nas condições de estresse. Uma análise filogenética do gene *RcDREB* clonado mostrou que se trata de um gene do grupo A-5 (gene envolvidos com resposta aos estresses hídrico e salino). Este trabalho será a base para geração de plantas agricultáveis tolerantes ao estresse hídrico.

Abstract

The water deficit is the main stress that restricts the capacity and efficiency of the plant to conduct important biochemical processes. The consequence for the plant is the modification of cellular volume and denaturizing of important proteins. According to intensity of the stress condition, it can cause plant death. Plants have biochemical mechanisms to tolerance water-stress and respond to these conditions with an array of biochemical and physiological alterations, which involve functions of many gene expressions, which may occur within a few seconds or within minutes or even hours to promote the ability of the plant to survive stress. The dehydration responsive element binding proteins (DREB) are important transcription factors that induce a set of water stress- related genes. In this work we aimed the isolation of a DREB gene promoter from castor bean (*Ricinus communis* L.), known as a plant that presents a strong tolerance to drought. The TAIL-PCR was used to isolate the 5' region of a *DREB*-like gene (here called as *RcDREB*). To study the expression induced by this promoter under water-stress condition, we constructed a chimeric gene with the *RcDREB* promoter controlling a reporter gene (*gus*). The final vector (named pRCDREB1pro) was used to transform tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). Leaves from a transgenic plant were used in a simulator assay for water-stress. The results revealed that the *gus* gene expression under control of the *RcDREB* gene promoter was observed only under 4 to 8-h stress condition. A phylogenetic analysis with cloned *RcDREB* gene showed that it belongs to the group A-5 (genes that are water- and salinity stress responsive). This work will be the foundation to generate crop plants tolerant to water stress.

1. Introdução

A produtividade de uma planta depende de vários fatores ambientais ou externos que possibilitam aos vegetais condições favoráveis ao crescimento e ao desenvolvimento (Slater *et al.*, 2003). Estas condições ambientais, como a presença de dióxido de carbono, disponibilidade de água e de macros e micros nutrientes, que fornecem à planta matéria bruta para os processos metabólicos (Raven *et al.*, 2001), influenciam de modo crucial na fisiologia do vegetal. Entretanto, se houver alguma alteração no ambiente no qual a planta está inserida, que comprometa significativamente a sua morfofisiologia, o vegetal disponibilizará de mecanismos bioquímicos envolvendo a expressão de muitos genes (Bajaj *et al.*, 1999), com a finalidade de tolerar àquela alteração ambiental, caracterizada como estresse, a qual é desfavorável ao vegetal (Taiz & Zeiger, 2004). Este estresse pode ser tanto biótico, que envolve a interação com outros organismos vivos como plantas daninhas e patógenos, quanto pode ser abiótico como excesso de herbicidas, intensa luminosidade, presença de metais pesados, excesso ou falta de água e alta concentração salina. Estas oscilações ambientais comprometedoras trazem conseqüências negativas tanto para a planta quanto para a sociedade, a qual depende da produtividade e do rendimento de uma determinada cultura (Slater *et al.*, 2003; Taiz & Zeiger, 2004).

Um dos principais estresses que restringem a capacidade e a eficiência da planta realizar os processos bioquímicos importantes é o estresse hídrico, ocasionado, pelo déficit de água. Este pode ser definido como “todo conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado de maior hidratação” (Taiz & Zeiger, 2004).

O ambiente que propicia este déficit são a seca, alta salinidade e condições de baixa temperatura (Shinozaki *et al.*, 1997; Bajaj *et al.*, 1999; Cascardo *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2003). Esta falta de água também pode ocasionar estresse osmótico nas plantas (Zhu *et al.*, 1997). As conseqüências para o vegetal vão desde alterações no volume celular à desnaturação de importantes proteínas, e dependendo da intensidade do estresse, poderá ocasionar desidratação ou até mesmo a morte (Bray, 1997).

Com isso, as plantas apresentam mecanismos bioquímicos que respondem ao estresse hídrico (Seki *et al.*, 2003). Estas respostas envolvem as funções de muitos genes que podem ocorrer em segundos ou dentro de minutos a horas, conferindo ao vegetal a capacidade de tolerar àquela condição desfavorável (Bray, 1997).

Vários trabalhos têm identificado um grande número de genes envolvidos nestas respostas o que possibilita uma melhor compreensão desses mecanismos de tolerância ao déficit hídrico. Um dos mecanismos gênicos envolvidos na geração de respostas ao estresse hídrico em plantas, é mediado pela expressão do gene *DREB*. Este gene codifica para uma proteína regulatória, proteína dreb, um fator de transcrição que está envolvido na ativação de outros genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico (Seki *et al.*, 2003).

Baseado nisso, este trabalho pretende estudar a funcionalidade do promotor do gene *DREB* de *Ricinus communis* L. em plantas de fumo submetidas à diferentes condições de estresses abióticos.

1.1. Relações hídricas da célula vegetal

A água oferece, por meio de suas importantes propriedades químicas e físicas, um alto potencial de características funcionais, os quais são determinantes e fundamentais para a vida de um vegetal (Taiz & Zeiger, 2004). Dessa maneira, a água proporciona um ambiente adequado para a ocorrência da maioria das reações bioquímicas celulares, influenciam na estrutura de muitas proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, dentre outros elementos constituintes celulares, além de ser o melhor solvente conhecido, podendo desta forma, ser transportado ao longo do corpo da planta, o que possibilita as relações hídricas entre as células.

A capacidade da molécula de água exercer grande influência funcional e estrutural às células vegetais a torna um fator limitante aos processos de crescimento e desenvolvimento (Taiz & Zeiger, 2004). A absorção desta importante molécula envolve a participação dos tecidos condutores especializados da planta (xilema e floema) e da própria característica física e química da água que favorece a entrada pelas raízes.

O potencial hídrico celular é um dos importantes mecanismos determinantes na fisiologia vegetal, pois proporciona à planta disponibilidade da molécula de água, favorecendo desta maneira, um ambiente propício às reações bioquímicas necessárias. Entretanto, essa disponibilidade pode ser afetada ou influenciada por dois importantes fatores:

- **Concentração:**

Representa o efeito dos solutos dissolvidos no potencial hídrico. A presença dos solutos reduz a energia livre da molécula de água, diminuindo desta maneira o potencial hídrico. Este efeito dos solutos é denominado potencial osmótico ou potencial de solutos.

- **Pressão:**

Referido como potencial de pressão caracteriza-se pela pressão hidrostática da solução. Podendo ser positivo, no qual há aumento do potencial hídrico, ou negativo, quando há diminuição do potencial hídrico. Dentro das células vegetais, esta pressão, que é positiva, é chamada de pressão de turgor, pois resulta numa pressão contra a parede celular proveniente da absorção de água por osmose. Esta pressão turgor é essencial ao vegetal, pois, vivendo na maioria das vezes em um ambiente hipotônico (maior potencial hídrico e menor concentração de solutos), a pressão mantém o turgor da célula. O turgor celular aumenta a rigidez de células e tecidos e oferece a distensão das paredes celulares durante o crescimento celular. Em plantas não lenhosas, a pressão turgor oferece suporte ao vegetal contribuindo com a estabilidade mecânica, por meio da absorção de solutos pelo vacúolo, gerando uma força osmótica para absorção de água, possibilitando uma rigidez estrutural ao vegetal. Entretanto, a pressão hidrostática pode ser negativa, fato que ocorre no xilema e nas paredes entre as células vegetais, o que contribui para o transporte ao longo do corpo da planta.

1.2. Mecanismos que proporcionam a ocorrência do déficit hídrico

O fluxo de água, por ser um mecanismo passivo, ocorre como consequência às forças físicas, de uma região de alto potencial hídrico para uma de baixo potencial hídrico, ou seja, para uma região de baixa energia livre (Taiz & Zeiger, 2004). As plantas absorvem água

quando o potencial hídrico for menor em relação ao potencial hídrico do solo. Esta diferença provém principalmente da perda de água pela transpiração. Processo caracterizado pela participação de estruturas especializadas, os estômatos, constituídos por duas células-guarda as quais formam um poro ou abertura (ostíolo). Os estômatos localizam-se principalmente na região adaxial das folhas, podendo também ser encontrado nos caules, mas em menor quantidade. Esta perda de água pela transpiração é devido à aquisição da luz solar e o dióxido de carbono (CO_2). Pois, para o vegetal obter a energia luminosa e o CO_2 , os quais são fundamentais ao processo fotossintético, deverá ocorrer a exposição da área da superfície foliar para adquirir maior captação. Entretanto, cria-se também uma área de superfície para a transpiração, pois para o CO_2 ser absorvido, ele deve estar associado à molécula de água. Então, ao mesmo tempo em que a planta expõe a superfície foliar para os raios luminosos e ao CO_2 , há perda de vapor de água. Portanto, o vegetal deve controlar este balanço hídrico. Uma das maneiras de evitar a excessiva perda de água é por meio de uma barreira cobrindo as paredes celulares externas das células epidérmicas das folhas e do caule, esta camada denomina-se cutícula. (Raven *et al.*, 2001).

Assim, grande parte da perda de água ocorre via estômato. Este movimento estomático acontece em consequência às oscilações da pressão turgor no interior das células-guarda. Portanto, a abertura ocorre pelo deslocamento do potencial osmótico da água para dentro das células-guarda como consequência do acúmulo de solutos no interior das mesmas, originando um aumento na pressão turgor. Já o fechamento acontece pela diminuição na pressão turgor originada pela diminuição de solutos no interior das células-guarda.

Quando a demanda de água excede o fornecimento, ou seja, quando a velocidade de transpiração excede ou torna-se superior ao suprimento de água, ocorrerá déficit hídrico celular que poderá ocasionar sérios danos ao vegetal (Bray, 1997). Este déficit também é propiciado por demais fatores como alta concentração salina e condições de baixa temperatura (Bray, 1993).

1.3. Principais efeitos ao vegetal ocasionados durante o estresse hídrico

Dependendo de sua intensidade, o déficit hídrico poderá ocasionar diversas conseqüências ou danos ao vegetal (Bray, 1993). Conforme esta intensidade aumenta, as camadas superiores do solo são, na maioria das vezes, as primeiras a secar, ocasionando vários efeitos à planta em decorrência da desidratação, como por exemplo, mudanças no volume celular, desequilíbrio no gradiente do potencial hídrico, redução do turgor celular, ruptura da integridade da membrana plasmática, desnaturação de proteínas, aumento na concentração de solutos, aumento do hormônio ácido abscísico (ABA), abscisão foliar e fechamento em resposta ao ABA, diminuição da superfície foliar e fotossíntese limitada no interior dos cloroplastos.

A taxa fotossintética é geralmente proporcional à disponibilidade da superfície foliar. Esta área foliar está relacionada ao turgor celular. Se há diminuição de água, as células contraem-se, as paredes celulares afrouxam, a membrana plasmática se torna mais espessa e comprimida, tendo uma menor área a partir deste momento, e ocorrerá uma diminuição na pressão de turgor. Esta redução na pressão influencia as atividades e mecanismos correlacionados ao turgor celular, como a própria expansão foliar e alongamento das raízes.

A expansão foliar é mais sensível do que a taxa fotossintética. Porém, o estresse hídrico influencia na fotossíntese e no funcionamento estomático. Quando acontece o estresse, os estômatos se fecham e inibem a ocorrência da transpiração, podendo aumentar a eficiência da água. Entretanto, a potencialidade do déficit hídrico inibe a fotossíntese e a eficiência do uso da água é diminuída. Há redução dos fotossintetizados exportados das folhas.

As mudanças no turgor das células-guarda são fortemente influenciadas pela disponibilidade de volume celular. A perda do turgor celular ocorre como conseqüência da evaporação da água. E essa diminuição de água favorece ou promove a perda de solutos a partir das células-guarda.

1.4. Respostas moleculares e bioquímicas durante o estresse hídrico

A capacidade da planta manter suas atividades metabólicas enquanto se encontra desidratada é mediada por mecanismos de respostas moleculares e bioquímicos, os quais envolvem as funções de diversos genes específicos, que confere ao vegetal o potencial de tolerar àquela condição desfavorável. Esta resposta inicia-se primeiramente com a percepção do estresse promovida por rotas de transdução de sinais (Bray, 1993). Conseqüentemente, estas respostas, as quais irão proporcionar mudanças fisiológicas nas plantas, dependerão de vários fatores, como o genótipo, espécie, idade e o estágio de desenvolvimento da planta, tipo celular, compartimento subcelular e potencial da perda de água.

Um grande número de genes que estão envolvidos na resposta tem sido descrito e caracterizado. Estes genes induzidos pelo estresse funcionam não apenas para proteger a célula, por meio de síntese de importantes proteínas, mas também na regulação de genes na transdução de sinais (Shinozaki *et al.*, 1997). Assim, os produtos gênicos são classificados em dois grupos:

Proteínas funcionais:

Caracterizam-se por protegerem a célula contra a desidratação. Incluem:

→ Proteínas de canais hídricos (aquaporinas): Envolvidas no movimento de água através da membrana plasmática;

→ Enzimas envolvidas na síntese de osmoprotetores: Relacionadas com o acúmulo de solutos no citosol, com a finalidade de promover a manutenção do turgor celular;

→ Proteínas protetoras de macromoléculas e membranas celulares: Incluem as proteínas de embriogênese tardia -LEA (*Late Embryogenesis Abundant*); as chaperonas moleculares, como a HSP 70 BiP (70 kDa *Heat Shock Binding Protein*) e proteínas anticongelamento;

→ Enzimas detoxificantes: Relacionadas com a neutralização de radicais livres provenientes do estresse oxidativo, o qual é um efeito secundário do estresse hídrico.

→ Proteases.

Proteínas regulatórias:

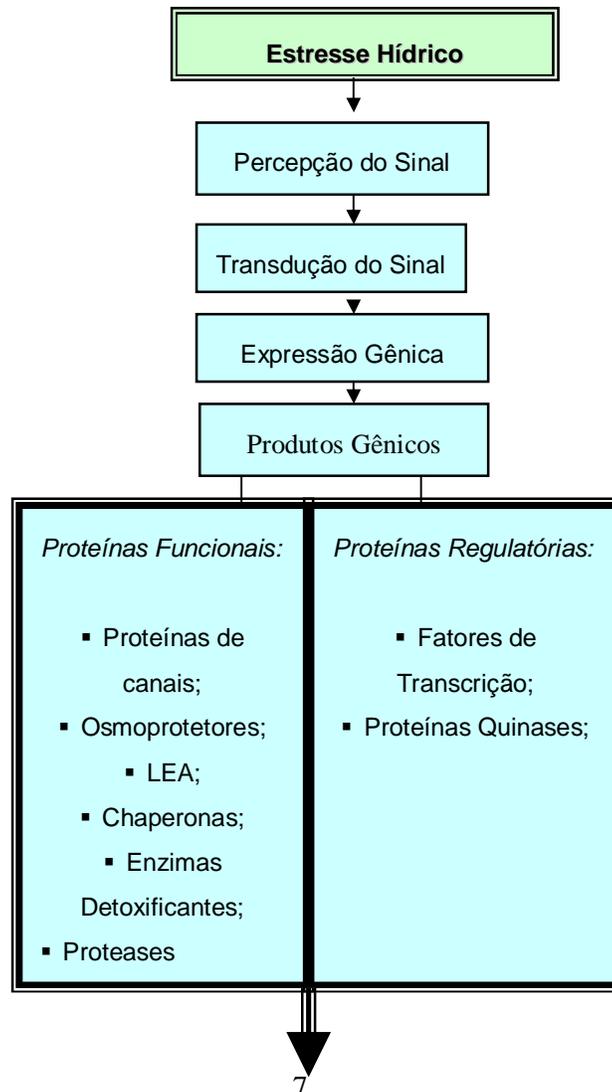
Caracterizam-se na regulação da transdução de sinais e na expressão gênica.

Incluem:

- Proteínas quinases;
- Fatores de transcrição (proteína DREB, por exemplo).

1.5. Reconhecimento do estresse hídrico

Para promover a resposta de tolerância ao estresse hídrico, é necessário primeiramente o reconhecimento do estresse, ou seja, a percepção das modificações ligadas à perda de água pela planta. Em seguida, há um “disparo” ou início da cascata da transdução de sinais que ativará genes específicos, que posteriormente oferecerá respostas bioquímicas à planta (figura 1) (Shinozaki *et al.*, 1997).



Tolerância ao Estresse Hídrico

Figura 1: Mecanismo de percepção do estresse hídrico. (Adaptado de Shinozaki *et al.*, 1997)

1.6. Mecanismos de proteção à maquinaria celular

Com a finalidade de tolerar a desidratação por meio da redução do potencial osmótico, este ajuste, o qual promove manutenção do turgor celular, é caracterizado pelo acúmulo de solutos no interior da célula. Estes solutos são denominados de osmoprotetores, osmólitos ou solutos compatíveis. No início da perda de água, ocorre primeiramente um acúmulo de íons dentro dos vacúolos, e isto gera uma mudança no balanço hídrico da célula. Assim, para manter o equilíbrio hídrico celular, há acúmulo destes osmoprotetores, os quais não oferecem prejuízos à célula. Os principais solutos compatíveis acumulados são: manitol, prolina, glicina, betaína, trealose, frutano, D-ononitol e poliaminas (Bajaj *et al.*, 1999). A potencialidade dos osmólitos foi descoberta primeiramente em plantas de tabaco transformadas com o gene oriundo da *E. coli*, *mtlD*, que codifica uma enzima que faz parte da síntese de um soluto compatível, o manitol 1-fosfato-desidrogenase. A superexpressão desse osmoprotetor em plantas de fumo transgênicas conferiu a capacidade de tolerar alta concentração salina (Zhu *et al.*, 1997). Desde então muitos trabalhos foram desenvolvidos com a finalidade de caracterizar genes que codificam estes osmoprotetores, objetivando à tolerância ao estresse hídrico, como por exemplo plantas de fumo foram transformadas com o gene *TPSI*, proveniente de um fungo, que codifica a enzima 6-fosfato sintetase, que produz o osmólito trealose, conferiu a estas plantas um aumento na tolerância à seca (Bajaj *et al.*, 1999).

Outras importantes proteínas envolvidas na proteção celular vegetal durante o estresse hídrico, são as proteínas LEA. Estas foram identificadas primeiramente em fases de maturação e dessecação do desenvolvimento de sementes (Bray, 1993; Zhu *et al.*, 1997), e desempenham uma proteção crucial à planta durante a falta de água. E esta capacidade

provém de suas características químicas, as quais envolvem a hidrofiliidade e composição básica dos aminoácidos o que permite a retenção da molécula de água e impedimento da cristalização de importantes proteínas durante a desidratação; renaturação de proteínas mal dobradas (atividade chaperônica) e seqüestro de íons. Há pelo menos seis grupos (grupo 1 a 6) de genes *lea* identificados e caracterizados de acordo com suas funções específicas (Bray, 1993).

Há também as enzimas detoxificantes, as quais estão envolvidas no estresse oxidativo. Este estresse, o qual é um efeito secundário da maioria de outros estresses bióticos e abióticos, incluindo o déficit hídrico, surge como conseqüência da produção de radicais livres (superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil), os quais ocasionam danos à célula desde a fragmentação de cadeias peptídicas à lesões irreversíveis no DNA (Bajaj *et al.*, 1999). Assim, enzimas detoxificantes são expressas com o objetivo de neutralizar estes radicais. Incluem superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathiona S-transferases e hidrolases solúveis (Shinozaki *et al.*, 1997).

1.7. Gene *DREB*

O mecanismo da transcrição gênica é controlado pela interação de proteínas específicas denominadas de fatores de transcrição, que reconhecem seqüências reguladoras específicas presentes nos promotores dos genes (Taiz & Zeiger, 2004). Diferentes genes induzidos pelo déficit hídrico, alta concentração salina e estresse pelo frio são regulados por rotas de sinalização que ocasionam a ativação desses fatores de transcrição.

Um dos fatores de transcrição estudado é o Dreb/CBF (Dehydration-responsive element binding protein/C-repeat-binding factor) que se liga a uma região específica presente em diversos genes relacionados com a tolerância ao estresse hídrico. Esta região possui uma seqüência conservada -GCCGAC- denominada de DRE/CRT (Dehydration-responsive element/C-repeat) (Agarwel *et al.*; 2006).

Diversos genes *DREB* tem sido estudados e caracterizados em várias espécies de plantas, tais como *Arabidopsis*, trigo, centeio, tomate, milho, arroz, cevada e colza (Bo Hung & Liu, 2006). Os genes *DREB* podem ser divididos em dois grupos de acordo com o estresse envolvido: *DREB1*, relacionado com a tolerância a baixas temperaturas- estresse do frio- e *DREB2* associado com a tolerância à falta de água. Todas as proteínas DREB possuem um domínio altamente conservado chamado ERF/APE2, que estão envolvidos na resposta à expressão do hormônio etileno e a morfogênese floral, respectivamente (Huang & Liu, 2006; Shinozaki *et al.*; 1997).

1.8. A espécie *Ricinus communis* L.

De acordo com Chierice & Claro Neto (2001) “a origem desta planta é muito discutida, já que existem relatos, em épocas bastante longínquas, de seu cultivo na Ásia e na África. A diversificação de um grande número de variedades desta planta, encontradas tanto no continente africano, como no asiático, dificulta o estabelecimento de uma procedência efetiva da mamona. A facilidade de propagação e de adaptação em diferentes condições climáticas propiciou à mamona ser encontrada ou cultivada nas mais variadas regiões do mundo, como no norte dos Estados Unidos da América e na Escócia”. Ainda de acordo com esse autor, “no Brasil, a mamona foi trazida pelos portugueses com a finalidade de se utilizar seu óleo para iluminação e lubrificação de eixos de carroças. O clima tropical, predominante no Brasil, facilitou o seu alastramento. Assim, hoje podemos encontrar mamoneira em quase toda extensão territorial, como se fosse uma planta nativa, e em cultivos destinados à produção de óleo”. Desta forma, seu cultivo pode ser favorável principalmente em regiões semi-áridas brasileiras, uma vez que a mamona apresenta a característica de ser tolerante à seca, além de possuir um fácil manejo (Kouri, *et al.*, 2004), propiciando um desenvolvimento sócio-econômico nestes locais desprovido de culturas adaptadas ao clima seco.

Pertencente à Ordem Geraniales, Família, Euphorbiaceae, Gênero *Ricinus*, Espécie *R. communis* L., a mamoneira é uma planta, oleaginosa, heliófila, arbustiva, podendo apresentar um certo nível de xerofitismo, possui uma grande capacidade de adaptação à diferentes ambientes e é exigente em calor, necessitando de períodos secos para a manutenção dos

frutos, e sendo sensível ao excesso de umidade no solo. Apresenta crescimento dicotômico, polimórfico, com baixa eficiência no processo fotossintético C3, o que promove ser uma espécie de morfologia e fisiologia complexa.

A mamoneira tem $2n = 20$ cromossomos e este número é constante em todas as suas subespécies e formas. Seu porte é na maioria das vezes classificadas em anão (altura inferior a 1,8m), médio (altura variando entre 1,8 a 2,5 m), alto (altura variando entre 2,5 a 5,0 m) e arbóreo (altura superior a 5m).

A cor do caule pode variar de vermelha à arroxeadada, e pode possuir uma cobertura serosa, podendo aparecer nas inflorescências e nos pecíolos. As folhas apresentam também variações na cor, verde-claro ou vermelho-escuro, dependendo da presença do pigmento antocianina; são longas, com pecíolo fistuloso e comprido, com glândulas nectaríferas, alternas, peltadas ou palmatodigitadas.

A mamona apresenta uma haste principal, a qual possui uma inflorescência terminal denominada racemo primário. Depois de seu surgimento, começa a aparecer nos nós, logo abaixo do primeiro racemo, as ramificações laterais das hastes. Geralmente, a mamona, pode apresentar dois ou três ramos, que surgem simultaneamente, na respectiva ordem: o primeiro é situado no primeiro nó logo abaixo do racemo primário, o segundo no nó dois e o terceiro no nó três; cada um desses ramos é finalizado em um racemo, chamado secundário.

Da mesma maneira, aparecem novos ramos logo após da formação dos secundários, terminado também em racemos, chamado terciários. Estes racemos comportam flores masculinas na parte inferior e feminina na superior, e esta condição de planta monóica. Entretanto, pode acontecer o aparecimento, mas raramente, no ápice da inflorescência, flores hermafroditas (Kouri, *et al.*, 2004). Sendo uma cápsula tricoca e apresentando formas variáveis em tamanho, o fruto pode possuir a presença de papilas ou espinhos agrupados em racemos. Podendo ser deiscente, semideiscente e indeiscente. Sua semente também pode ter uma variação em formatos e cores.

1.9. Importância econômica da cultura da mamoneira

Devido as suas propriedades químicas diferenciadas presentes nas moléculas constituintes de seu óleo, a mamoneira (*Ricinus communis* L.) apresenta um grande valor econômico e social, o que proporciona a ser uma das principais oleaginosas do mundo (Beltrão *et al.*, 2003). E estas características químicas que incluem a alta concentração do ácido graxo ricinoléico, cerca de 90%, e um grupamento hidroxila (OH), o que torna o óleo mais viscoso, solúvel em álcool a baixa temperatura, além de adquirir uma estabilidade química e física, possibilita ao óleo da mamona ser matéria prima para inúmeros produtos industrializados, como por exemplo, resinas, vernizes, lubrificantes, plásticos, fibras sintéticas, podendo ser encontrado até em cosméticos (Embrapa Algodão, 2006; Moraes *et al.*, 2004).

Após o processamento industrial da semente, em cada tonelada de óleo extraído, há produção de aproximadamente 1,28 toneladas de torta. Esta tem principal funcionalidade como adubo orgânico e fertilizante, sendo imprópria para consumo animal. Este impedimento é proporcionado pela sua toxicidade, em razão da presença da proteína ricina, que mata a célula eucariótica por inibição da síntese protéica (Halling *et al.*, 1985); e desencadeamento de processos alérgicos provenientes da existência do complexo alergênico, pertencentes à classe das albuminas 2S. Portanto, apesar da mamona ser inadequada à alimentação animal, ela apresenta uma importância grandiosa na indústria. Esta valoração proporciona a essa oleaginosa ser cultivada comercialmente em mais de 15 países, sendo que a Índia, a China e o Brasil são respectivamente, nesta ordem, os maiores produtores mundiais (Embrapa Algodão, 2006).

Porém, a área de cultivo da mamona não está restrita apenas à finalidade na aplicação industrial, mas também na participação na produção do biodiesel. Este é caracterizado como combustível biodegradável oriundo de fontes naturais renováveis como óleos vegetais e gordura animal (<http://www.biodiesel.gov.br/>, acessado em 06/07/2006). Apesar deste biocombustível também ser obtido por outros óleos vegetais tais como girassol, babaçu, o pinhão-manso, amendoim, soja, dentre outras, a mamona apresenta um maior destaque neste processo de obtenção desta fonte energética, propiciado por suas características químicas

importantes e também pelo seu caráter fisiológico, pois é uma planta que apresenta tolerância à seca, o que promove um aumento gradativo da sua área de cultivo, favorecendo um desenvolvimento socioeconômico em diversos Estados brasileiros.

Apesar de existir muitos estudos sobre os efeitos do estresse hídrico sobre a morfologia da mamona, há poucos trabalhos desenvolvidos em relação aos genes envolvidos na tolerância ao estresse hídrico. Assim, é importante compreender os mecanismos de expressão gênica durante estas condições desfavoráveis.

1.10. Transformação genética de plantas

A obtenção de plantas com caracteres fenotípicos desejáveis ocorre há muitos anos por meio de melhoramento clássico. Entretanto, este mecanismo convencional de transferência gênica esbarra em alguns problemas tais como, o reduzido *pool* gênico de algumas espécies, ligação de genes e a não compatibilidade sexual. Assim, tendo na natureza a fonte da variabilidade genética, a utilização das técnicas da engenharia genética, comumente denominada de tecnologia do DNA recombinante, oferece a capacidade de inserir novos caracteres em uma planta específica (Brasileiro *et al.*, 1998). Por definição, transgênico é um organismo de constituição genética alterada pela introdução controlada de gene (s) de outro organismo sem a ocorrência de fecundação (Zanatta, 2003).

Para obtenção de plantas transformadas é necessário primeiramente a identificação do gene responsável pelo caractere fenotípico desejável em um organismo doador, em seguida a seleção de um vetor de transferência ou da técnica mais adequada para a transformação do organismo e, finalmente a identificação do receptor para o gene de interesse.

Existem dois métodos utilizados para inserção de genes em plantas, o primeiro é o método indireto, caracterizado pelo uso de microrganismos, os quais inserem seu material genético ao receptor; o segundo método é o direto, e implica na inserção do gene de interesse por meio de mecanismos químicos ou físicos. No mecanismo indireto há a

participação da *Agrobacterium tumefaciens*. As agrobactérias são microrganismos predominantemente do solo, aeróbicas, Gram-negativas e possuem o formato de bacilos, além de não formarem esporos. Sua potencialidade de introdução de genes ao receptor refere-se à maneira de introdução do material genético, pois uma vez que parte do material genético bacteriano fará parte do material genético vegetal, mudando desta maneira a expressão gênica da planta, ela apresenta a capacidade de infectar o hospedeiro e ocasionar danos prejudiciais, como a doença galha-da-coroa, a qual possui aspecto tumoral no local da infecção. Esta doença está relacionada com a presença de um plasmídeo, presente na *Agrobacterium tumefaciens*, com alto peso molecular (150 a 250 Kb) denominado de plasmídeo Ti (Tumor inducing). Neste plasmídeo há uma região específica, o T-DNA (Transferred DNA), o qual é transferido do microrganismo para o hospedeiro vegetal, e esta transferência é mediada pela ativação de genes da região *vir*, um regulon composto de seis a oito operons, da *Agrobacterium tumefaciens*. Com isso, os novos genes inseridos no material genético vegetal serão transcritos e ocasionará um desequilíbrio no balanço hormonal da planta, provocando um crescimento desordenado de células e originando a constituição do tumor no local da infecção.

Portanto, esta maneira de inserção do gene ao hospedeiro é utilizada para obter plantas transformadas, o que caracteriza a *Agrobacterium tumefaciens* um “engenheiro genético” natural. Inicialmente é necessário obter linhagens nas quais o T-DNA original é deletado, processo ocorrido pela dupla recombinação. Em seguida, é construído o vetor com o gene de interesse, o qual será clonado entre as extremidades do T-DNA. Estes vetores podem ser binários, tendo a capacidade de reproduzir independentemente do plasmídeo ou co-integrados, originados de vetores intermediários. Estes não são capazes de replicar em *Agrobacterium*, mas se integram ao plasmídeo Ti por meio da recombinação simples, por meio de uma região de homologia ao T-DNA da linhagem desarmada, constituindo o vetor co-integrado. Posteriormente, há inserção de um dos vetores à linhagem desarmada, isto é, com a deleção ocorrida no T-DNA, através da conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico.

No mecanismo de transformação direta, utilizam-se dois principais procedimentos, a

eletroporação de protoplastos e a biobalística. O primeiro caracteriza-se pela introdução do gene de interesse por meio de aberturas ou poros feitos a partir de um pulso de alta voltagem em protoplastos (células vegetais sem a parede celular), permitindo desta maneira integração do transgene à célula vegetal.

Denominado também de acelerador de partícula, *gene gun* ou biolística, o sistema biobalístico, foi proposto inicialmente por Sanford *et al.*, (1987), e o mecanismo de ação é ocasionado por meio da utilização de microprojéteis de metais pesados, acelerados com a finalidade de inserir o material genético ou outras moléculas em células e tecidos *in vivo*. Partículas de ouro ou tungstênio são cobertas com o material genético de interesse e são aceleradas, em condições de vácuo, a velocidades superiores a 1.500 Km/h sobre o tecido ou célula-alvo, sem prejudicar o material vegetal. A aceleração destas micropartículas pode ser realizada por uma onda de choque com energia suficiente para deslocar uma membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com o material genético. A onda de choque pode ser provocada por uma explosão química (pólvora) (Sanford *et al.*, 1987), por uma descarga de gás hélio a alta pressão (Sanford *et al.*, 1991; Aragão *et al.*, 1996), pela vaporização de uma gota de água decorrente de descarga elétrica com alta voltagem e baixa capacitância (McCabe *et al.*, 1988; Christou, 1993) ou com baixa voltagem e alta capacitância (Rech *et al.*, 1991; Aragão *et al.*, 1992; 1993;), ou por uma descarga de ar comprimido (Morikawa *et al.*, 1989). Os sistemas que utilizam gás hélio sob alta pressão e descarga elétrica possuem uma melhor potencialidade na eficiência de obtenção de altas frequências de transformação em diferentes espécies vegetais (Rech & Aragão, 1998). Vários equipamentos relacionados com aceleração de micropartículas foram desenvolvidos em vários países, desde os Estados Unidos até a China, passando pelo Brasil, onde no Laboratório de Transferência de Genes, do Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa, foi desenvolvido acelerador de micropartículas (Aragão, 2003).

1.11 Utilização de genes marcadores de seleção

Com a finalidade de impedir a formação de plantas quiméricas e diminuir o número

de eventos não transformantes, o gene marcador de seleção oferece um potencial dominante às plantas transformadas, aumentando deste modo a sua frequência (Aragão *et al.*, 2000).

Inseridos juntamente com o gene de interesse, a expressão dos genes marcadores ocorre por meio da síntese de um produto ou proteína com atividade enzimática que irá oferecer às células transformadas resistência a um determinado substrato, antibiótico ou herbicida, permitindo que apenas células transformadas cresçam (Zanatta, 2003). Portanto, a utilização de gene marcador permite diferenciar o material transformado do não transformado.

Segundo Brasileiro & Aragão (2001), a eficiência do marcador de seleção depende das características do agente seletivo, que irá inibir o crescimento das células não transformadas; do gene marcador de seleção e do material vegetal.

Os genes marcadores que conferem às plantas resistência à antibióticos mais utilizados em transferência gênica são o gene *neo* ou *nptII*, gene marcador primeiramente empregado em transformação de plantas (Bevan *et al.*, 1983), o qual possibilita a resistência aos antibióticos canamicinas A,B e C; neomicinas e gentamicinas A. Tem-se o gene *hpt*, que codifica para a enzima higromicina fosfotransferase (HPT) e oferece resistência ao antibiótico higromicina (van den Elzen *et al.*, 1985).

Sathasivan *et al.*, (1990) obteve plantas tolerantes a herbicidas da classe das Imidazolinonas por meio da utilização do gene marcador de seleção *ahas* mutado, isolado previamente de *Arabidopsis thaliana*. Este gene codifica para a enzima acetohidroxiácido sintase (*ahas*), também denominado como acetolactato sintetase (ALS), que catalisa uma reação da via na biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, e apresenta uma mutação na posição 653 o que impede o reconhecimento do herbicida à enzima e conseqüentemente não exercendo sua função inibitória. De acordo com Aragão *et al.* (2000), no mecanismo de transformação gênica, a utilização do gene mutado *ahas*, resulta em um aumento significativo do número de transformantes de soja, além de ser eficiente para diversas cultivares.

2. Objetivos

▶ Geral

Clonar e estudar a funcionabilidade do promotor do gene *DREB* isolado da mamoneira (*Ricinus communis* L.)

✓ Específicos

1. Isolar, clonar e caracterizar a seqüência do promotor do gene tipo *DREB* da planta *Ricinus communis* L.
2. Obter plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* expressando o gene repórter *gus*, sob o controle do promotor do gene *DREB* de *Ricinus communis* L.
3. Analisar a expressão do gene repórter *gus* sob o controle do promotor do gene *RcDREB* em tecidos foliares de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* (expressão heteróloga) expostas a condições de estresse hídrico.

3. Materiais e Métodos

3.1. Clonagem de fragmento da região codificante do gene *DREB* de *Ricinus communis* L.

A partir de regiões conservadas identificadas em alinhamento de seqüências tipo *DREB* (DREB-like) e *CBF* (C-Repeat Binding Factor), foi realizado o alinhamento usando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) e construídos *primers* específicos degenerados (Tabela 1). Posteriormente, foi amplificado o fragmento de interesse a partir do DNA genômico de mamona utilizando os *primers* específicos por meio da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Esta reação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research) em um volume final de 50 μ l de solução contendo 20ng de DNA, extraído de folha de mamona de acordo com Doyle & Doyle (1987) 600mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18mM (NH₄)₂SO₄, 50mM de MgSO₄, 10mM de dNTP, 10,0 μ M de cada *primer* específico e 5U/ μ l de *Platinum Taq High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura foi desnaturada a 94.0° C por 2 minutos e submetida a 35 ciclos de amplificação (94.0° C por 30 segundos, 55.0° C por 30 segundos, 68.0° C por 1 minuto) finalizando com um ciclo de 10 minutos a 68.0°C. O fragmento foi aplicado no gel de agarose 2% (Anexo 1) por 1 hora a 100V, depois extraído e purificado utilizando o Kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega) e clonado no vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

O vetor foi amplificado, purificado e seqüenciado, utilizando-se os *primers* universais M13 R e M13F, em um seqüenciador automático ABI Prism1 3700, Foster City, CA, USA.

Tabela 1. *Primers* específicos degenerados utilizados na amplificação do fragmento da região codificante do gene *DREB Ricinus communis* L.

<i>Primers</i> degenerados	DREB 392	DREB 297
Seqüência	5' GCGACGTCRTGGRCA CGAGCGGC 3'	5' TGGGTGGSGGAAATT AGAGARCC 3'

R corresponde à base nitrogenada G ou A; S corresponde à base nitrogenada G ou C.

3.2. Clonagem do promotor do gene *DREB* de *Ricinus communis* L.

Para a obtenção do promotor foi realizado um ensaio de TAIL-PCR (Liu & Whittier, 1995), constituído de várias reações de PCR's primários, secundários e terciários, utilizando 20 *primers* aleatórios da série Operon (www.operon.com) (Tabela 2) em combinação com *primers* internos denominados de *Nested primers* (Tabela 3) construídos a partir da região interna do fragmento isolado.

Tabela 2. Seqüência dos *primers* da série Operon utilizados no ensaio TAIL-PCR.

<i>Primers</i> da série OPERON	Seqüência 5'→3'
OPE 1	CCCAAGTGCC
OPE 2	GGTGCGGGAA
OPE 3	CCAGATGCAC
OPE 4	GTGACATGCG
OPE 5	TCAGGGAGGT
OPE 6	AAGACCCCTC
OPE 7	AGATGCAGCC
OPE 8	TCACCACGGT
OPE 9	CTTCACCCGA
OPE 10	CACCAGGTGA
OPE 11	GAGTCTCAGG
OPE 12	TTATCGCCCC

OPE 13	CCCGATTCCGG
OPE 14	TGCGGCTGAG
OPE 15	ACGCACAACC
OPE 16	GGTGACTGTG
OPE 17	CTACTGCCGT
OPE 18	GGACTGCAGA
OPE 19	ACGGCGTAGT
OPE 20	AACGGTGACC

Tabela 3. Seqüência dos *Nested primers* utilizados na técnica da TAIL-PCR.

Nested primers	RCNESTEDR	RCR2
Seqüência	5'AACAGGAGCGAATAAGAACC 3'	5'ATCCTTGACCGCTTGTC 3'

Cada PCR foi realizado com o *primer* específico associado aos da série Operon em um termociclador PTC-100(MJ Research) num volume final de 25 μ l contendo cerca de 20ng de DNA, 600mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18mM (NH₄)₂SO₄, 50mM de MgSO₄, 10mM de dNTP mixture, 10,0 μ M de cada *primer* específico e 5U/ μ l de *Platinum Taq High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo que, o produto final da reação primária foi diluído em água estéril 1:50 μ l e secundária 1:100 μ l , as quais foram utilizadas como molde na reação secundária e terciária, respectivamente. Além disso, cada reação possuía determinado programa específico de amplificação do fragmento (Tabela 4; Figura 2).

Tabela 4. Programa realizado em cada ensaio da TAIL-PCR.

Reação PCR	Primário	Secundário	Terciário
<i>Primers</i> utilizados	DREB 392 Série Operon	RCNESTEDR Série Operon	RCR2 Série Operon
Programa realizado no termociclador	1. 95.0° POR 2:00 2. 94.0° POR 0:30 3. 62.0° POR 1:00 4. 72.0° POR 2:30 5. GO TO 2, 4X 6. 94.0° POR 0:30 7. 25.0° 5:00 8. RAMPING TO 68.0° À 0,3°C 9. 72.0° POR 2:30 10. 94.0° POR 0:30 11. 62.0° POR 1:00 12. 72.0° POR 2:30 13. 94.0° POR 0:30 14. 62.0° POR 1:00 15. 72. POR 2:30 16. 94.0° POR 0:30 17. 44.0° POR 1:00 18. 72.0° POR 2:30 19. GO TO 10, 14X 20. 72.0° POR 5:00 21. 4.0° FOREVER 22. END	1. 95.0° POR 2:00 2. 94.0° POR 0:30 3. 64.0° POR 1:00 4. 72.0° POR 2:30 5. 94.0° POR 0:30 6. 64.0° POR 1:00 7. 72.0° POR 2:30 8. 94.0° POR 0:30 9. 44.0° POR 1:00 10. 72.0° POR 2:30 11. GO TO 2, POR 14 X 12. 72.0° POR 5:00 13. 4.0° FOREVER 14. END	1. 94.0° POR 0:60 2. 44.0° POR 1:00 3. 72.0° POR 2:30 4. GO TO 1 POR 19 X 5. 72.0° POR 5:00 6. 4.0° FOREVER 7. END

Posteriormente, as amostras provenientes do PCR secundário e terciário foram aplicadas no gel de agarose a 1%, e as bandas obtidas foram extraídas do gel e purificadas utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega). Foi realizada a inserção do fragmento ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O vetor foi purificado e seqüenciado utilizando-se os *primers* universais M13 R e M13F. A seqüência foi comparada com aquela já previamente obtida.

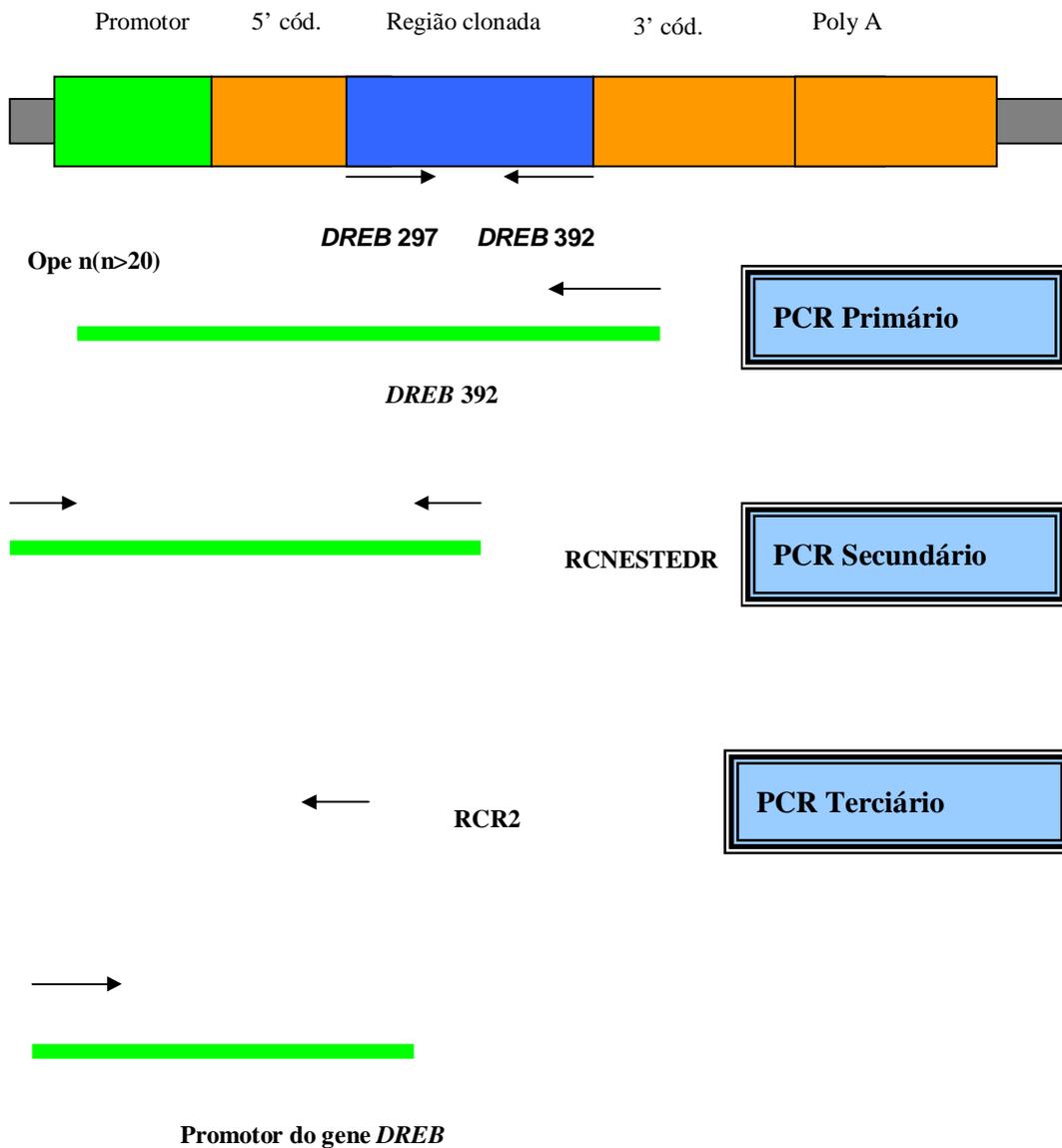


Figura 2. Esquema da clonagem de fragmento da região codificante e posterior obtenção do promotor *DREB*.

3.3. Construção do vetor de expressão para a transformação genética de plantas de *Nicotiana tabacum*

Para a re-amplificação da região 5' do promotor, foram construídos *primers* específicos RcdPNcoR (5'TCCATGGATGGAGACAAATAATCACTC 3')

e R_cDPK_{pn} (5'CGGTACCCCTTAGGACTATACACCTC3') com a adição de um sítio de *Nco*I e um de *Kpn*I, respectivamente (região sublinhada).

Em seguida, foi realizada a amplificação por PCR do promotor a partir do DNA genômico da mamona. Esta reação foi realizada em um termociclador PTC-100(MJ Research) em um volume final de 50 μ l contendo cerca de 20ng de DNA, 600mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18mM (NH₄)₂SO₄, 50mM de MgSO₄, 10mM de dNTP mixture, 10,0 μ M de cada *primer* específico e 5U/ μ l de *Platinum Taq High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura foi desnaturada a 94.0° C por 1 minuto e submetida a 35 ciclos de amplificação (94.0° C por 30 segundos, 55.0° C por 30 segundos, 68.0° C por 1 minuto e 30 segundos) finalizando com um ciclo de 5 minutos a 68.0°C. A amostra foi aplicada ao gel de agarose 2% por 1 hora a 100v, foi extraído do mesmo e purificado utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega) e clonado ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy (3.015 pb) (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para a construção do vetor de expressão para a transformação de fumo, foi utilizado o vetor pCAMBIA 3201 (11.459 pb) (CAMBIA, Camberra Austrália), o qual apresenta o gene *gus* que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS) e o gene *bar* que confere tolerância ao herbicida fitotóxico glufosinato de amônio.

Foi retirado deste vetor, através dos sítios das enzimas *Eco*RI (5'CACGTG3') e *Nco*I, o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV). O promotor do gene *DREB* foi retirado do vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega) por meio das enzimas *Eco*RI e *Nco*I, e inserido entre os sítios de *Eco*RI e *Nco*I do vetor pCAMBIA 3201 originando o vetor final para a transformação de plantas de fumo, denominado pRCDREB1pro.

3.4. Transformação genética de plantas de *Nicotiana tabacum* (fumo)

3.4.1. Transferência do vetor para *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor pRCDREB1pro foi introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem LBA 4404, de acordo com Lacorte & Romano (1999). Após a transformação das bactérias, foi realizada a extração de DNA total de *Agrobacterium* (Lacorte & Romano, 1999) e feito PCR,

nas mesmas condições descritas em 3.3, com a finalidade de verificação da presença do vetor. Uma vez confirmada a presença do vetor nas agrobactérias, estas foram utilizadas na transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* (fumo).

3.4.2. Co-cultura com fragmentos foliares de plantas de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*

Cem microlitros da linhagem de *Agrobacterium* LBA 4404 contendo o vetor pRCDREB1pro foram inoculadas em 10mL de meio LB (Miller, 1972) contendo os antibióticos 100mg/L rifampicina, 50mg/L estreptomicina e 25mg/L de cloranfenicol. A cultura foi realizada por 16 h a 28° C sob agitação a 100rpm até a fase exponencial de crescimento ($A_{600nm}=1,5$). Após a obtenção da cultura bacteriana, folhas jovens de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, cultivadas em casa de vegetação sob condições parcialmente controladas de temperatura (20 a 30°C) e umidade (~70%), foram esterilizadas com 1% hipoclorito de sódio e Tween-20 (1 gota para cada 100 ml) por 15 minutos. Em seguida, realizada enxágües em água estéril por seis vezes.

As folhas foram cortadas em quadrados de 1,0 cm² com auxílio de uma lâmina de Bisturi estéril, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril para mantê-los hidratados. Os explantes foliares foram adicionados à co-cultura em temperatura ambiente por 10 min e com leve agitação, depois transferidos para uma placa de Petri com papel de filtro estéril com a finalidade de retirar o excesso de bactérias. Em seguida foram colocados ao meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido contendo 1mg/L de BAP (Anexo 1) 48 horas a 28°C, em ambiente escuro, mantendo a face adaxial em contato com o meio.

3.4.3. Regeneração de plantas transformadas

Ao término da co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de regeneração (MS contendo 2mg/L de BAP, 300mg/L de timentin e 4mg/L do agente seletivo herbicida fitotóxico glufosinato de amônio. As placas foram mantidas em câmara de crescimento sob fotoperíodo

de 16 h à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os explantes foram cultivados por duas semanas e os calos separados e transferidos para novo meio de regeneração com o agente seletivo específico. Os brotos transformados foram adicionados meio de enraizamento (meio MS contendo 0,1mg/L de ANA (Anexo 1) com o agente seletivo priorizado). Quando as plantas atingiram aproximadamente 5 cm de altura foi realizadas análises moleculares para detecção da proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferase).

a. Análise da presença da proteína PAT

Foi realizado o imunoteste TraitCheck Crop and Grain Kit (Trait LL Test Kit; Strategic Diagnostic Inc. www.sdix.com) para a detecção da proteína PAT (fosfinotricina acetil transferase) expressada pelo gene *bar* em plantas de fumo regeneradas após a transformação genética.

3.6. Análise da expressão do promotor *DREB* de mamona em tecidos foliares de plantas de fumo transgênicas sob condições de estresse hídrico

Foi realizado o método qualitativo por meio do ensaio histoquímico da atividade enzimática da β -glucuronidase de acordo com Jefferson *et al.*(1987). As folhas da planta transgênica foram cortadas em quadrados de $1,0 \text{ mm}^2$ com auxílio de uma lâmina de Bisturi estéril, totalizando nove pedaços e colocadas em placas de Petri divididas em três grupos. As folhas foram transferidas por um período de 0, 4 e 8 horas em um dessecador com umidade relativa de 20%. Como controle foram usados tecidos de plantas de fumo não-transgênicas. Também foram utilizadas plantas transformadas com o vetor pCAMBIA3201 (com a construção CaMV35S::*gus*) e o vetor pCAMBIA(-)GUS com a seqüência codificante do gene *gus* sem a presença de um promotor. Após o tratamento de estresse, os tecidos foram submetidos ao ensaio de GUS histoquímico de acordo com Jefferson *et al.* (1987).

3.7. Análise filogenética da região codificante do gene *RcDREB*

Com a finalidade de identificar o grupo (A1 a A6) a que pertence o gene *RcDREB* cujo promotor foi isolado neste trabalho, foi feita uma análise filogenética usando a seqüência protéica do gene depositada no TIGR (www.tigr.org). A análise filogenética foi realizada usando o programa MEGA versão 4 (Kumar *et al.*, 2004). As árvores filogenéticas foram construídas usando o algoritmo *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com opção de eliminação completa. Os valores de bootstrap foram computados usando 1.000 repetições pra avaliar a robustez dos agrupamentos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Clonagem e sequenciamento do promotor *DREB* de *Ricinus communis* L.

A reação de PCR realizada com os *primers* degenerados (desenhados a partir do alinhamento de seqüências tipo *DREB* e *CBF* de várias espécies e depositadas no GenBank) possibilitou a obtenção de um fragmento de 845pb, o qual foi clonado ao vetor pGEM-T-Easy (Promega) e sequenciado. A seqüência obtida foi comparada com outras seqüências completas do gene *DREB* depositadas no *GenBank* e apresentou um alto grau de similaridade de 42-98%. Esse resultado demonstrou que o fragmento pertence a uma região interna codificante do gene *DREB* de mamona. Desta forma, com a seqüência conhecida realizou-se a construção dos *Nested primers*, e em combinação com vinte *primers* aleatórios da série Operon, foi realizado a TAIL-PCR. Considerada uma técnica altamente sensível e podendo ser aplicada em genomas complexos (Liu, *et al.*, 1995), a *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* (TAIL-PCR) permite a amplificação de fragmentos de DNA adjacentes a uma seqüência conhecida. A metodologia utiliza um conjunto de *primers* específicos juntamente com outros *primers* aleatórios, sendo que o anelamento ocorre em diferentes ciclos e temperaturas, o que caracteriza o método ser mais vantajoso, razão pelo qual a TAIL-PCR foi escolhida neste trabalho pela especificidade e eficiência em relação a outras técnicas de PCR. De acordo com as diferenças de amplificação dos fragmentos entre as PCR's, foram escolhidas as bandas que apresentavam mais especificidade entre os ciclos realizados (figura 3). Após o sequenciamento das bandas, iniciamos um estudo *in silico* utilizando o programa Tfsitescan/dynamicPlus para verificar a presença do promotor nos fragmentos. O resultado da análise revelou que a banda denominada R6 (obtida com a combinação dos *primers* OPE6 e RCR2) possui o promotor pertencente à família gênica *DREB* com tamanho de 1025 pb, (figura 4)

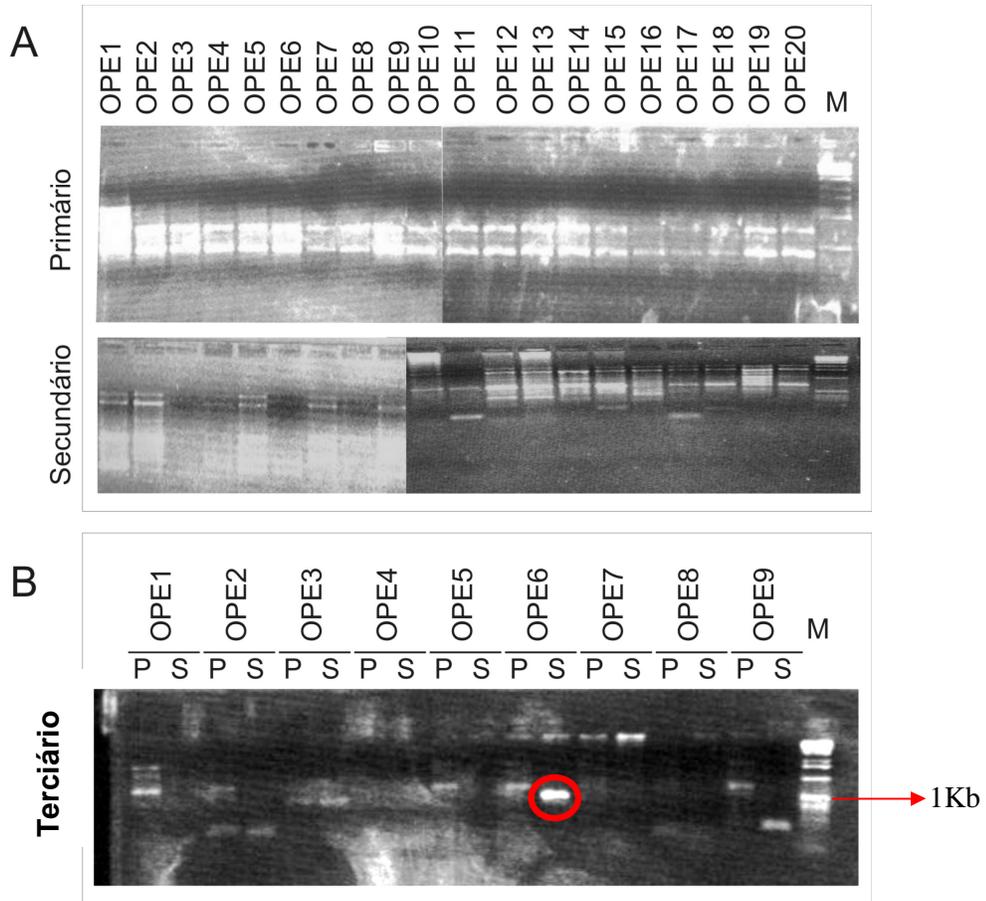


Figura 3. TAIL-PCR. Fragmentos obtidos nos ciclos primários e secundários (A) com as combinações de *primers* específicos e da série OPE. (B) Detalhes do PCR secundário (S) e Primário (P) para obtenção da banda R6 específica que corresponde ao fragmento contendo a sequência 5' (promotor) do gene *RcDREB*.

de estabelecer a concentração do mesmo nas transformações. A curva demonstrou que se poderia usar concentrações entre 1 e 4 mg/L de GA para selecionar brotos em regeneração.

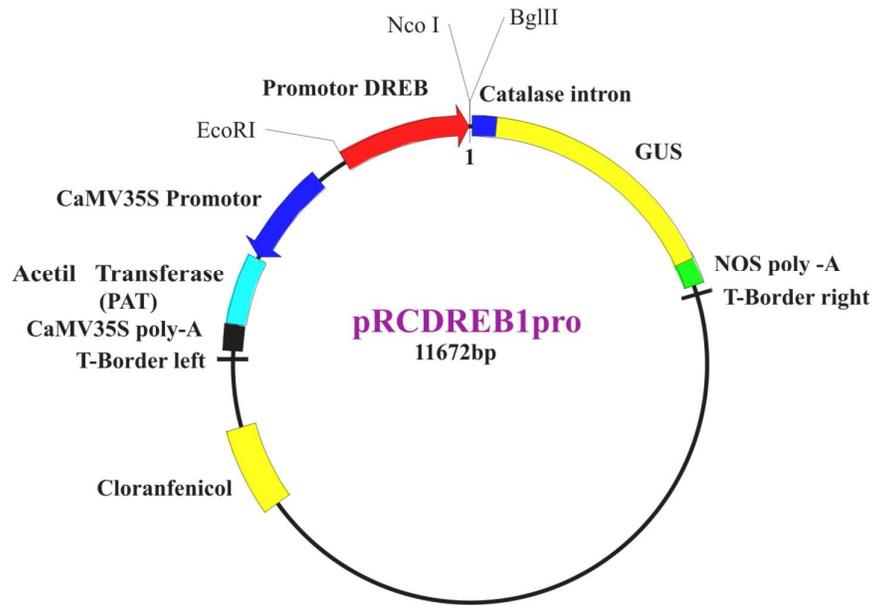


Figura 5. Vetor final pRCDREB1pro utilizado para a transformação genética de fumo.

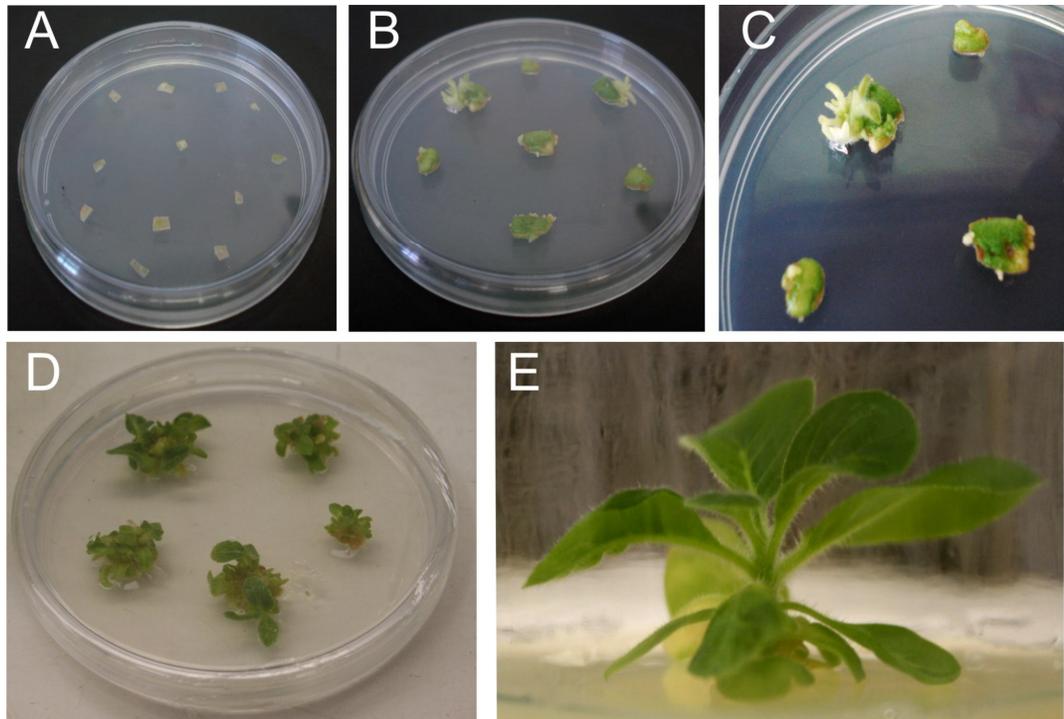


Figura 6. Estágios de desenvolvimento dos fragmentos foliares de fumo após a transformação com *Agrobacterium*. (A) Explantes excisados após a co-cultura. (B), (C) e (D) Brotos regenerando a partir dos fragmentos foliares transformados. (E) Plântula de fumo em meio de enraizamento, três meses posterior à transformação genética.

4.3. Detecção da PAT no tecido foliar em plantas de fumo regeneradas

As plantas regeneradas após a transformação genética foram submetidas ao teste TraitCheck Crop and Grain Kit (Trait LL Test Kit- Strategic Diagnostic Inc. www.sdix.com), para a verificação da presença do gene *bar*. O ensaio baseia-se na utilização de uma tira que é colocada numa pequena quantidade de extrato da planta que contém a proteína PAT (proteína fosfinotricina acetiltransferase). O anticorpo (anti-PAT) ligado a um polímero colorido se liga à proteína PAT. Em seguida é realizada uma cromatografia e o anti-PAT associado ao polímero poderá se ligar ao anticorpo específico contra PAT formando uma linha colorida na tira. A membrana possui duas zonas de captura, uma específica para a proteína PAT e uma específica para o anticorpo acoplado ao reagente colorido que não reagiu. Estas zonas de

captura exibem uma coloração avermelhada quando o sanduíche e/ou os reagentes coloridos não reagidos são capturados nas zonas específicas da membrana (Figura 7). Com os resultados confirmados para a presença do transgene *bar*. Este teste demonstrou que apenas uma planta em um total de cerca de 100 plantas demonstrou a presença do transgene. A baixa frequência de transformação observada, associada ao alto número de escapes (plantas não-transgênicas) está provavelmente ligada à concentração de GA utilizada. Provavelmente, uma concentração maior poderia gerar um menor número de escapes e um maior número de plantas transgênicas. A concentração de bactéria durante a co-cultura e a duração da co-cultura são fatores importantes e determinantes na transformação. Na presença de altas concentrações de bactérias, o tecido pode apresentar reações de hipersensibilidade a *Agrobacterium*. Em condições de baixas concentrações, somente um pequeno número de células vegetais podem ser transformado (Curtis *et al.*, 1995). Geralmente o gene de interesse é co-transferido juntamente com o gene de seleção. Porém, plantas transformadas podem expressar o gene de seleção, mas não o gene de interesse ou vice-versa. Esta ocorrência pode ser pela não-integração ou uma parcial integração de um dos transgenes (geralmente quando ele está ao lado da extremidade da esquerda do T-DNA), ou há um silenciamento provocado por co-supressão, epistasia ou um efeito do sítio de inserção. Além disso, um longo período de cultura *in vitro*, pode ocasionar variações somaclonais por mutações insercionais da região T-DNA. (Brasileiro & Dusi, 1998)

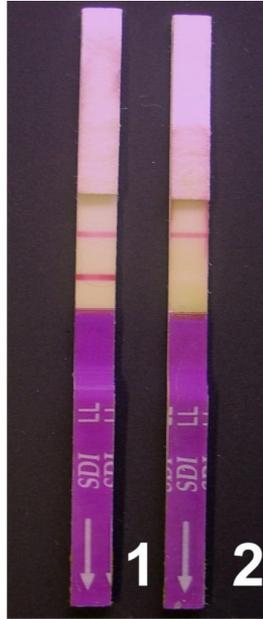


Figura 7. Teste realizado com extrato de folhas de fumo para detecção da proteína PAT. (1) Teste com a planta de fumo transgênica, o aparecimento da linha inferior demonstra a presença da proteína PAT. (2) Controle negativo realizado com folha de fumo não-transformada, apenas a linha controle negativo foi observada.

4.4. Estudo da expressão do promotor do gene *RcDREB* em folhas de fumo transgênico

Para um estudo da funcionabilidade do promotor do gene *RcDREB* foi realizado um ensaio histoquímico com tecidos foliares colocados em condições de dessecação (figura 8).

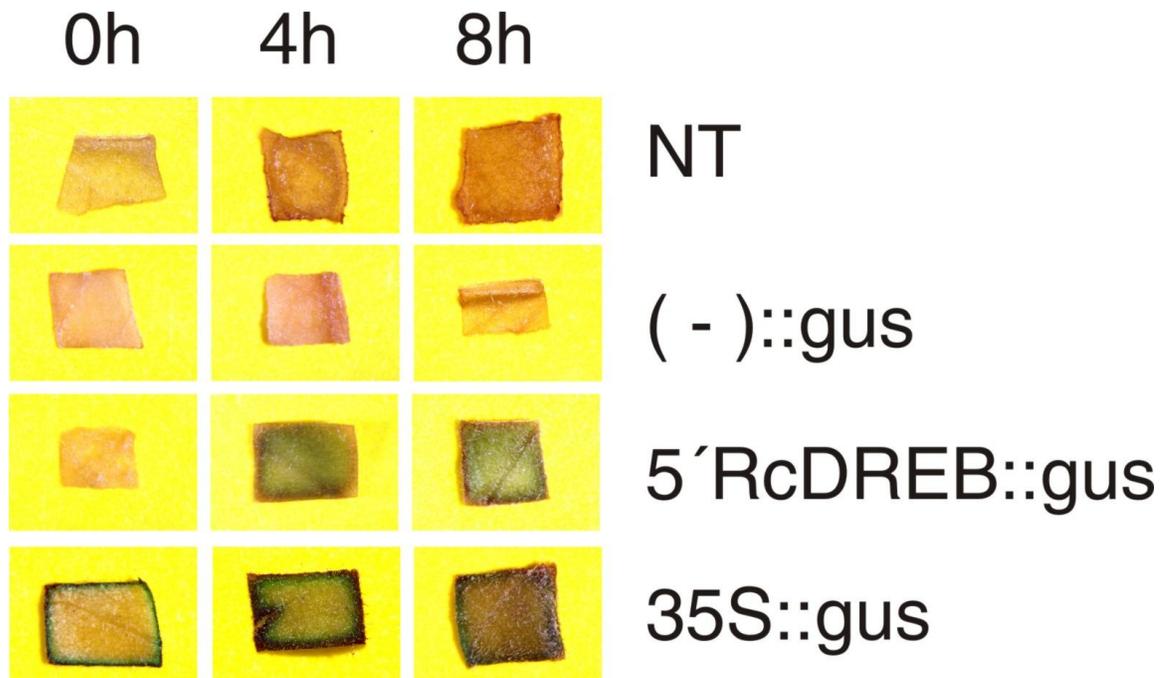


Figura 8. Expressão do gene *gus* em plantas de fumo sob condições de estresse hídrico. NT: Planta de fumo não transgênica. (-):: *gus*: Planta de fumo sem promotor (vetor fechado). 5'RcDREB::*gus*: planta transgênica com a fusão do promotor do gene *RcDREB* e a região codificante do gene *gus*. 35S::*gus* promotor do gene *CaMV35S* fusionado a região codificante de *gus*.

Recentes pesquisas têm identificado e estudado diversos fatores de transcrição que são importantes na regulação das respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas (Argawal, *et al.*, 2006; Abreu & Aragão, 2007). 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 (Doubozet *et al.*, 2003), soja (Liu *et al.*, 2005) e fumo (Park *et al.*, 2001). Estes genes podem ser classificados, em relação à resposta ao tipo de estresse, em DREB1 e DREB2, conferindo resposta a baixas temperaturas e ao déficit hídrico, respectivamente (Seki *et al.*, 2003).

Como mostrado na figura 8, a expressão do gene *gus* foi diferenciada nas folhas de fumo transformadas com o gene quimérico com o promotor do *RcDREB* controlando o gene *gus*. Quando as folhas foram expostas a uma condição que simula o estresse hídrico por um período de 4 h, foi possível observar a expressão gênica (visualizada pela reação histoquímica

de GUS), mostrando que o promotor tem resposta a esse estresse. A expressão se manteve por um período de 8h (Figura 8). Não se observou expressão quando as plantas foram transformadas com o vetor sem promotor ou em plantas não transgênicas. Como esperado, plantas transformadas com o promotor CaMV35S controlando o gene *gus* mostraram expressão durante todo o período, mesmo quando as folhas não foram submetidas ao estresse (Figura 8). 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 (Doubozet *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, em que a indução ocorrerá nestas condições desfavoráveis. Como observado na figura 8, o promotor pertencente à família DREB conduziu a expressão do gene *gus.*, após 4 horas de período de déficit hídrico. Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (1993) analisaram a expressão do gene *gus* controlado pelo promotor RD29A (*responsive drought 29 A*) em plantas de *Arabidopsis* e de fumo em condições de estresse abiótico. O resultado revelou alta tolerância à desidratação, baixa temperatura e condições de estresse salino.

Como pode ser visto, os controles positivos, por possuir o promotor CaMV35S, que é considerado de forte expressão em raízes, caules, folhas e pétalas de plantas de fumo (Odell *et al.*, 1985), apresentou coloração azul nos três tempos estabelecidos, permitindo a análise comparativa com a planta de fumo transformada com o vetor pRCDREB1pro . Embora a reação enzimática da GUS (vista pela coloração azul) pareça ser mais intensa nas folhas com o CaMV35S::*gus* que em RcDREB::*gus*, este não é um ensaio quantitativo. Narusaka *et al.*, (2003) analisaram a expressão do gene *gus* controlada pelo promotor do gene *RD29A* em condições de estresse hídrico e salino em plantas de *Arabidopsis* demonstrando o nível de expressão do gene repórter em condições de desidratação.

A expressão do gene *DREB1* de *Arabidopsis*, controlada pelo promotor 35S conferiu tolerância ao estresse hídrico e a baixa temperatura em plantas de tomate durante 21 dias, porém houve retardo no crescimento e desenvolvimento da planta (Hsieh *et al.*, 2002).

Batatas transformadas com o gene *DREB1* de *Arabidopsis*, controlada por um promotor de um gene relacionada ao estresse hídrico, *RD29A*, conferiu tolerância ao frio, mas não houve influência no desenvolvimento do vegetal (Behnam *et al.*, 2007). Estes estudos podem indicar que a expressão dos genes *DREB* ocorre somente em condições de estresse abiótico. Resposta molecular e bioquímica que reflete a capacidade do vegetal dispor de mecanismos genéticos e acionar cascatas e rotas fisiológicas visando proteção à estrutura celular.

Portanto, a identificação de promotores de genes induzidos pelo estresse hídrico é importante para o desenvolvimento de estratégias funcionais apenas nesta condição. Esses promotores, utilizados em construções quiméricas, poderão ser utilizados em plantas de interesse agrônômico como soja e feijão, possibilitando uma maior adaptação sob condições de estresse hídrico.

4.5. Estudo filogenético do promotor do gene *DREB* de *Ricinus communis* L.

Foi realizada uma análise filogenética utilizando a seqüência proteica *DREB* de *Ricinus communis* correspondente ao gene *RcDREB* cujo promotor foi clonado neste estudo. Foram reunidos alguns acessos do *GenBank* contendo seqüências das proteínas *DREB* e tipo-*DREB* de várias espécies plantas. Esta análise mostrou que estas proteínas se agruparam de acordo com a classificação da família gênica *DREB* (Figura 9). A família *DREB* apresenta dois grandes grupos principais, *DREB1* e *DREB2* (Seki *et al.*, 2003). Dois genes homólogos do *DREB1A* (*DREB1B* e *DREB1C*) e um gene homólogo ao *DREB2A* (*DREB2B*) foram isolados de *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 1998). Também foram identificados e caracterizados em plantas de *Arabidopsis* dois genes homólogos de *CBF1* (*CBF2* e *CBF3*) (Gilmour *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999). O gene *CBF1* é idêntico ao *DREB1B*; *CBF2* e *CBF3* são idênticos ao *DREB1C* e *DREB1A*, respectivamente (Argawal *et al.*, 2006). E o gene *CBF4* é homólogo ao gene *CBF/DREB1*, isolado e estudado da planta *Arabidopsis* (Haake *et al.*, 2002).

Entretanto, pela importância na ativação e expressão de outros genes relacionados a estresse abiótico e conseqüentemente na geração de respostas bioquímicas e fisiológicas, a família gênica *DREB* pode também ser subdividida em seis pequenos grupos (A-1, A-2, A-3, A-4, A-5 e A-6) (Sakuma *et al.*, 2002). Após a análise, percebeu-se que a árvore filogenética havia agrupado 5 grupos principais. O primeiro grupo, A-1 (Grupo *DREB 1/CBF3*) inclui os genes que são induzidos por baixa temperatura, mas não pela seca ou alta salinidade. O grupo A-2 (Grupo *DREB2A*) estão envolvidos em respostas ao déficit hídrico e condições de alta concentração salina, porém não apresentam respostas à baixa temperatura.

A análise filogenética mostrou que o promotor do gene *RcDREB* alvo deste estudo está incluído na grupo A-5 (os está colocada a maioria dos *DREB2*), relacionado com a resposta ao estresse hídrico e são dependentes do acúmulo do ABA. Resposta bioquímica estudada neste trabalho, em que a ativação do gene repórter *gus*, controlado pelo promotor do gene *DREB* de mamona, foi iniciada em condições de déficit hídrico nas folhas de fumo transformada.

A expressão do gene *DREB1* é extensivamente estudado em diferentes e culturas agrícolas, entretanto um pequeno número de espécies de plantas tem sido estudado para a expressão e caracterização do gene *DREB2* (Argawal, *et al.*, 2006). Desta forma, se ressalta a importância do estudo de identificação e funcionabilidade dos genes da família *DREB 2*, a qual confere tolerância ao déficit hídrico.

Durante o estresse abiótico, a concentração do hormônio ABA é alterada, principalmente em períodos de déficit hídrico (Bray, 1993). Muitos genes relacionados à resposta ao estresse abiótico são ativados pelo acúmulo deste hormônio, porém outros grupos gênicos não estão precisam de um sinal biológico da presença do ABA. Desta forma, há rotas bioquímicas que dependem do hormônio e outras rotas ocorrem de maneira independente do acúmulo do ABA (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Os grupos A-1 e A-2 pertencem a rota bioquímica independente do ABA. Os grupos A-4, A-5 e A-6 pertencem à rota dependente do hormônio e, portanto requerem biossíntese de proteínas específicas para a ativação de genes relacionados ao estresse hídrico (Liu *et al.*, 2007; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Figura 9. Análise filogenética das seqüências do gene *DREB*. As seqüências foram retirados dos bancos de acesso *GenBank* e os agrupamentos foram realizados usando 1.000 repetições (máxima parcimônia). São acessos da árvore: GmDREB1 (*Glycine max*): AAP47161; GhDBP1 (*Gossypium hirsutum*): AAO43165; GmDREB3 (*Glycine max*): ABB36646; OsRAP (*Oryza sativa*): XP_468111; NaDBF1 (*Narceus americanus*): ABA43697; GmDREBc (*Glycine max*): AAP83131; GmDREBa (*Glycine max*): AAT12423; TaDREB1(*Triticum aestivum*): AAL01124; OsDREB2A (*Oryza sativa*):AAN02487; ZmDBF1 (*Zea mays*): AAM80486; GhDBP2 (*Gossypium hirsutum*): AAT39542; GmDERBb (*Glycine max*):AAQ57226; HvCBF6 (*Hordeum vulgare*): AAX23701; TaCBF6 (*Triticum aestivum*): AAX28964; EICBF3 (*Enicurus leschenaulti*): AAX57257; OsDREB1A (*Oryza sativa*): AAN02486; OsDREB1D (*Oryza sativa*):BAD67595; AsCBF1 (*Avena sativa*): CAJ21276; BCBF1 (*Hordeum vulgare*): AAK01088; ScCBF-like2 (*Secale cereale*):AAL35759; TaCBF1 (*Triticum aestivum*): AAL37944; OsDREB1C (*Oryza sativa*): BAA90812; HvCBF2 (*Hordeum vulgare*):AAM13419; OsDREB1E (*Oryza sativa*): AAX23722; CaCBF1B (*Capsicum annuum*): AAQ88400; Cb-CBF (*Capsella bursa-pastoris*): AAR26658; LeCBF1 (*Lycopersicon esculentum*):AAK57551; BnCBF (*Brassica napus*): AAL38243; PaDREB1 (*Prunus avium*):BAD27123, OsDREB1D (*Oryza sativa*): AAX23723; ZmDBF2 (*Zea mays*): AAM80485 ;OsPAP (*Oryza sativa*): NP_922723; TINY2 (*Arabidopsis thaliana*): AAX38232. Em destaque na cor vermelho está a posição da análise da seqüência proteica DREB de *Ricinus communis* correspondente ao gene *RcDREB* na árvore filogenética.

5. Conclusão

- ▶ Foi obtida uma seqüência regulatória (5') do gene DREB de *Ricinus communis*. Esta seqüência foi obtida usando a técnica de TAIL-PCR que se mostrou altamente eficiente para esse fim.
- ▶ A expressão do promotor do gene *DREB* de mamona foi observada como dependente de condições de estresse hídrico, sendo iniciada após 4 horas de estresse.
- ▶ O promotor obtido da mamona pertence à família gênica *DREB* grupo A5, caracterizado na resposta ao estresse hídrico e pertencente à rota dependente do acúmulo de ABA. Estes resultados são muito importante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que é fundamental termos seqüências regulatórias que sejam funcionais apenas sob a condição de estresse, o que permite a expressão de genes que conferem tolerância ao déficit hídrico, sem que ocorram respostas indesejáveis.

6. Perspectivas do trabalho

Novas transformações devem ser efetuadas, com a finalidade de se obter mais plantas transgênicas. Desta forma se poderá analisar a expressão do gene *gus* sob o controle do promotor clonado neste estudo em um maior número de indivíduos. Também haverá a necessidade de se estudar sua funcionabilidade em diversas partes da planta transformada, além da folha, incluindo flor, grão de pólen, caule e raiz, em diferentes condições de estresse hídrico, salino e frio. Além de estudar o efeito na presença do ABA. Não há muitos estudos sobre a expressão dos genes *DREB* em tecido-específico. Shen *et al*, (2003) analisaram a expressão do gene *AtDREB2* e *AhDREB1* em raiz, caule e folhas em plantas de *Triticum aestivum*.

Contribuindo à pesquisa, será realizada *Northern blot* e RT-PCR semi-quantitativo, além das análises histoquímicas, citoquímica e fluorimétrica da atividade da β -glucuronidase (ensaio quantitativo) sob condições de estresse abiótico em plantas de fumo transgênicas. Em nossa perspectiva de trabalho, esperamos submeter um artigo mostrando o estudo da expressão do promotor do gene tipo *DREB* de mamona em função da resposta a fatores de estresses ambientais.

7. Referências

- Abreu, E., F.; Aragão, F., J., L. Isolation and Characterization of a myo-inositol- 1-phosphate Synthase Gene from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) Expressed During Seed Development and Environmental Stress. *Annals of Botany*.99:285-292.2007.
- Agarwal, P., K.; Agarwal, P.; Reddy, M., K.; Sopry, S. K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Report*. 25:1263-1274.2006.
- Aragão, F., J., L.; Sá, F., G.; Almeida, E., R.; Gander, E., S.; Rech, E., L. Particle bombardment mediated expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Molecular Biology*. 20: 357-359. 1992.
- Aragão, F., J., L.; Sá, F., G.; Davey, M., R.; Brasileiro, A., C., M.; Faria, J., C.; Rech, E., L. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Reports*. 12: 483-490. 1993.
- Aragão, F., J., L.; Barros, L., M., G.; Brasileiro, A., C., M.; Ribeiro, S., G.; Smith, F., D.; Sandford, J., C.; Faria, J., C.; Rech, E., L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*. 93: 142-150.1996.
- Aragão, F., J., L.; Barros, L., M., G.; Sousa, M., V.; Grossi-de-Sá, M,M F.; Almeida, E., R., P.; Gander, E., S.; Rech, E., L. Expression of a methionine- rich storage albumin from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B. K., *Lecythidaceae*) in trnsgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*). *Genetic and Molecular Biology*. 22:445-449. 1999.
- Aragão, F., J., L.; Sarokin, L.; Vianna, G., R.; Rech, E., L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* L. (Merril)] plants at a high frequency. *Theoretical and Applied Genetics*.101:1-6. 2000.
- Aragão, F., J., L.; Vianna, G., R.; Albino, M., C.; Rech, E., L. Transgenic Dry Bean Tolerant to the Herbicida Glufosinate Ammonium. *Crop Science*.42:1298-1302. 2002.
- Aragão, F., J., L. *Organismos Transgênicos*. 1º edição, Manole, Barueri-SP, 2003.

- Bajaj, S.; Targolli, J.; Liu, L.; David Ho, T.; Ray Wu. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*.5: 493-503, 1999.
- Barwale, U., B.; Kerns, H., R.; Windholm, J., M. *Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis*. *Planta*. 167:473-481. 1981.
- Behnam, B.; Kikuchi, A.; Fevziye, C-T.; Kasuga, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Watanebe, K. *Arabidopsis rd29A::DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato*. *Plant Cell Rep*. 2007.
- Beltrão, N., E., M.; Souza, J., G.; Santos, J., W.; Costa, F., X.; De Lucena, A., M., A.; Queiroz, U., C. Modificações na bioquímica da planta da mamoneira. Cultivar BRS 188 Paraguaçu, submetida ao estresse hídrico (deficiência e excesso). *Rev.bra.ol.fibros.* 7:653-658,2003.
- Bevan, M.W.; Flavell, R., B.; Chilton, M., D. *A chimaeric antib iotic resistance gene as a selectable marker for a plant cell transformation*. *Nature*. 340:184-187. 1983.
- Biodiesel- Portal do Biodiesel: <http://www.biodiesel.gov.br/>, acessado em 06/07/2006.
- Bo Hung; Liu, J. *Cloning and functional analysis of the novel gene GhDBP3 encoding a DRE-binding transcription factor from Gossypium hirsutum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1759. 63-269.2006
- Brasileiro, A., C., M.; Carneiro, V., T., C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*, 1ª edição, Embrapa, Brasília, 1998.
- Brasileiro, A., C., M.; Aragão, F., J., L. Marker Genes for In Vitro Selection of Transgenic Plants. *Journal of Plant Biotechnology*. 3: 113-121.2001.
- Bray, E. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*.103: 035-1040, 1993.
- Bray, E. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*.2: 48-54. 1997.
- Cascardo, J., C., M.; Buzele, R., A., A.; Almeida, R., S.; Otoni, W., C.; Fontes, E., P., B.

Referências Bibliográficas

- Differential expression of the soybean *Bip* gene family. *Plant Science*. 160: 273-281. 2001.
- Chierice, G., O.; Claro Neto, S. Aplicação industrial do óleo. In: Azevedo, D., M., P. de ; Lima., E., F. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 89-119, 2001.
- Choi, D., W.; Rodrigues, E., M.; Close, T., J. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiol*. 129:1781-1787. 2002.
- Christou, P. Phylosophy and practice of variety independent gene trnansfer into recalcitrant crops. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 29: 119-124. 1993.
- Curtis, I., S.; Davey, M., R.; Power, J., B.; Leaf disk transformation. In: Gartland, K., M., A.; Davey, M., R.; ed. *Agrobacterium protocols*. Totowa: Humana Press. 59-70.1995.
- Dubouzet, J.,G.; Skuma, Y.; Ito Y.; Kasuga M.; Dubouzet, E., G.; Miura, S.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Os DREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold- responsive gene expression. *The Plant Journal*. 33: 751-763. 2003.
- Gilmour, S., J.; Zarka, D., G.; Stockinger, E., J.; Salazar, M., P.; Houghton, J., M.; Thomashow, M., F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J*. 16:433-442. 1998.
- Doyle, J., J.; Doyle, J., L. A rapid DNA isolation procedure for a small quantities of fresch leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.19:11-15. 1987.
- Embrapa Algodão- Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, PB, Brasil-CNPA: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>, acessado em 06/07/2006.
- Jefferson, R., A.; Burgess, S., M.; Hirsh, D. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8447-8451.1986.

- Jefferson, R., A. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6:3901-3907.1987.
- Haake, V.; Cook, D.; Riechmann, J., L.; Pineda, O.; Thomashow, M., F.; Zhang, J., Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130:639-648. 2002.
- Halling, K., C.; Halling, A., C.; Murray, E., E.; Landin, B., L.; Houston, L., L.; Weaver, R., F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis* L. *Nucleic Acids Research*, 13: 8019-8033, 1985.
- Hsieh, T-H.; Lee, J-T.; Charg, Y-Y.; Chan, M-T. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology.* 130: 618-626. 2002.
- Jaglo, K., R.; Kleff, S.; Amundsen, K., L.; Zhang, X.; Haake, V.; Zhang, J., Z.; Deits, T.; Thomashow, M., F. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-reponsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and others species. *Plant Physiol.* 127:910-917.2001.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163. (2004).
- Kouri, J.; Santos, R., F.; Santos, J., W. *Evolução da cultura da mamona no Brasil*. I congresso brasileiro de mamona-Energia e Sustentabilidade. Campina Grande, PB. 23 a 26 de novembro, 2004.
- Lacorte, C. β -glucuronidase (GUS). In: Brasileiro, A., C., M.; Carneiro, V., T., C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI-Brasília. 51-64.1998.
- Lacorte, C.; Romano, E. Transferência de Vetores para *Agrobacterium*. In: Brasileiro, A., C., M.; Carneiro, V., T., C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI-Brasília. 51-64.1998.
- Liu, X., P.; Tian, A., G.; Luo, G., Gong, Z., Z.; Zhang, J., S.; Chen, S., Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stress. *Theor Appl. Genet.* 110:1355-

1362. 2005.

- Liu, Q.; Kasuga, M.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Two transcription factors, DREB 1 and DREB 2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathway in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1391-1406.1998.
- Liu, Y-G.; Mitsukawa, N.; Oosumi, T.; Whittier, R.; F. Efficient isolation and mapping of a *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*. 8(3): 457-463. 1995.
- Liu, Y-G., Whittier, R.; F. *Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking*. *Genomics*. 25:674-681. 1995.
- Liu, N.; Zhong, N-Q.; Wang, G-L.; Li, L-J.; Liu, X-L.; He, Y-K.; Xia, G-X. Cloning and functional characterization of Ppdbf1 gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta*. 226:827-838.2007.
- Medina, J.; Bagues, M.; Terol, J.; Pérez-Alonso, M.; Salinas, J. The *Arabidopsis* CBF gene family composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol*. 119:463-469.199.
- McCabe D., E.; Swain, W., F.; Martineli, B., J.; Christou P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology*.6:923-926.1988.
- Miller, J., H. Experiments in molecular genetics. *New York: Cold Spring Harbor*, 1972.
- Moraes, C., R., A.; Severino, L., S. *Influência do encharcamento do solo sobre o crescimento e desenvolvimento da mamoneira*. I congresso brasileiro de mamona-Energia e Sustentabilidade. Campina Grande, PB. 23 a 26 de novembro, 2004.
- Morikawa, H.; Iida, A.; Yamada, Y. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by simple biolistic device (particle gun). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 320-322.1989.
- Murashige, T., ;Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue

- cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497,1967.
- Narusaka, Y.; Nakashima, K.; Shinwari, Z., K.; Sakuma, Y.; Furihata, T.; Abe, H.; Narusaka, M.; Shinokaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high salinity stresses. *The Plant Journal*. 34:137-148.2003.
- Odell, J.,T.; Ngy, F.; Chua, N-H. *Identification of DNA sequences required for the activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter*. *Nature*, 313:810-812.1985.
- Park, J., M.; Park, C., J.; Lee, S., B.; Ham, B., K.; Shin, R.; Paek, K., H. Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*. 13:1035-1046. 2001.
- Raven, P.H.; Evert,R.F.; Eichhorn, S.,E. *Biologia Vegetal*. 6º edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- Rech, E., L.; Vainstein, M., H.; Davey, M. An electrical particle acceleration a gun for gene transfer into cells. *Technique*. 3: 143-149. 1991.
- Rech, E., L.; Aragão, F., J., L. Biobalística. In: Brasileiro, A., C., M.; Carneiro, V., T., C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI-Brasília. 51-64.1998.
- Romano, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: Brasileiro, A., C., M.; Carneiro, V., T., C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI-Brasília. 51-64.1998.
- Sanford, J., C.; Klein, T., M.; Wolf, E., D.; Allen, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. *Particle Science Technology*. 5:27-37. 1987.
- Sandford, J.,C.; Vit, M., J. Russel, J., A.; Smith, F., D.; Harpending, M., K.; Roy, M., K.; Johnston, S., A. An improved helium-driven biolistic device. *Technique*. 3: 3:16. 1991.
- Sathasivan K.; Haughn G., W.; Murai, N. *Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant Arabidopsis thaliana var. Columbia*. *Nucleic Acids Res*. 18 (8):2188.1990.
- Seki, M.; Kamei, A.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Molecular responses to drought,

- salinity and frost: common and different path for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology*. 14:194-199. 2003.
- Shen, Y., G.; Zhang, W., K.; He, S., J.; Zhang, J., S.; Liu, Q.; Chen, S., Y. An EREBP/AP2-type protein in *Triticumaestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theor Appl. Genet.* 106:923-930. 2003.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*. 7:161-167.1996.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*.115: 327-334.1997.
- Slater, A.; Scott, N.W.; Fowler, M. R. *Plant Biotechnology. The genetic manipulation of plants.* Oxford University Press, 2003.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal.* 3º edição, Artmed, Porto Alegre-RS, 2004.
- van den Elzen, P., J., N.; Townsend, J.; Lee, K., Y.; Bedbroock, J., R. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable maker in plant cells. *Plant Molecular Biology*. 5: 299-302. 1985.
- Zanatta, A., C., A. Fundamentos de Transformação Genética Vegetal. Disponível em : <http://www.cnpt.embrapa.br/livros/biotecnologia>. Acesso em 07/12/2003.
- Zhu, J.; Hasegawa, P.; M.; Bressan, R., A. Molecular aspects osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Science*. 16: 253-277.1997.

Anexo 1
Soluções & Reagentes

Gel de agarose 1%

Para preparar 100mL de gel. Pesar 1g de agarose e dissolver por aquecimento em tampão TBE 0,5X.

TBE 10X

Dissolver 108g de Tris base, 55 g de ácido bórico e 40mL de EDTA 500mM, pH 8,0, em água destilada. Completar o volume até 1 litro.

EDTA 500Mm, pH 8,0

Adicionar 186,1g de Na₂EDTA.2H₂O a 800mL de água destilada e homogeneizar com agitador magnético. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH (aproximadamente 20g de NaOH em pastilhas). O EDTA não irá solubilizar completamente até que a solução atinja o pH determinado. Completar o volume até 1 litro e depois esterilizar em autoclave.

Reguladores de crescimento utilizados no trabalho

Nome	Classe	Peso molecular	Solvente/Concentração estoque	Modo de esterilização	Condições de estocagem (solução)
BAP(6-benzilaminopurina ou 6-enziladenina)	Citocinina	225,2	NaOH 1N 0,01 a 5mg/ml	Autoclave ou filtração	0 a 5°C
ANA (Ácido naftalenoacético)	Auxina	186,2	NaOH 1N 0,01 a 10mg/ml	Autoclave	0 a 5°C

Anexo 2

Resumo do trabalho apresentado no 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas

Ornamentais- 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas- 1º

Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas

Clonagem e Estudo Funcional do Promotor do Gene DREB de Mamona –*Ricinus communis* L.

Morais, Angélica Taveira¹ ; Aragão, Francisco José Lima²

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica na Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Caixa Postal 04457, CEP 70910-970, Brasília, Distrito Federal, fone (61) 3307-2828, e-mail: angelicataveira@gmail.com; ² Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-Cenargen), Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, Distrito Federal, Fone: (61) 3448-4700 ,e-mail:aragao@cenargen.embrapa.br.

Um dos principais estresses que restringem a capacidade e a eficiência da planta realizar os processos bioquímicos importantes é a falta de água. As conseqüências para o vegetal vão desde alterações no volume celular à desnaturação de importantes proteínas, e dependendo da intensidade do estresse, poderá ocasionar a morte da planta. Com isso, as plantas apresentam mecanismos bioquímicos que respondem ao estresse hídrico. Estas respostas envolvem as funções de muitos genes que podem ocorrer em segundos ou levar horas, conferindo ao vegetal a capacidade de tolerar aquela condição desfavorável. Um dos mecanismos gênicos envolvidos na geração de respostas ao estresse hídrico em plantas, é mediado pela expressão do gene *DREB-CBF* (Dehydration-responsive element binding protein/C-repeat-binding factor). Este gene codifica para uma proteína regulatória, proteína DREB, um fator de transcrição que está envolvido na ativação de outros genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico. Trabalhos indicaram que uma maior expressão do gene *DREB* de arroz em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, aumentaram a tolerância deste por períodos de falta de água. Então, temos trabalhado para a clonagem do gene *DREB* de mamona, conhecidamente uma planta com grande tolerância a seca, e superexpressá-lo em plantas de tabaco e assim estudar as respostas de tolerância à seca nesta planta modelo. Para isso, clonamos a região completa do promotor, e estamos concluindo o seqüenciamento da região codante. Esperamos no futuro extrapolar os melhores resultados, em caso positivo, para culturas de maior importância.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse hídrico; *DREB*; *Ricinus communis* L.

