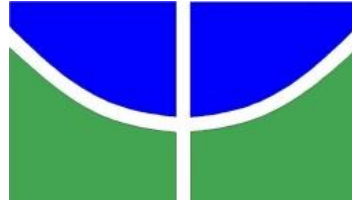


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

EXPRESSÃO DO GENE *RcDREB1* DE FORMA CONSTITUTIVA EM
PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)

TOMAS FELIPE COSTA DO REGO

Fevereiro de 2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

EXPRESSÃO DO GENE *RcDREB1* DE FORMA CONSTITUTIVA EM
PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)

TOMAS FELIPE COSTA DO REGO

ORIENTADOR: DR. FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Botânica do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Botânica.**

Fevereiro de 2015

TOMAS FELIPE COSTA DO REGO

EXPRESSÃO DO GENE *RcDREB1* DE FORMA CONSTITUTIVA EM
PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum L.*)

Dissertação aprovada junto ao programa de pós-graduação em botânica da
Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre
em Botânica.

Banca examinadora

Dr. Francisco José Lima Aragão

Dr. Thomas Christopher Rhys Williams.

Dra. Mirella Pupo Santos.

Dra. Thaís de Moura Cipriano

Fevereiro - 2015

Dedico esse trabalho a Dara quem
sempre me apoiou e amo incondicionalmente

Agradecimentos

Ao meu pai José por todos os ensinamento e apoio e discussões sobre historia, biologia e o cotidiano, a minha mãe Ioleth por me apoiar incentivar e comemorar com cada um dos meus resultados parciais, a Natália por esta sempre ao meu lado apoiando incentivando mesmo nas escolhas mais difíceis, e aos meus irmãos Tiago, Mateus e Pedro pelos momentos de descontrações.

Ao meu orientador Francisco Aragão por ter concedido a oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e incentivo em cada resultado obtido. A Glaucia e Elsa pela ajuda das atividades do laboratório.

Companheiros de bancada: Abdul, Pedro, Tatiane, e a todos os membros do LEG: Cristiana, Felipe, Nayhanne, Otacílio, Lídia, Maria Laine, Cristina, Pabline, Angélica, Thainá, Renato, Cristiane, Franciele e Heitor por todos os cafés e momentos de alegria que jamais serão esquecidos.

Em especial a Aninha quem sempre me aconselhou, apoiou e ensinou desde o inicio da minha vida acadêmica.

A CAPES, pela bolsa e financiamento e a Embrapa pelo espaço físico e equipamentos.

E todos os outros que de alguma forma contribuíram para a finalização desse trabalho.

RESUMO

A água é de importância fundamental para a vida, pois constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos que são essenciais. As estruturas e funções das proteínas dependem da presença de água. As plantas naturalmente têm a capacidade de suportar ambientes desfavoráveis e essa capacidade de resistir ao ambiente é determinada geneticamente. Atualmente, mecanismos de proteção em nível molecular têm sido estudados, como os fatores de transcrição DREB (Dehydration-Responsive Element-Binding) que foram identificados e caracterizados inicialmente em *Arabidopsis thaliana*. Fatores de transcrição (FT) iniciam uma cascata gênica conferindo tolerância à desidratação, salinidade ou altas e baixas temperaturas, ou seja, estresses abióticos. Em trabalho anterior o promotor do gene *RcDREB1* dirigiu a expressão do gene *gus* que foi detectada apenas em grãos de pólen de plantas transgênicas de tabaco no momento da antese. Este trabalho visa obter plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *RcDREB1* constitutivamente para testar a hipótese de que essas plantas poderão ser tolerantes ao estresse hídrico. Para alcançar este objetivo, foi inserido o gene *RcDREB1* no vetor pCAMBIA3300 onde o promotor constitutivo 35SCaMV dirigirá sua expressão. As plantas resistentes ao agente seletivo glufosinato de amônio foram analisadas para a presença do transgene por PCR e para a detecção da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT). Essas análises confirmaram que 11 plantas eram transgênicas. Cinco linhagens de plantas transformadas foram testadas para tolerância a estresse hídrico onde a rega das plantas foi removida por nove dias. Quatro das linhagens utilizadas no teste anterior tiveram a viabilidade dos pólenes avaliada por exposição a alta temperatura (37°C). Os resultados mostraram que a linhagem T6 apresentou maior tolerância ao estresse hídrico assim como um ganho de biomassa durante o período do estresse. E o pólen da linhagem T11 apresentou viabilidade estatisticamente maior que a linhagem WT. O com os resultados obtidos gene *RcDREB1* se mostrou um gene candidato a programas de melhoramento de cultivares comerciais.

Palavras-chave: DREB; Estresse hídrico; Tolerância à seca; Viabilidade de pólen;

ABSTRACT

Water is fundamental for life, as it is the matrix, in which occurs most essential biochemical processes. The structures and functions of proteins depend on the presence of water. Plants have a natural ability to withstand harsh environments and ability to withstand this environment is genetically determined. Currently, protection mechanisms at the molecular level have been studied, such as DREB transcription factors (Dehydration-Responsive Element-Binding) that were identified and initially characterized in *Arabidopsis thaliana*. Transcription factors (TF) initiate a gene cascade conferring tolerance to dehydration, salinity or high and low temperatures, i.e. abiotic stresses. In our previous work, the promoter of the *RcDREB1* gene, controlling the expression of the *gus* gene, have shown expression only in pollen grains of transgenic tobacco plants at the time of anthesis. This work aims to obtain transgenic tobacco plants constitutively expressing the *RcDREB1* gene to test the hypothesis that these plants may be tolerant to water stress. To accomplish this, the *RcDREB1* gene was inserted into the pCAMBIA3300 vector under control of the constitutive promoter 35SCaMV. Plants resistant to the selective agent glufosinate ammonium were analyzed for the presence of the transgene by PCR and for the detection of protein phosphinothricin acetyltransferase (PAT). These analyzes confirmed that 11 plants were transgenic. Five transformed plants lines were tested for tolerance to drought stress by removing watering for nine days. Four of the lines were evaluated for the viability of pollen, exposed to high temperature (37 ° C). Results showed that the line T6 was more tolerant to water stress as well as a gain of biomass during the stress period. In addition, the pollen viability showed to be statistically higher in the line T11 when compared to the WT plants. These results demonstrated that *RcDREB1* gene is a candidate for the improvement of commercial crops.

Key word: DREB; Water stress; Drought tolerance; Pollen viability

Lista de figuras

Figura 1: Árvore filogenética da proteína RcDREB1 e outras proteínas DREB (Cipriano et al., 2013).--
----- 19

Figura 2: Vetor pC-RcDREB1 utilizado para transformação de tabaco via *Agrobacterium* contendo o gene de interesse *RcDREB1* dirigido pelo promotor CaMV35s e com o terminador nos3', o gene *bar* que confere resistência ao glufosinato de amônio dirigido pelo promotor CaMV35S e com terminador CaMV35S poly A-----31

Figura 3: Gel de agarose 0,7% apresentando a amplificação de bandas de aproximadamente 586 pb correspondentes ao gene *RcDREB1* em três colônias de *A. tumefaciens* transformadas com o plasmídeo; 1, 2, 3: colônias diferentes de *A. tumefaciens* e M: marcador DNA Ladder 1kb.-----32

Figura 4: Teste comercial para detecção de fosfinotricina acetiltransferase (PAT), 1: planta transformada apresentando duas bandas indica a presença da proteína PAT, 2: planta não transformada apresentando somente uma banda indica ausência da proteína PAT.-----33

Figura 5: Gel de agarose 0,7% apresentando a amplificação de bandas de aproximadamente 586 pb correspondentes ao gene *RcDREB1* de plantas aclimatadas em casa de vegetação; 1 à 16: diferentes plantas aclimatadas; C-: planta controle negativo; C+ controle positivo da reação; Br: reação sem DNA; M: marcador DNA Ladder 1kb.-----33

Figura 6: Gel de agarose 0,7% apresentando a amplificação de bandas de aproximadamente 586 pb correspondentes ao gene *RcDREB1* de plantas aclimatadas em casa de vegetação; 14 à 20: diferentes plantas aclimatadas; C-: planta controle negativo; C+ controle positivo da reação; Br: reação sem DNA; M: marcador DNA Ladder 1kb.-----34

Figura 7: A) Altura das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; B) comprimento radicular das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; C) Massa fresca da parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; D) Massa seca parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; E) Massa fresca da raiz das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; F) Massa seca das raízes das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; G) Relação entre a massa fresca da raiz e a parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; H) Relação da massa seca entre a raiz e a parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca. Não foram observadas variações significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----36

Figura 8: Teor relativo de água no solo durante o período do estresse hídrico. Não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----37

Figura 9: Taxa Fotossintética das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----38

Figura 10: Taxa de transpiração das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----39

Figura 11: condutância estomática das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----40

Figura 12: Teor relativo de água das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----41

Figura 13: Eficiência do uso da água instantânea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----41

Figura 14: Potencial hídrico das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	42
Figura 15: Crescimento de parte aérea médio das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	43
Figura 16: Comprimento radicular das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	44
Figura 17: massa fresca da parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	45
Figura 18: massa seca da parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	43
Figura 19: massa fresca da raiz das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	46
Figura 20: massa seca das raízes das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	46
Figura 21: Relação de massa fresca entre raiz e parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	47
Figura 22: Relação de massa seca entre a raiz e a parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	47
Figura 23: Viabilidade dos grãos de pólen das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após estresse por calor e viabilidade sem estresse por calor. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).-----	48
Figura 24: Comparação entre plantas WT e plantas das linhagens T6, T16 e T17 submetidas ou não ao estresse hídrico. A) Comparação de três plantas da linhagem WT, à esquerda e três plantas da linhagem T6 a direita que foram submetidos ao estresse hídrico; B) plantas da linhagem WT que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a esquerda e plantas da linhagem T6 que foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi não submetida ao estresse hídrico, a direita; C) Comparação de três plantas da linhagem WT a esquerda e três plantas da linhagem T16 a direita que foram submetidos ao estresse hídrico; D) plantas da linhagem WT que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a esquerda, plantas da linhagem T16 que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a direita; E) Comparação de três plantas da linhagem WT a esquerda e três plantas da linhagem T17 a direita que foram submetidos ao estresse hídrico; F) plantas da linhagem WT que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a esquerda, plantas da linhagem T17 que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a direita; barra de escala 10 cm.-----	49
Figura 25: Recuperação das plantas submetidas ao teste de estresse hídrico com intervalos de uma hora; plantas posicionadas da seguinte forma da esquerda para a direita: WT, T6, T11, T16, T17, T20, plantas das linhagens transformadas com recuperação ligeiramente mais rápida.-----	50

Sumário

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
Lista de figuras	viii
Introdução	12
Revisão bibliográfica	14
Estresse hídrico.....	14
Genes DREB.....	16
Gene <i>RcDREB1</i>	18
Justificativa.....	20
Hipóteses	21
Objetivo geral	22
Objetivos específicos.....	22
Material e Métodos.....	23
Construção do vetor	23
Preparo da cultura de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
Cultura in vitro das plântulas de tabaco e cocultura	24
Regeneração de plantas transformadas.....	24
Extração de DNA e PCR	25
Teste de tolerância ao estresse hídrico.....	26
Análise da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração, eficiência instantânea do uso da água e do potencial hídrico foliar e potencial hídrico do solo	27
Teor relativo de água.....	28
Análises Biométricas e recuperação	28

Delineamento experimental e análises estatísticas	29
Teste de tolerância à dessecação em grãos de pólen	29
Teste de viabilidade do pólen	30
Resultados	31
Construção do vetor pC-RcDREB1 e transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
Transformação de plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	32
Análise de progênie com glufosinato de amônio	34
Avaliações do efeito da transformação sobre parâmetros biométricos	35
Testes de tolerância ao estresse hídrico	37
Análise de taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração	37
Teor relativo de água, eficiência do uso da água instantâneo e potencial hídrico	40
Testes biométricos	43
Teste de viabilidade do grão de pólen.....	48
Fotos comparativas após o estresse hídrico e plantas não estressadas ..	48
Discussão.....	51
Conclusão	56
Perspectivas.....	57
Referências bibliográficas	58

Introdução

As plantas estão naturalmente expostas às adversidades ambientais, entre os estresses bióticos estão as doenças e pragas (Lata *et al.*, 2011), enquanto que os estresses abióticos são causados por fatores climáticos e ambientais, tais como frio, calor, seca, alta luminosidade, alta salinidade ou ainda variação na concentração de micro e macro elementos (Agarwal *et al.*, 2006; Lata *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014).

Os estresses abióticos estão entre as maiores limitações para o cultivo de várias espécies como milho, soja, arroz, cana-de-açúcar e trigo (Chen *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2014). As plantas naturalmente respondem aos estresses em vários níveis molecular, fisiológico, anatômico e morfológico; essas respostas variam de acordo com a espécie, o período do desenvolvimento ou crescimento da planta, e à intensidade do estresse (Mittler, 2006; Peleg *et al.*, 2011).

O estresse hídrico causado pela seca, que é um tipo de estresse abiótico, pode ser devastador para a agricultura, e atualmente grande parte das áreas cultivadas do mundo sofre com a baixa disponibilidade de água (Peleg *et al.*, 2011). Com o intuito de obter plantas com maior tolerância à seca, vários estudos moleculares vêm sendo realizados. Muitos trabalhos utilizando genes *DREB* de diversas plantas têm sido publicados anualmente (Chen *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2014; Peleg *et al.*, 2011). Como exemplo, em plantas de arroz (*Oryza sativa*) foi identificado o gene *OsDREB1B* e a caracterização funcional desse gene foi realizada em plantas transgênicas de tabaco. Observou-se que durante períodos de estresse por seca as plantas de tabaco apresentaram um maior acúmulo massa

fresca; e que sob estresse osmótico apresentaram maior peso fresco quando comparadas às plantas não transformadas (Gutha & Reddy 2008). Em soja (*Glycine max*) foi encontrado o gene *GmDREB2* que foi inserido em tabaco e foi analisada a tolerância ao estresse e observaram que a quantidade de prolina livre se mostrou superior quando comparada com plantas não transformadas (Chen *et al.*, 2007). Outro exemplo é o gene *DREB2A* de *Arabidopsis thaliana* L. que foi introduzido em cana-de-açúcar (variedade RB855156) e a transformação resultou em tolerância à seca. Além disso, as plantas transformadas possuíam um aumento no nível de sacarose e de brotação de gemas laterais (Reis *et al.*, 2014).

Cipriano *et al.*, (2013) caracterizaram a expressão de um promotor pólen específico de mamona (*Ricinus communis* L.). O promotor do gene *RcDREB1* foi inserido em um cassete controlando a expressão do gene *gus*. Sua expressão foi analisada nas plantas de tabaco submetidas a diversos estresses abióticos. Detectou-se a expressão de *gus* apenas em grãos de pólen após a antese. Além disso, em plantas de mamona, a expressão de *RcDREB1* foi observada apenas em pólenes no momento da antese (Cipriano *et al.*, 2013). A função biológica inferida da expressão específica do gene *RcDREB1* pode estar relacionada tanto ao desenvolvimento dos pólenes quanto a mecanismos de proteção dos mesmos a fatores ambientais. A mamona é uma planta adaptada a regiões semiáridas e com altas temperaturas. Embora a mamoneira seja monóica, as flores masculinas são separadas das flores femininas (diclino-monóicas) e isso obriga que o pólen fique exposto ao ambiente externo para que ocorra a fecundação. Dessa forma, pode-se esperar que nessa espécie existam mecanismos de proteção a estresses ambientais que evitem a redução da viabilidade do pólen (Severino *et al.*, 2012; Cipriano *et al.*, 2013).

Este trabalho visa a continuação do estudo do gene *RcDREB1* de Cipriano *et al.*, (2013) expressando constitutivamente o gene *RcDREB1* em tabaco e avaliando a tolerância das plantas transformadas ao estresse hídrico.

Revisão bibliográfica

Estresse hídrico

A água é de importância fundamental para a vida, pois constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos que são essenciais. As estruturas e funções das proteínas dependem da presença de água. Em plantas terrestres existe um contínuo fluxo de absorção de água do solo e perda para a atmosfera, esse movimento ocorre por difusão assim como por transporte em massa, esse deslocamento de água ocorre naturalmente, quando há baixa disponibilidade de água a transpiração é reduzida para evitar a desidratação (Taiz & Zeiger, 2004a; Jaleel *et al.*, 2009).

O déficit hídrico ocorre quando há baixa disponibilidade de água para a planta, ou seja, o conteúdo de água de um tecido fica abaixo do mais alto possível exibido durante o estado de maior hidratação. Um dos primeiros sintomas do déficit hídrico ocorre nas folhas, onde suas células perdem o turgor. Em sequência a expansão foliar fica comprometida por depender do turgor celular e a concentração dos solutos é elevada. Em resposta à desidratação as plantas fecham os estômatos, reduzindo a evaporação em suas folhas. O fechamento dos estômatos é uma resposta inicial a queda de turgor nas células guardas das folhas. Ao fechar completamente os estômatos ocorre a paralização da fotossíntese que depende da

troca gasosa que ocorre nos estômatos. Ao fechar os estômatos a planta interrompe a dissipação de calor que é feita através da transpiração assim elevando a temperatura das folhas de 2 a 5 C° (Suzuki *et al.*, 2014). Com o aumento da temperatura a fotossíntese é comprometida devido as alterações no transporte de elétrons e as atividades da Rubisco são reduzidas (Suzuki *et al.*, 2014). O estresse osmótico pode ser uma consequência do estresse hídrico. As alterações ambientais que ocorrem fora das células desencadeiam sinais que são enviados as organelas no interior celular através da fosforilação de proteínas que é realizada por quinases, ao estudar os mRNAs produzidos durante os estresse osmótico tem-se observado a alta concentração de quinases como a SnRK2s. A fosforilação é a forma mais rápida e direta de resposta antes da transcrição de genes protetores (Fujii *et al.*, 2012).

O fechamento estomático também pode estar relacionado à resposta química através do ácido abscísico (ABA) produzido nas raízes em condição de desidratação e acumulado nas folhas (Chaves *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2004b).

Outra forma de proteção à desidratação utilizada pelas plantas é o ajuste osmótico. O ajuste osmótico é o acúmulo de determinados solutos como a prolina durante o período de estresse hídrico. Com o ajuste osmótico o turgor é mantido, pois as raízes retiram melhor a água do solo e podem ser estimuladas a crescer (Babita *et al.*, 2010).

Durante estresse hídrico o crescimento das raízes não é inicialmente afetado por depender dos produtos fotossintéticos que ficam em baixa disponibilidade pela redução da fotossíntese. Em decorrência da continuidade do crescimento radicular e da interrupção do crescimento da parte aérea ocorre um desequilíbrio da proporção entre o crescimento da parte aérea e o crescimento radicular, logo, em condições de

déficit hídrico moderado há maior crescimento de raiz visando à busca por solos mais úmidos (Taiz & Zeiger, 2004b; Jaleel *et al.*, 2009; Babita *et al.*, 2010).

Com a continuidade do período de estresse hídrico ocorre à interrupção da fotossíntese e a planta para de acumular biomassa estagnando o crescimento, desregulação metabólica, danos nas estruturas celulares, redução da fertilidade, senescência prematura e ao final morte da planta (Jaleel *et al.*, 2009; Krasensky & Jonak, 2012).

Em conjunto com o estresse hídrico pode ocorrer o estresse por altas temperaturas. Plantas terrestres normalmente são incapazes de sobreviver a temperaturas acima de 45°C. (Taiz & Zeiger, 2004b; Jaleel *et al.*, 2009). As plantas têm a capacidade de suportar ambientes desfavoráveis e essa capacidade de resistir ao ambiente é determinada geneticamente (Taiz & Zeiger, 2004b).

Genes DREB

APETALA 2/ethylene-responsive (AP2/ERF) é uma superfamília gênica de fatores de transcrição ligados ao estresse abiótico. AP2/ERF é uma família gênica específica de plantas. A superfamília AP2/ERF é dividida em quatro subfamílias AP2, RAV, ERF e DREB.

Os genes *DREB* (sigla em inglês para: Dehydration Responsive Element Binding) são fatores de transcrição pertencentes à superfamília *APETALA 2/ethylene-responsive*. Os genes *DREB* são divididos em seis subgrupos (A-1 ao A-6) e essa divisão está relacionada à estrutura e características de cada um dos

genes. A via de ativação dos genes *DREB* pode ser ou não dependente de ácido abscísico (Agarwal *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2010).

Muitos genes da subfamília DREB foram estudados através da expressão da sequência gênica do cis-acting dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT), com isso, autores consideram esses genes como os principais fatores de transcrição envolvidos na resposta aos estresses abióticos (Zhang *et al.*, 2009; Mizoi *et al.*, 2012).

Em plantas em que se superexpressou o gene *DREB1* de *A. thaliana* foi observada maior tolerância a baixas temperaturas, seca e alta salinidade. Já os genes *DREB2A* também de *A.thaliana* não são ativados pelo frio e quando superexpressos elevam a tolerância a altas temperaturas, seca e alta salinidade indicando que os genes DREB tem função na aclimação das plantas de *Arabidopsis* (Knight & Knight. 2001; Zhang *et al.*, 2009; Mizoi *et al.*, 2012). Os genes *DREB1A* e *DREB2A* possuem uma forte atração pelas regiões DRE que são regiões conservadas nos promotores de resposta ao estresse abiótico como o *RD29A*, entretanto cada um dos genes possui uma região específica de maior afinidade (Sakuma.*et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2006; Mizoi *et al.*, 2012).

O subgrupo de fatores de transcrição DREB1/CBF de *A. thaliana* atua sobre a desidratação e tolerância ao frio, plantas de *A. thaliana* e tabaco que superexpressam constitutivamente este gene apresentaram maior tolerância ao estresse salino. Entretanto tiveram um fenótipo anão causado pelo gene *Salt Tolerance Zinc Finger (STZ)* que é superinduzido ao expressar constitutivamente os genes do grupo DREB1/CBF, o que causa uma inibição da via responsável pela síntese de giberelina (fitormônio importante para o crescimento vegetal) (Knight & Knight. 2001; Cong *et al.*, 2008; Mizoi *et al.*, 2012).

Genes com alta similaridade aos genes *DREB* de *A. thaliana* foram observados em plantas de valor comercial como arroz (*Oryza sativa*) e soja (*Glycine max*) assim como em plantas de menor interesse econômico como *Populus euphratica*, *Brassica juncea*. Vários trabalhos mostram que os fatores de transcrição DREB, assim como as sequências DRE/CRT, possuem alta importância para as respostas ao estresse abiótico em plantas (Chen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2009; Mizoi *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2014).

Decifrar os mecanismos envolvidos na resposta adaptativa desses genes é de grande importância para os projetos de melhoramento genético de culturas comerciais (Agarwal *et al.*, 2006) sendo os genes *DREB* alvos potenciais para uso na agricultura, pois concedem uma maior tolerância às plantas a estresses abióticos como salinidade, frio e a seca (Ban *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014).

Gene RcDREB1

RcDREB1 é um Fator de Transcrição (FT) que codifica para uma proteína pertencente a família AP2/ERF subfamília CBF/DREB. As proteínas pertencentes à família AP2/ERF possuem um domínio de 60 a 70 aminoácidos altamente conservados. Em seu trabalho, Cipriano *et al.*, (2013) classificaram filogeneticamente a proteína RcDREB1 como membro da sub família A-5 (Figura 1). O gene *RcDREB1* de Mamona (*Ricinus communis* L) foi caracterizado por Cipriano *et al.*, (2013) através da análise da expressão do gene *gus* sob a direção do promotor do gene *RcDREB1* em plantas transformadas de tabaco. A expressão da proteína GUS foi observada somente em grãos de pólen durante a antese e durou até a senescência, quando os grãos de pólen são liberados no ambiente. Por análise *in*

silico da sequência nucleotídica do promotor, foi verificada a presença de um motivo pólen específico, indicando que o promotor *RcDREB1* tem alguma função no desenvolvimento floral. *RcDREB1* foi o primeiro gene *DREB* pólen específico caracterizado de mamona (Cipriano *et al.*, 2013).

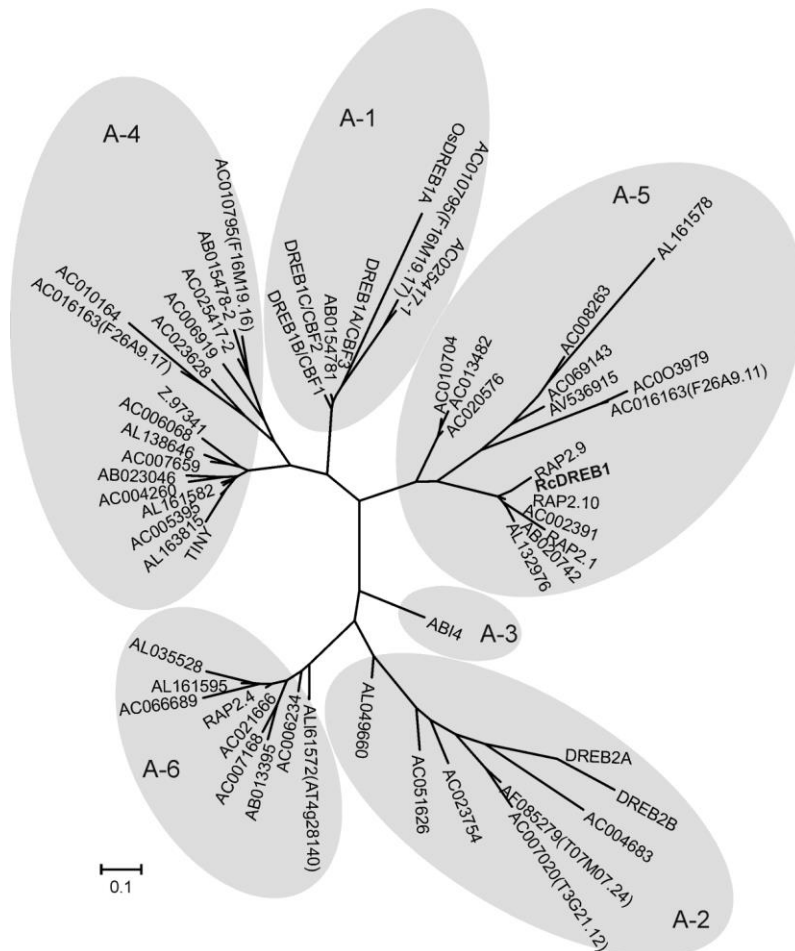


Figura 1: Arvore filogenética da proteína *RcDREB1* e outras proteínas *DREB* (Cipriano *et al.*, 2013).

Justificativa

Visando uma melhor compreensão da expressão do fator de transcrição *RcDREB1*, novos estudos devem ser realizados com a finalidade de observar o seu efeito durante um período de estresse abiótico e avaliar a tolerância que o gene *RcDREB1* pode proporcionar quando dirigido por um promotor constitutivo. Uma vez que a expressão de *RcDREB1* foi observada em grãos de pólen maduros durante a antese, há a necessidade de se avaliar a expressão constitutiva deste fator de transcrição, objetivando o ganho de tolerância ao estresse hídrico, bem como compreender sua função quando expresso de forma constitutiva.

Hipóteses

- O fator de transcrição *RcDREB1* pode conferir maior tolerância à desidratação à planta transgênica como um todo quando sua expressão for dirigida por um promotor constitutivo assim como maior viabilidade ao pólen quando submetido ao estresse por calor.

Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo a avaliação do efeito do gene *RcDREB1* de mamona (*Ricinus communis* L.) ao ser expresso de forma constitutiva em plantas de tabaco.

Objetivos específicos

- Construção de um vetor com o gene *RcDREB1* dirigido pelo promotor constitutivo CaMV35S do *Cauliflower mosaic virus*;
- Obter plantas de *tabaco* geneticamente modificadas via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o cassete de expressão *CaMV35S-RcDREB1-nos3*;
- Realizar ensaios biológicos para avaliar a tolerância das linhagens transgênicas de tabaco em condições de estresse hídrico.
- Realizar ensaios biológicos para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen das linhagens transgênicas de tabaco em condições de estresse.

Material e Métodos

Construção do vetor

Para construção do vetor o cassete com o gene *RcDREB1* foi sintetizado pela empresa Epoch Life Science, Inc (EUA). O gene *RcDREB1* foi inserido no plasmídeo PBI 426 nos sítios *Nco* I e *Sac* I (substituindo o *gus*: no sitio npt II) para ser dirigido pelo promotor 35SCaMV do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Em seguida, o cassete de transformação CaMV35S-RcDREB1-tNOS foi removido e inserido no plasmídeo pCAMBIA 3300, nos sítios *Eco* RI e *Hind* III, que possui o gene *bar* que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, gerando o vetor pC-RcDREB1. O vetor foi inserido na linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* por eletroporação (Lacorte & Romano 1998), que posteriormente foi usada para a transformação genética de plantas de tabaco (Aragão & Rech 1998).

Preparo da cultura de Agrobacterium tumefaciens

O protocolo de transformação utilizado foi de acordo com Aragão *et al.* (2002).

Foi realizada uma cultura de *A. tumefaciens* da linhagem EHA105 contendo o vetor pC-RcDREB1, preparada a partir de 100 µL de solução bacteriana que foram inoculados em 10 mL de meio LB contendo os antibióticos canamicina (100 mg/L) e rifampicina (50 mg/L). A cultura foi crescida por 16 h a 28°C sob agitação a 100 rpm até a fase exponencial de crescimento ($A_{600nm} = 1,5$). A cultura foi então diluída para $A_{600nm} = 0,1$ (Aragão *et al.*, 2002) e posteriormente foram utilizadas na cocultura.

Cultura in vitro das plântulas de tabaco e cocultura

Sementes de plantas de tabaco foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e enxaguadas seis vezes em água autoclavada. Foram germinadas em meio sólido de Murashige & Skoog (Sigma-Aldrich) com 7% de ágar e 3% de sacarose (Murashige & Skoog, 1962) e cresceram em condições controladas em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h.

Para a cocultura foram cortados explantes a partir das folhas jovens. Cada explante possuía aproximadamente 1 cm^2 , o corte e a preparação dos explantes foi feita com o auxílio de um bisturi e uma tesoura estéril sobre um papel filtro em uma placa de Petri previamente autoclavados. A nervura central e as bordas das folhas foram removidas, em seguida o mesófilo foi cortado em quadrados de aproximadamente 1 cm^2 e foram adicionados imediatamente à cultura de *A. tumefaciens* que foi preparada da seguinte forma: 1 mL da cultura de *Agrobacterium* diluída (preparada anteriormente) em 9 mL de LB líquido. A cocultura líquida foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos sob leve agitação.

Após este período os secou-se os explantes em filtro de papel estéril e transferidos para placas contendo meio Murashige & Skoog (MS) sólido suplementado com 10 mg/L de benzilaminopurina (BAP) posicionados com a face adaxial dos explantes em contato com o meio. Os explantes foram mantidos neste meio por 48 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro.

Regeneração de plantas transformadas

Após a cocultura sólida, os explantes foram transferidos para placas contendo meio de regeneração MS suplementado com 2 mg/L de BAP, 100 mg/L de

timetin, 200mg/L de cefotaxima e 5 mg/L do glufosinato de amônio (GA) como agente seletivo e mantidos em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os explantes foram cultivados por duas semanas e a gemas formadas nas folhas foram transferidas para novo meio de regeneração contendo agente seletivo. Os brotos regenerados com aproximadamente dois centímetros foram transferidos para frascos contendo meio de enraizamento (meio MS suplementado com 0,1 mg/L de Ácido Naftaleno Acético ,ANA, e 5 mg/L de glufosinato de amônio).

Após três semanas as plântulas enraizadas (com 8-10 cm de comprimento) foram transferidas para copos com terra adubada e estéril e cobertas com sacos plásticos transparentes para permitir a aclimatização em casa de vegetação com temperatura de $27-30^\circ\text{C}$ e umidade controlada (70-80%). Após quatro dias foram removidos os sacos plásticos.

As plantas aclimatizadas foram testadas para detecção da presença de fosfinotricina acetiltransferase com o Teste Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.).

Extração de DNA e PCR

Foram feitas extrações de DNA através do método de CTAB (Romano, 1998), um disco foliar foi retirado e macerado em nitrogênio líquido, ao qual foi adicionado CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM) com 1% de PVP e incubado por 30min a 65°C , em seguida foi adicionado 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 5min. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 2/3 de álcool isopropílico e centrifugado novamente por 5 min; o sobrenadante foi descartado e os

pellets foram lavados com etanol 70%. Os pellets foram secos e ressuspensos em 20 μ L de H₂O.

Para as reações de PCR foi utilizado o kit Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Califórnia - USA), o protocolo ocorreu de acordo com o indicado pelo fabricante. Os *primers*: Nco-RcDREB1 (5'-TCCATGGAAGGCGAAACG-3') e Sac-RcDREB1 (5'-CGAGCTCTAATTCCTTTCCCATTC-3') foram usados para amplificar uma banda de 586 pb. Para a amplificação foi realizado um passo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos com de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e alongamento a 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 5 min.

Teste de tolerância ao estresse hídrico

Para os testes de tolerância à seca foram selecionadas cinco linhagens de plantas transgênicas R₁ escolhidas aleatoriamente e plantas de tabaco não transgênicas (WT). O teste de tolerância a seca foi realizado de acordo com Gutha & Reddy (2008) e Cipriano *et al.*, (2013) com alterações. Para os experimentos foram utilizadas plantas com 70 dias por apresentar quantidades de folhas necessárias para as avaliações. Os testes foram realizados em casa de vegetação localizada na Embrapa Cenargen, as plantas foram plantadas em vasos plásticos de 2L com latossolo vermelho.

Previamente plantas R₁ das cinco linhagens escolhidas T6, T11, T16, T17 e T20 foram selecionadas por meio do teste de tolerância ao glufosinato de amônia preparado a partir da diluição em água (1:100) do produto comercial Finale (Glifosinato de amônio 200g/L; Bayer Crop Sciences). As plantas que sobreviveram ao teste foram contadas como positivas e as plantas que morreram foram contadas

como negativas. O qui-quadrado foi utilizado como teste estatístico para validar a segregação Mendeliana da progênie.

Para o teste de tolerância a seca foram utilizadas 16 plantas de cada linhagem de tabaco transformada e 16 plantas não transformadas. As plantas foram separadas em dois grupos, tendo o cuidado de selecionar plantas similares em tamanho antes de iniciar o estresse. O primeiro grupo foi submetido ao estresse por seca durante nove dias e o outro grupo serviu de controle sendo mantida a irrigação.

Análise da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração, eficiência instantânea do uso da água e do potencial hídrico foliar e potencial hídrico do solo

A taxa fotossintética líquida (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E_a , $\text{mmol}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram determinadas usando o analisador de gases no infravermelho (IRGA) acoplado a um sistema portátil de medição das trocas gasosas, modelo LC-Pro SD. As folhas utilizadas foram a 5^o e 6^o de cada planta contadas a partir da folha primeira folha após os cotilédones. Todas as medições foram feitas pela manhã entre 8 horas e 11 horas com as seguintes configurações do equipamento: $\text{CO}_2 = 380 \mu\text{mol mol}^{-1}$; luz $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$;

Também foram coletadas folhas de algumas plantas com a periodicidade de três dias para avaliar o potencial hídrico das plantas. Para essa medição foi utilizada a bomba de pressão tipo Scholander, SAPSII modelo 3115. As análises foram realizadas de três em três dias com a 5^o e 6^o folha com exceção das análises biométricas que foram realizadas no último dia de análise.

Para medir o potencial hídrico do solo foi utilizado um tensiômetro analógico de solo, a medição foi realizada a cada três dias junto com as medições do IRGA.

Teor relativo de água

Durante o período do teste de seca foram coletadas amostras de discos foliares da 7^o e 8^o folha a cada três dias para análise do teor relativo de água, para esta avaliação quatro discos com raio de 1 cm foram retirados por folha e foram utilizadas duas folhas por planta. Esses discos foram pesados frescos (PF) e em seguida hidratados em uma placa de Petri por dois dias (PH), pesados novamente e secos em estufa a 60°C até o peso estabilizar (PS), o que ocorreu em três dias. Ao final para calcular o teor relativo foi utilizada a fórmula: $TRA = (PF-PS)/(PH-PS)$

Análises Biométricas e recuperação

As análises biométricas foram realizadas em duas etapas, a primeira foi medir a altura das plantas a cada três dias, essa medida foi realizada a partir do solo até o meristema apical, a segunda etapa foi realizada ao final do período de doze dias quando as plantas foram retiradas cuidadosamente do solo e realizadas medidas de massa seca e fresca de raiz e parte aérea. As raízes e parte aérea de plantas controle e sob estresse foram pesadas em balança de precisão para quantificar o peso fresco e depois foram secas em estufa a 60°C por 72 horas para análise do peso seco.

Posteriormente ao estresse um grupo de plantas foi separado para análises de recuperação após restabelecer a irrigação. A recuperação foi observada com registros fotográficos com intervalos de 1h.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Para as análises estatísticas o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições de cada linhagem por dia de análise nos tratamentos realizados, condições de estresse e sem estresse. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características. A diferença entre os tratamentos foi determinada pelo teste de média Tukey ($P < 0,05$). As análises foram realizadas no programa Prisma 5.0d para Mac OS X.

Teste de tolerância à dessecação em grãos de pólen

Foi testada a tolerância dos grãos de pólen utilizando o protocolo adaptado de Shivanna *et al.* (1989). As anteras de flores em antese de plantas transformadas e não transformadas foram coletadas em microtubos de 200 μ L de microcentrífuga entre 8h e 9h da manhã e imediatamente colocadas em placas de Petri grandes umedecidas com papel toalha. As placas foram incubadas numa estufa a 37°C por uma hora, e após esse período as placas foram retiradas da estufa, e foram removidos os papeis toalha. As placas foram secas e os tubos retornaram para a estufa a 37°C por mais uma hora.

Foi realizado um controle com anteras da mesma flor das plantas transformada e não transformada, onde as anteras não foram incubadas em estufa a 37°C, entretanto ocorreu a mesma variação de umidade. Em seguida a viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada.

Teste de viabilidade do pólen

Para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen, utilizou-se o corante diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma-Aldrich) por medir viabilidade celular ao ser hidrolisado por enzimas no interior das células vivas. Cinco miligramas de diacetato de fluoresceína foram diluídas em 1 mL acetona, e novamente diluídos 1:100 em solução de sacarose 100 mg/L.

Os grãos de pólen foram corados 5 minutos antes de serem observados em microscópio de fluorescência com os Filtros de 330 a 385nm. Para a contagem dos grãos de pólen foi utilizada uma câmara de Neubauer.

Resultados

Construção do vetor pC-RcDREB1 e transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Para a construção do vetor pC-RcDREB1 a região codificante do gene *RcDREB1* foi sintetizada pela empresa Epoch Inc (EUA) e clonada no vetor pBI426, substituindo *gus: npt II* nos sítios de *Nco I* e *Sac I*. Dessa forma foi criado o cassete de expressão CaMV35S-RcDREB1-Tnos que foi transferido para o vetor pCAMBIA 3300 usando os sítios *Hind III* e *Eco RI* (Figura 2). O vetor contém ainda o gene *bar* que codifica para a proteína fosfinotricina acetiltransferase que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

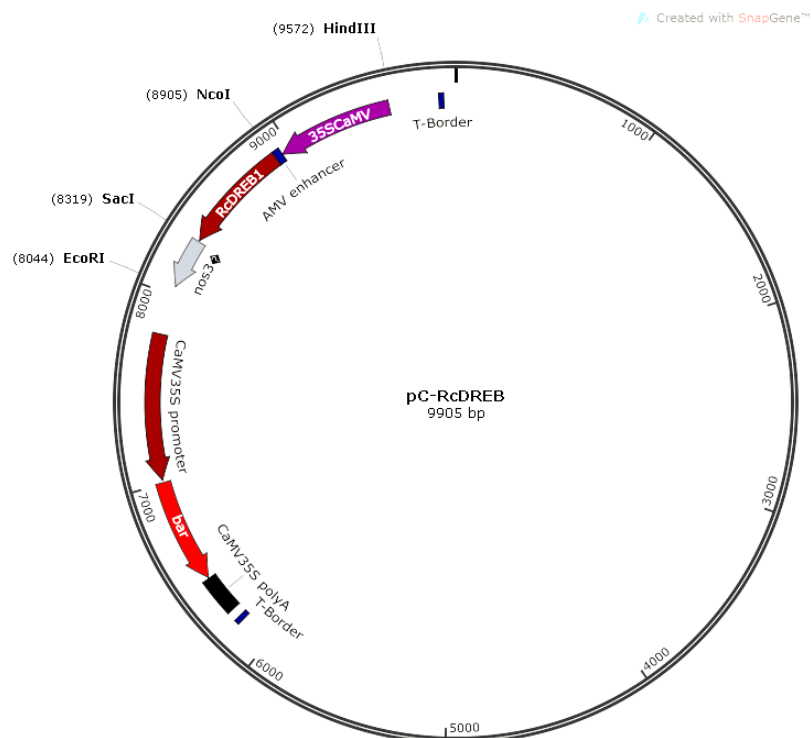


Figura 2: Vetor pC-RcDREB1 utilizado para transformação de tabaco via *Agrobacterium* contendo o gene de interesse *RcDREB1* dirigido pelo promotor CaMV35s e com o terminador nos3', o gene *bar* que confere resistência ao glifosinato de amônio dirigido pelo promotor CaMV35S e com terminador CaMV35S poly A.

O vetor pC-RcDREB1 foi introduzido na cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* e a presença do vetor foi confirmada nas colônias de *A. tumefaciens* através de análise por PCR usando os *primers*: Nco-RcDREB1 (5'-TCCATGGAAGGCGAAACG-3') e Sac-RcDREB1 (5'-CGAGCTCTAATTCCTTTCCCATTC-3') gerando uma banda de 586pb (figura 2).

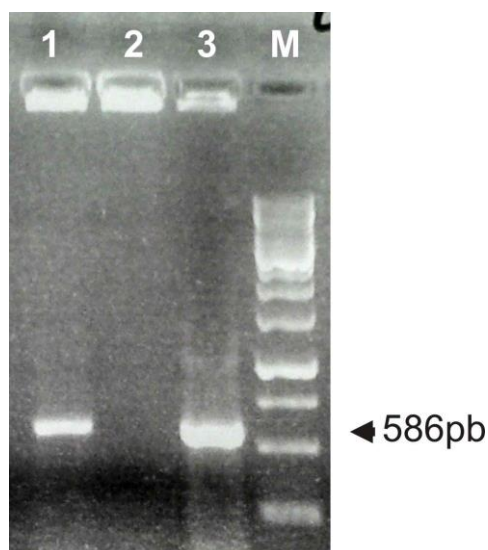


Figura 3: Gel de agarose 0,7% apresentando a amplificação de bandas de aproximadamente 586 pb correspondentes ao gene *RcDREB1* em três colônias de *A. tumefaciens* transformadas com o plasmídeo; 1, 2, 3: colônias diferentes de *A. tumefaciens* e M: marcador DNA Ladder 1kb Invitrogen.

Com a eletroporação foram obtidas três colônias e somente uma não apresentou a banda esperada de 586pb, colônia número 1 foi utilizada para a transformação das plantas de tabaco.

Transformação de plantas de tabaco (Nicotiana tabacum L.)

A linhagem EHA105 pC-RcDREB1 foi utilizada para transformar explantes de tabaco, que permaneceram em meio de indução de gemas até a regeneração de

brotos e desenvolvimento de raízes, então as plântulas obtidas foram aclimatizadas e foram testadas para verificação da inserção do cassete de transformação.

A partir da transformação de plantas de tabaco foram obtidas 20 plantas e 11 plantas foram positivas para o teste de detecção da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT). O teste ao apresentar duas faixas indica a presença da proteína PAT (Figura 3) que demonstra que houve a inserção do gene exógeno *bar* na planta transformada. Entre as plantas obtidas não houve a ocorrência de fenótipo anão.

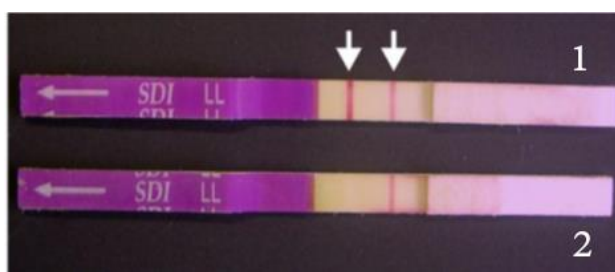


Figura 4: Teste comercial para detecção de fosfinotricina acetiltransferase (PAT), 1: planta transformada apresentando duas bandas indica a presença da proteína PAT, 2: planta não transformada apresentando somente uma banda indica ausência da proteína PAT.

As plantas de tabaco em casa de vegetação foram testadas para a presença do gene *RcDREB1* com os mesmos *primers* que foram utilizados para a verificar a presença do vetor em *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 5 e 6).



Figura 5: Gel de agarose 0,7% apresentando a amplificação de bandas de aproximadamente 586 pb correspondentes ao gene *RcDREB1* de plantas aclimatadas em casa de vegetação; 1 à 16: diferentes plantas aclimatadas; C-: planta controle negativo; C+ controle positivo da reação; Br: reação sem DNA; M: marcador DNA Ladder 1kb.



Figura 6: Gel de agarose 0,7% apresentando a amplificação de bandas de aproximadamente 586 pb correspondentes ao gene *RcDREB1* de plantas aclimatadas em casa de vegetação; 14 à 20: diferentes plantas aclimatadas; C-: planta controle negativo; C+ controle positivo da reação; Br: reação sem DNA; M: marcador DNA Ladder 1kb.

Análise de progênie com glufosinato de amônio

A primeira etapa do teste de estresse hídrico foi uma triagem das trinta plantas de cada linhagem, as plantas contadas como negativas morreram após o teste por não possuir o gene *Bar* que concede tolerância ao glufosinato de amônio, e as positivas sobrevivem. As frequências foram contadas e analisadas em um teste de Qui quadrado com um grau de liberdade de 5% (<3,84) (Tabela 1). Com o grau de liberdade de 5% todas as linhagens tiveram a H_0 aceita, sendo assim todas as linhagens seguem a Lei de Mendel segregando 3:1.

Tabela 1. Análise das frequências de segregação selecionadas através do gene *bar* das linhagens transformadas com o gene *RcDREB1*.

	Positivas	Negativas	(χ^2)	P
P6	25	5	1,11	0,29
P11	21	7	0	1,00
P16	18	11	2,58	0,10
P17	25	4	2,28	0,16
P20	21	8	0,10	0,74

Avaliações do efeito da transformação sobre parâmetros biométricos

As plantas transformadas foram avaliadas em condições sem estresse para observar se a transformação produziria algum tipo de alteração fenotípica. O crescimento de plantas transformadas e o desenvolvimento radicular foram similares as não transformadas (Figura 7A e Figura 7B). A massa fresca e massa seca de parte aérea das plantas transgênicas também foram semelhantes às plantas WT em condições sem estresse. As plantas WT mostraram uma pequena diferença na massa seca, entretanto estatisticamente não significativa das linhagens transformadas (Figura 7C e Figura 7D). De forma geral a linhagem WT teve a maior média de peso fresco e seco de raiz quando comparadas as linhagens transgênicas, entretanto não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 7E e Figura 7F). Apesar da linhagem WT (controle não transformada) apresentar a maior relação raiz/parte aérea da massa fresca não houve diferença estatística quando comparada as linhagens transformadas (Figura 7G). A relação raiz/parte aérea da massa seca também não apresentou diferença estatística (Figura 7H). Portanto, não houve má formação ou alteração negativa do crescimento pela expressão constitutiva deste gene nas plantas de tabaco.

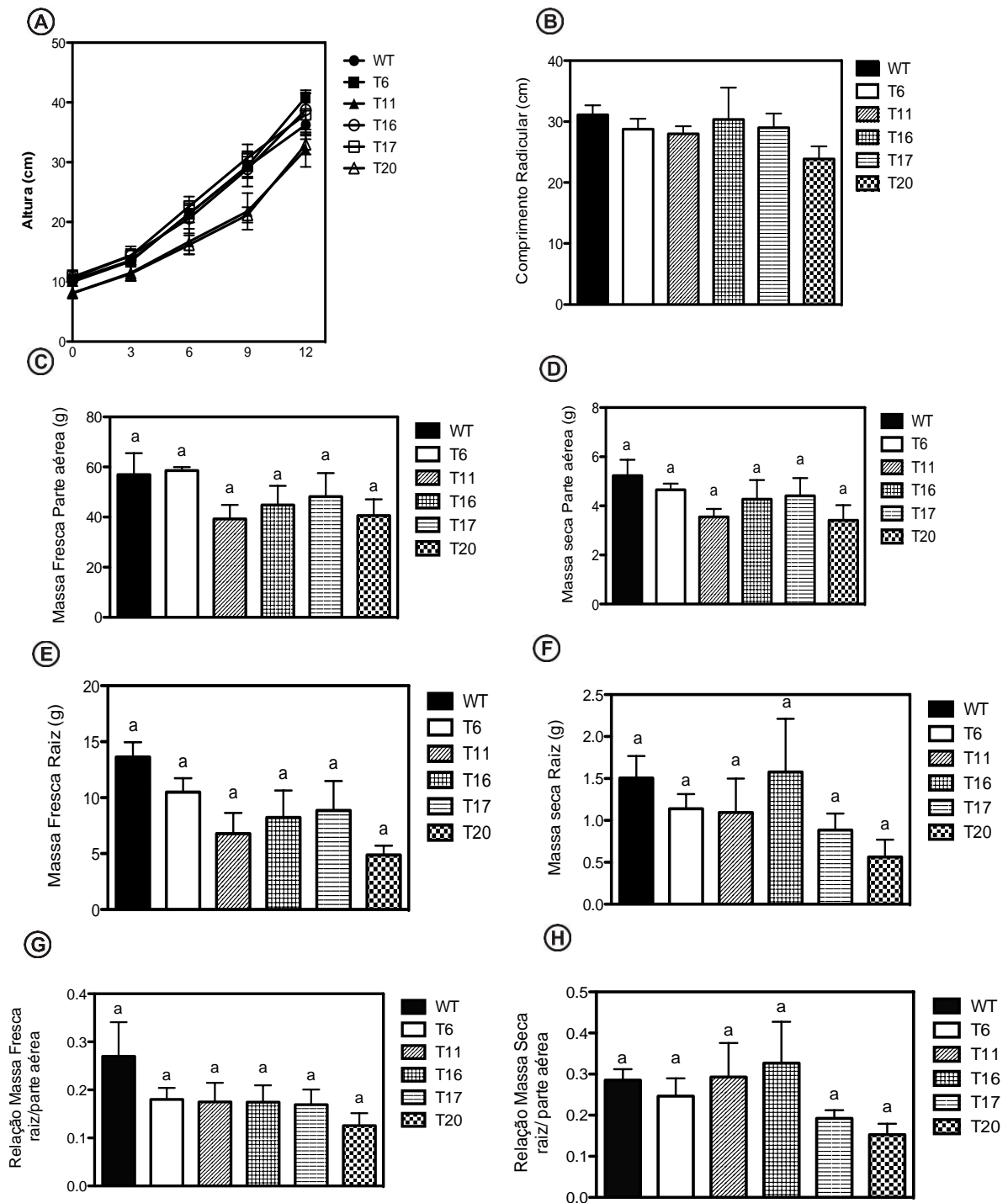


Figura 7: A) Altura das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; B) comprimento radicular das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; C) Massa fresca da parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; D) Massa seca parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; E) Massa fresca da raiz das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; F) Massa seca das raízes das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; G) Relação entre a massa fresca da raiz e a parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca; H) Relação da massa seca entre a raiz e a parte aérea das linhagens WT e transformadas que não foram submetidas ao teste de seca. Não foram observadas variações significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Testes de tolerância ao estresse hídrico

Com um tensiômetro de solo foi medida a quantidade de água no solo durante o teste de seca e não foi observada variação estatística significativa na quantidade de água entre as linhagens transformadas e a linhagem WT (Figura 8).

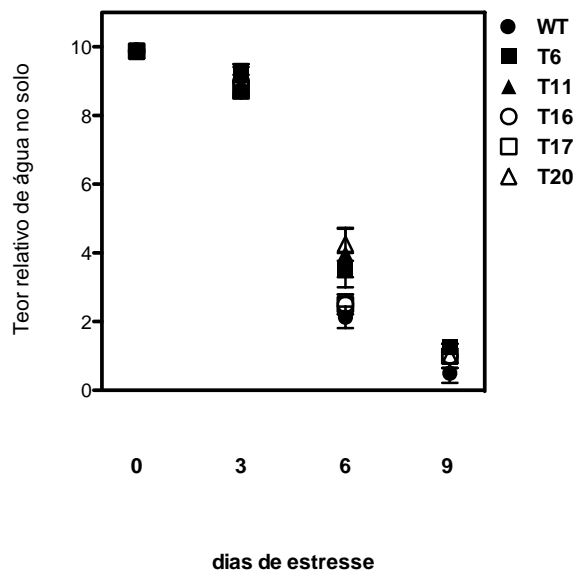


Figura 8: Teor relativo de água no solo durante o período do estresse hídrico. Não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Análise de taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração

No terceiro e sexto dia de estresse foi possível observar que a linhagem T6 apresentou taxa de fotossíntese superior às demais linhagens se diferenciando estatisticamente das plantas não transformadas. Já no sexto dia a maioria das linhagens se diferenciaram do controle mostrando taxa fotossintética maior que a encontrada nas plantas WT com exceção da linhagem T16 que apresentou a menor taxa de fotossíntese dentre as linhagens transformadas. No nono dia todas as linhagens tinham suas taxas de fotossíntese próximas a zero (Figura 9).

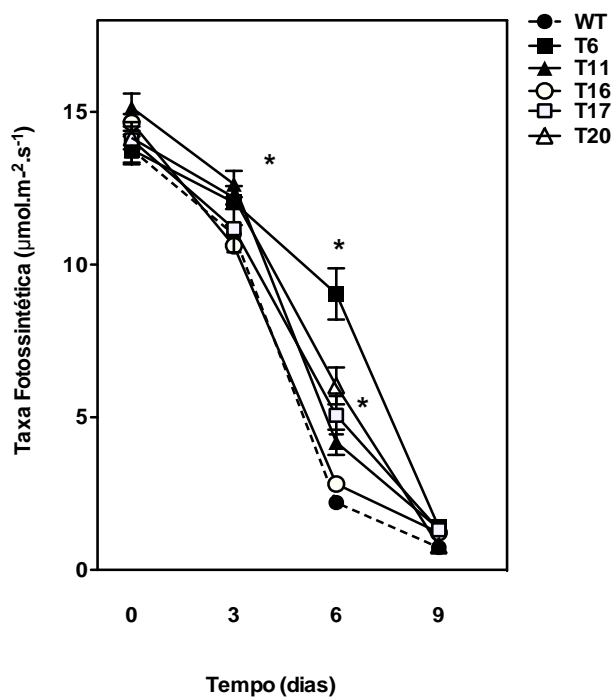


Figura 9: Taxa Fotossintética das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Todas as linhagens transformadas apresentaram menor taxa de transpiração no terceiro dia de estresse se diferenciando estatisticamente das plantas controle. Entretanto, no sexto dia de estresse as linhagens T6, T11 e T17 apresentaram taxas de transpiração maiores que as demais linhagens e que as plantas WT (Figura 10). Todas as plantas avaliadas apresentaram transpiração próxima à zero no último dia avaliado.

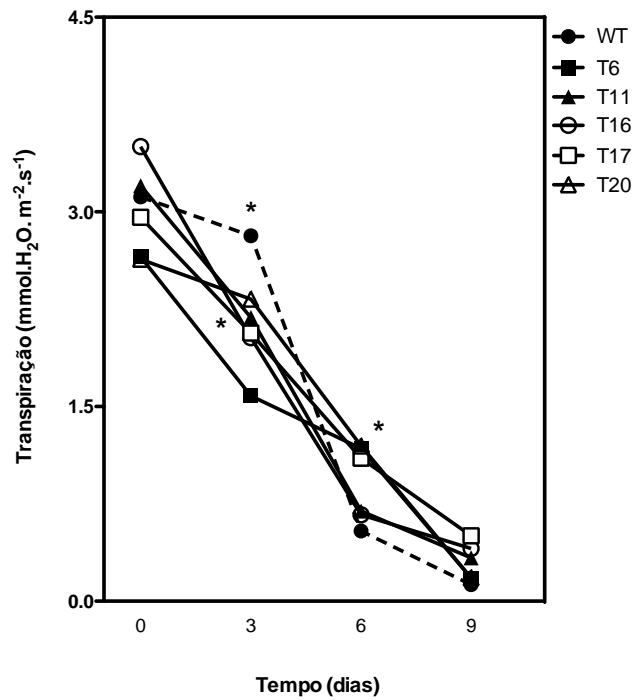


Figura 10: Taxa de transpiração das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A condutância estomática das linhagens transformadas e da WT permaneceu muito próxima ao longo de todo o período do teste com uma única diferença da linhagem T6 ao sexto dia que apresentou diferença estatística das demais linhagens transformadas e da WT (Figura 11). No nono dia de estresse todas as linhagens apresentaram condutância estomática próxima à zero.

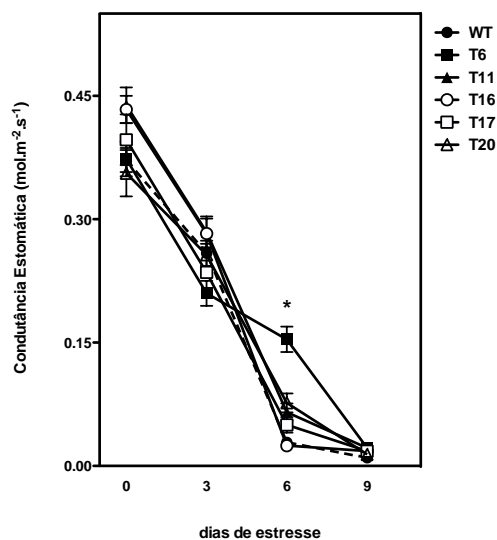


Figura 11: condutância estomática das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Teor relativo de água, eficiência do uso da água instantâneo e potencial hídrico

O teor relativo de água apresentou diferenças estatísticas na linhagem T6. A linhagem transformada T6 apresentou maior média de teor relativo de água no 6^o e 9^o dia, as linhagens T11 e T16 ficaram muito próximas à linhagem T6, as linhagens T17 e T20 ficaram abaixo das linhagens anteriormente citadas; a linhagem WT apresentou o menor teor relativo de água (Figura 12).

A eficiência do uso da água instantâneo não apresentou grandes variações ao longo dos dias do teste, contudo quase todas as linhagens transformadas apresentaram uma maior eficiência no uso da água no terceiro e sexto dia quando comparadas com a linhagem WT. A linhagem T6 no terceiro dia destaca-se das outras linhagens transformadas, porém somente no sexto dia apresenta diferença estatística quando comparada com as demais linhagens (Figura 13).

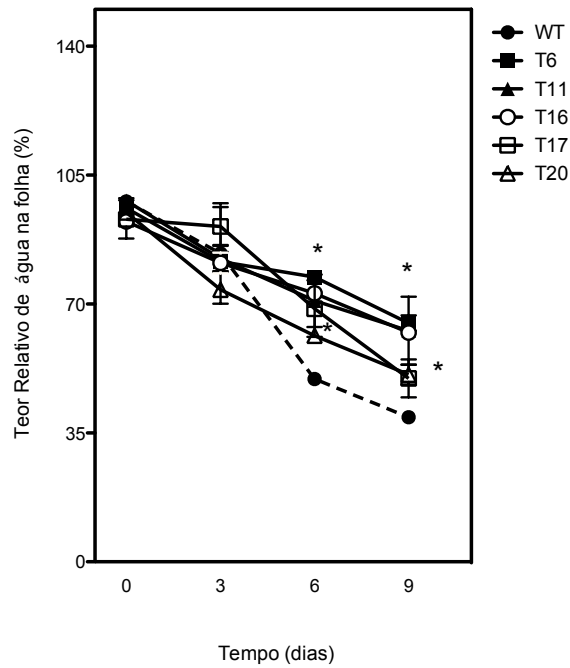


Figura 12: Teor relativo de água das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

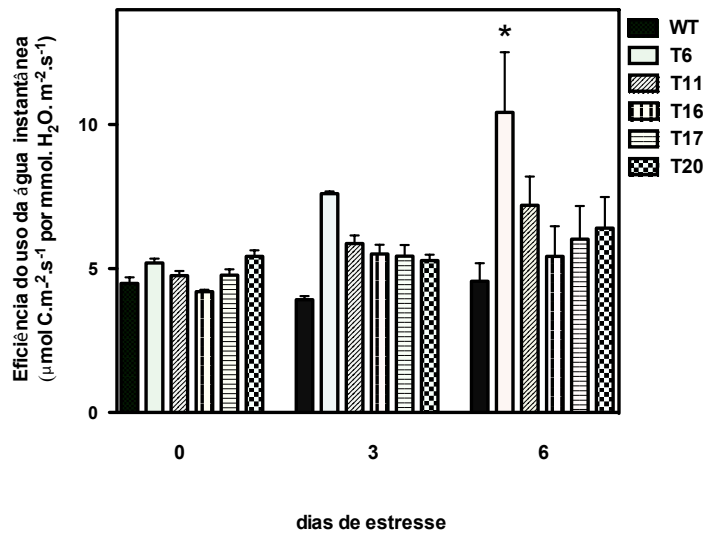


Figura 13: Eficiência do uso da água instantânea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O potencial hídrico das linhagens transformadas mostrou-se muito próximo.

A linhagem T16 teve uma queda do potencial menos drástica quando comparada as

outras linhagens analisadas sendo a linhagem que conservou o maior potencial hídrico, as linhagens T6, T11 e T17 apresentaram valores medianos, dentre as linhagens transformadas a linhagem T20 apresentou o menor potencial hídrico, a linhagem WT teve o menor potencial hídrico diferenciando-se estatisticamente nos dias 6 e 9 das linhagens transformadas (Figura 14).

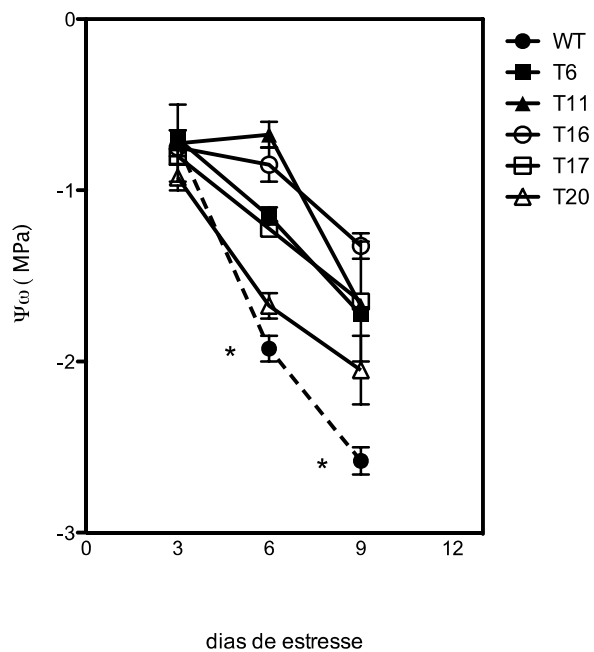


Figura 14: Potencial hídrico das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Testes biométricos

A altura das plantas de tabaco analisadas foi medida antes da suspensão da rega, e foi medido sequencialmente a cada três dias até o fim do teste. As plantas de tabaco que foram submetidas ao estresse obtiveram altura máxima inferior a 30 cm de altura, as plantas da linhagem T6 e da linhagem T17 foram as plantas que atingiram a maior altura apesar do estresse hídrico. As plantas da linhagem T16 atingiram uma altura média entre as linhagens e as plantas das linhagens T11 e T20 atingiram as menores médias de altura, apesar de ainda ter uma altura média acima de 20 cm, a linhagem WT obteve um crescimento médio muito abaixo de 20 cm (Figura 15).

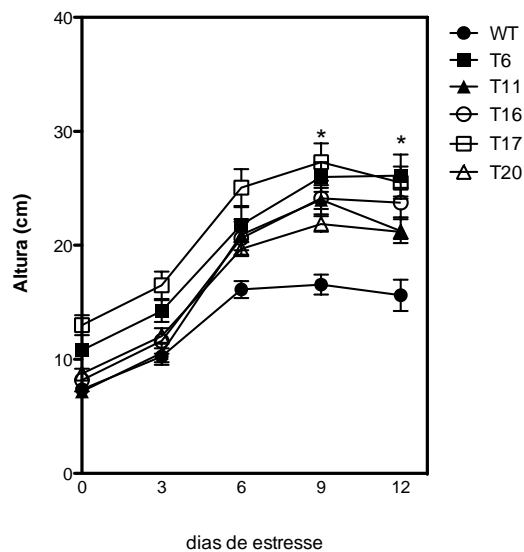


Figura 15: Crescimento de parte aérea médio das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Os asteriscos representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As plantas transgênicas submetidas ao estresse apresentaram comprimento radicular semelhante às plantas WT. As plantas da linhagem T20 apresentaram as

maiores médias de comprimento de raiz com aproximadamente 36 cm em seguida as plantas da linhagem T16 com 34 cm, a linhagem T6 apresentou média de 32 cm sendo a terceira maior, as plantas T11 e T17 apresentaram médias iguais de 29 cm, a WT apresentou média de 30 cm (Figura 16).

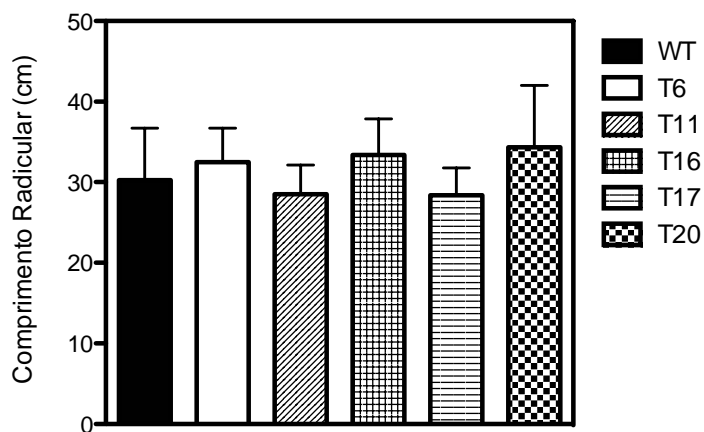


Figura 16: Comprimento radicular das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A massa fresca da parte aérea das linhagens transgênicas foi superior a encontrada em plantas WT, entretanto apenas as linhagens T6 e T17 se diferiram estatisticamente (Figura 17) das plantas da WT.

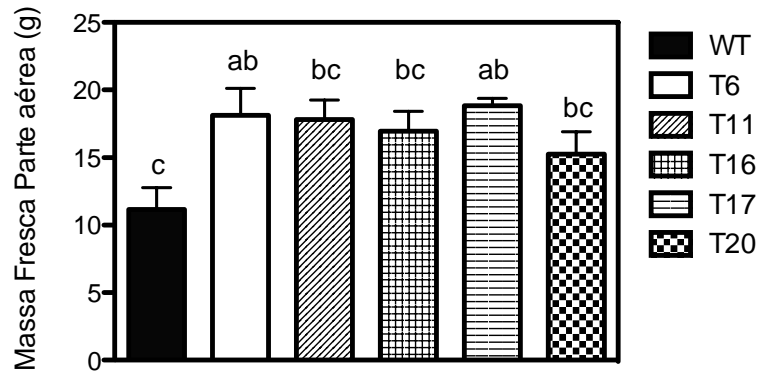


Figura 17: massa fresca da parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Após o período de secagem em estufa do material o peso seco obtido ficou entre 2g e 3g (Figura 18), a linhagem WT apresentou a menor massa seca de todas as plantas avaliadas. As linhagens transformadas T6, T16 e T17 foram estatisticamente diferentes das plantas WT.

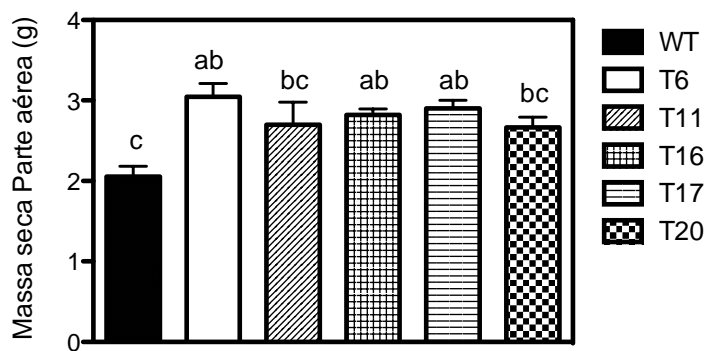


Figura 18: massa seca da parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A massa fresca das raízes das linhagens analisadas durante o teste de seca não apresentou grandes diferenças estatísticas (Figura 19). As plantas WT tiveram as maiores médias de peso fresco de raiz, as plantas da linhagem T16

apresentaram as maiores médias de peso das raízes das linhagens transformadas seguidas pelas linhagens T6 e T17, as plantas da linhagem T20 tiveram a menor média de peso de massa fresca da raiz dentre todas as linhagens analisadas.

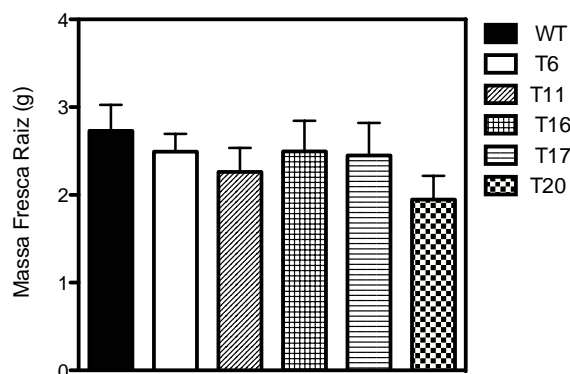


Figura 19: massa fresca da raiz das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Assim como na massa fresca as plantas WT apresentaram maiores médias de peso seco, a linhagem T6 foi a que apresentou maior peso seco das linhagens transformadas, contudo não houve variação estatística entre as médias (Figura 20).

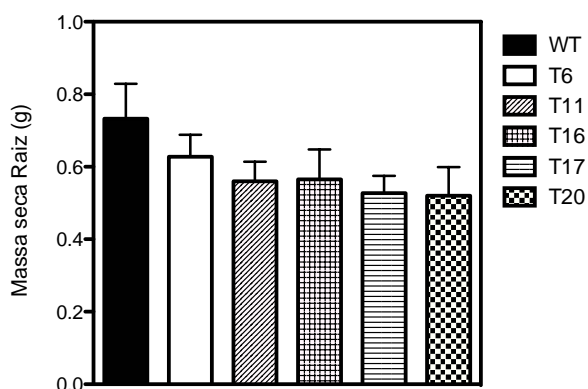


Figura 20: massa seca das raízes das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A relação raiz/parte aérea de massa fresca das plantas WT foi superior estatisticamente à relação encontrada em todas as linhagens de plantas transgênicas avaliadas (Figura 21).

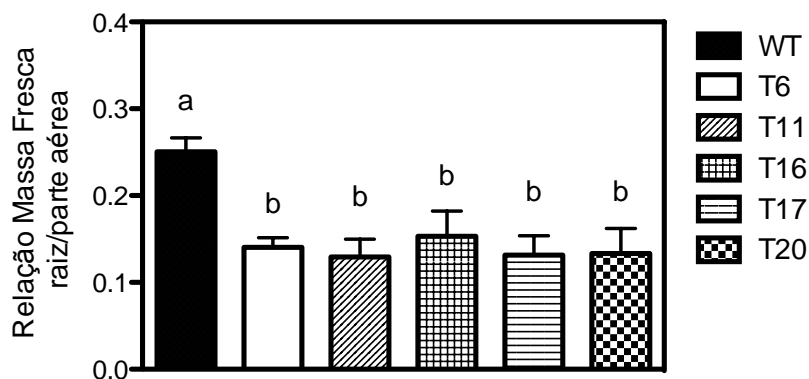


Figura 21: Relação de massa fresca entre raiz e parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A relação raiz/parte aérea da massa seca foi bem similar à relação entre a raiz/parte aérea da massa fresca. A linhagem WT apresentou também a maior relação entre todas as linhagens transformadas (Figura 22). Podemos avaliar que com estes resultados que houve maior crescimento e investimento energético nas raízes em plantas WT e na parte aérea em plantas transgênicas.

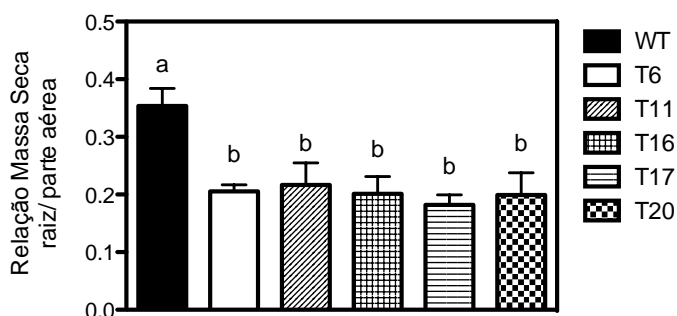


Figura 22: Relação de massa seca entre a raiz e a parte aérea das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após período de estresse hídrico. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Teste de viabilidade do grão de pólen

O teste de viabilidade dos grãos de pólen foi realizado com as linhagens transformadas T6, T11, T17 e T20. As linhagens transformadas T11 e T20 apresentaram maior viabilidade do pólen mesmo em condições de estresse. As linhagens transformadas T6 e T17 não apresentaram divergências significativas da linhagem WT ao passarem pelo estresse de calor (Figura 23). A linhagem WT teve uma viabilidade próxima a 20% após o teste de tolerância a calor, as linhagens T11 e T20 que foram estatisticamente diferentes tiveram viabilidades após o teste próximas a 50%.

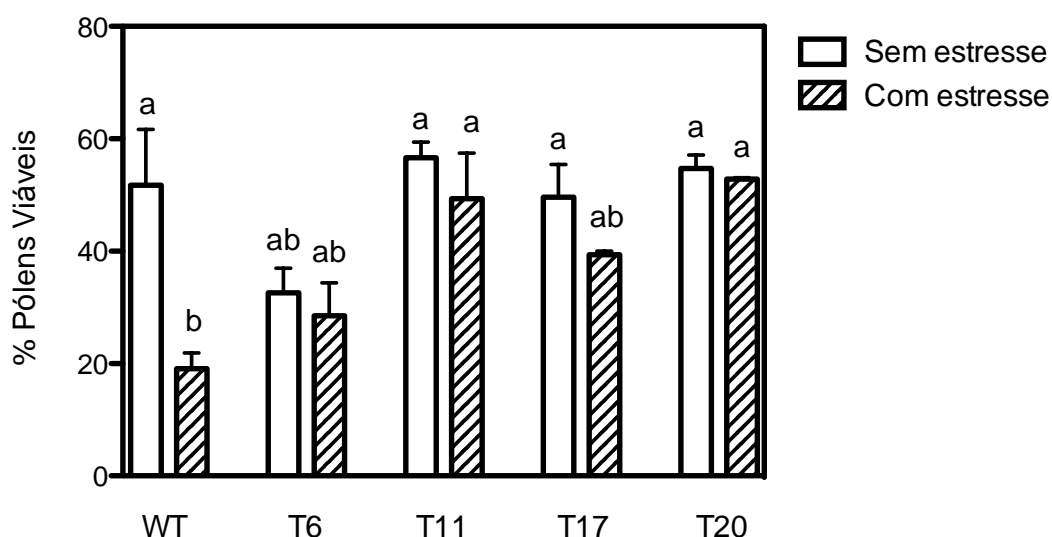


Figura 23: Viabilidade dos grãos de pólen das linhagens WT e transformadas de plantas de tabaco após estresse por calor e viabilidade sem estresse por calor. As letras representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fotos comparativas após o estresse hídrico e plantas não estressadas

As plantas transformadas foram visivelmente mais tolerantes ao estresse hídrico (Figura 24) tanto ao observar a murcha das folhas como o crescimento

durante o período de estresse, as imagens A, C e D da linhagem WT e linhagens T6, T16, T17 as linhagens transformadas apresentaram um crescimento maior durante o estresse assim como um maior turgor foliar, as imagens B, D e F são comparações entre a linhagem WT e as linhagens transformadas T6, T16 e T17 que passaram e não passaram por período de estresse. Após o período de estresse hídrico as plantas foram irrigadas e fotografadas com intervalos de uma hora (Figura 25), as linhagens transformadas apresentaram uma recuperação levemente mais rápida.

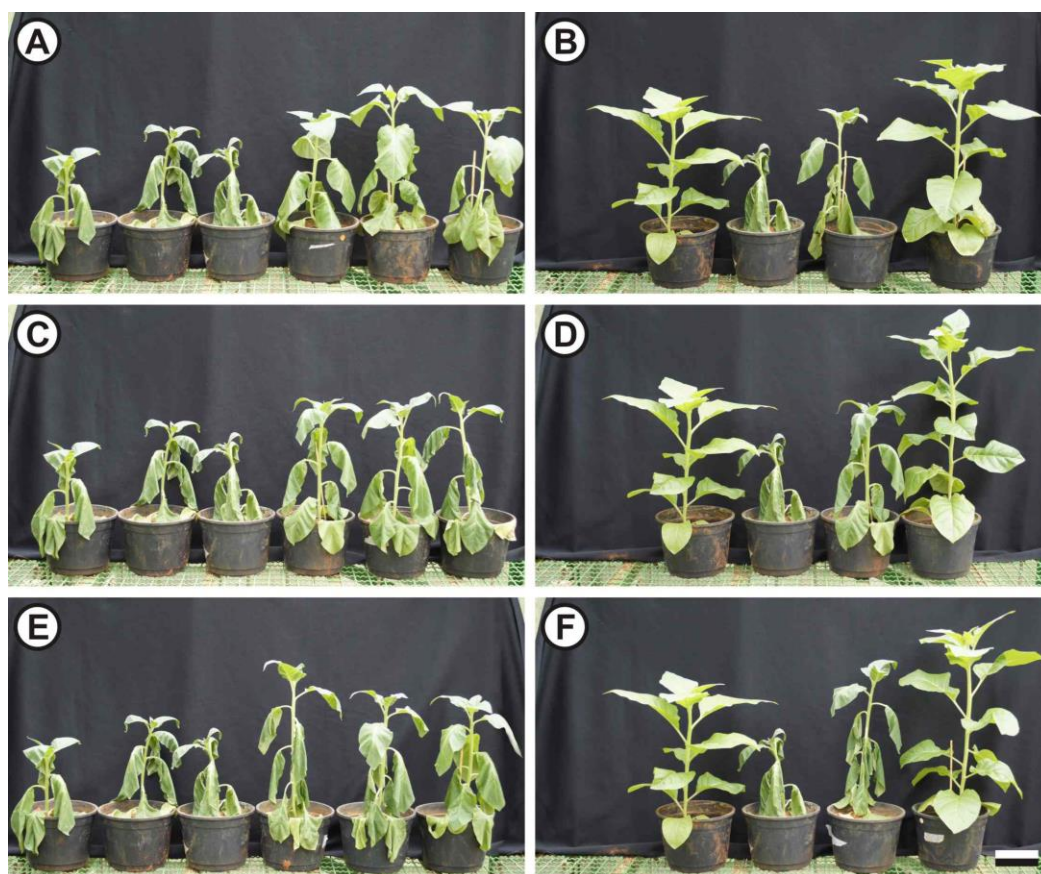


Figura 24: Comparação entre plantas WT e plantas das linhagens T6, T16 e T17 submetidas ou não ao estresse hídrico. A) Comparação de três plantas da linhagem WT, a esquerda e três plantas da linhagem T6 a direita que foram submetidos ao estresse hídrico; B) plantas da linhagem WT que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a esquerda e plantas da linhagem T6 que foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi não submetida ao estresse hídrico, a direita; C) Comparação de três plantas da linhagem WT a esquerda e três plantas da linhagem T16 a direita que foram submetidos ao estresse hídrico; D) plantas da linhagem WT que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a esquerda, plantas da linhagem T16 que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a direita; E) Comparação de três plantas da linhagem WT a esquerda e três plantas da linhagem T17 a direita que foram submetidos ao estresse hídrico; F) plantas da linhagem WT que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a esquerda, plantas da linhagem T17 que não foram submetidas ao estresse hídrico ao lado da planta que foi submetida ao estresse hídrico a direita; barra de escala 10 cm.



Figura 25: Recuperação das plantas submetidas ao teste de estresse hídrico com intervalos de uma hora; plantas posicionadas da seguinte forma da esquerda para a direita: WT, T6, T11, T16, T17, T20, plantas das linhagens transformadas com recuperação ligeiramente mais rápida.

Discussão

Ao compararmos em condições normais o crescimento das linhagens transformadas constitutivamente com o gene *RcDREB1* com a linhagem WT não foram observadas diferenças estatísticas no comprimento das plantas (Figura 7) ou em qualquer outra avaliação biométrica. Genes *DREB* podem causar um fenótipo anão quando expressados constitutivamente, isso foi demonstrado por Cong *et al.* (2008b) que o gene *DREB1A* ao ser superexpresso sob controle do promotor CaMV35S em tabaco, apresentou fenótipo anão neste mesmo relato foi utilizado o promotor rd29A que é um promotor ativo apenas em estresse abiótico, e as plantas de tabaco tiveram um crescimento reduzido em 30% enquanto as plantas com o promotor 35S tiveram crescimento reduzido em 78% quando comparadas a linhagem WT. O gene *BjDREB1B* ao ser superexpresso também em tabaco causou um retardo no crescimento, mas não o fenótipo anão (Cong *et al.*, 2008a). Já ao superexpressar o gene *PeDREB2* em tabaco não foi observado fenótipo anão nem retardo no crescimento (Chen *et al.*, 2009).

Os resultados das análises com o IRGA apontaram uma melhor resposta ao estresse por seca pelas linhagens transformadas com o gene *RcDREB1*. Dentre as linhagens transformadas a linhagem T6 obteve um melhor desempenho, que pode ser atribuído ao número de cópias do gene inseridas na linhagem, a posição que o gene se inseriu no genoma da linhagem (Aragão *et al.*, 1999) e isso deverá ser futuramente investigado. Esta linhagem apresentou a maior taxa de fotossíntese e maior turgidez quando comparada as demais plantas avaliadas mesmo após 6 dias de estresse (Figura 9).

A fotossíntese depende da entrada de CO₂ que é limitada a abertura dos estômatos. Durante períodos de estresse hídrico uma resposta adaptativa das plantas é o fechamento estomático para evitar a perda de água e este é induzido pela perda de turgidez celular e ação do ácido Abscísico (ABA) (Chaves *et al.*, 2002). Foi observado que a linhagem T6 teve uma queda maior na taxa de transpiração ao terceiro dia (Figura 10), entretanto, no sexto dia a queda na taxa de transpiração foi suavizada indicando que as plantas da linhagem T6 responderam de forma rápida ao estresse no terceiro dia e talvez por isto ao sexto dia mantiveram uma menor taxa de transpiração.

Ao analisar a condutância estomática da linhagem T6 (Figura 11) foi observada uma redução da condutância estomática ao terceiro dia e ao sexto dia uma queda menos acentuada produzindo assim uma linha no gráfico similar a linha observada no gráfico de transpiração o que implica nas maiores taxas de fotossíntese encontradas nesta linhagem. A abertura dos estômatos tem um impacto direto na fotossíntese. Caso haja um completo fechamento dos estômatos a fotossíntese é interrompida (Osakabe *et al.*, 2014), provavelmente a linhagem T6 obteve uma maior fotossíntese ao sexto dia por ter reduzido a condutância estomática e conseqüentemente a transpiração no terceiro dia de estresse mantendo as trocas gasosas sem uma completa interrupção.

Ao ser caracterizado em trabalhos anteriores o gene *RcDREB1* foi classificado como membro do grupo A-5 dentro da subfamília de DREB, assim como o *DREB2A* de *Arabidopsis*. O grupo A-5 é conhecido por ter resposta ao ABA (Mizoi *et al.*, 2012; Cipriano *et al.*, 2013). O ABA é o maior fito-hormônio associado a sinalização de estresse hídrico e fundamental as plantas na regulação osmótica e tolerância a desidratação (Taiz & Zeiger, 2004b; Bouaziz *et al.*, 2012). A linhagem

WT teve uma transpiração muito maior ao terceiro dia que as linhagens transformadas, conseqüentemente a linhagem WT teve uma maior perda de água que pode ser observada no potencial hídrico (Figura 14) assim como na murcha das folhas (Figura 24 A, C, E).

As linhagens transformadas apresentaram maior potencial hídrico quando comparada a linhagem WT tanto no terceiro dia como no sexto dia de estresse, com exceção da T20. O potencial hídrico é um indicador do conteúdo de água nos tecidos e está relacionada ao alongamento celular, fotossíntese e produtividade da planta (Taiz & Zeiger, 2004*b*; Jaleel *et al.*, 2009). Com um baixo potencial hídrico as células não têm turgor e assim há paralização do crescimento dos tecidos (Taiz & Zeiger, 2004*b*; Chaves *et al.*, 2002). De forma semelhante e esperada, com exceção da T20, todas as linhagens transgênicas avaliadas apresentaram maior teor relativo de água no terceiro e sexto dia de estresse (Figura 12).

Ao analisarmos a eficiência instantânea do uso da água podemos observar que de forma geral todas as linhagens transgênicas mostraram-se mais eficientes que as plantas WT. Entretanto apenas a T6 foi estatisticamente diferente das demais plantas avaliadas confirmando os outros dados analisados no qual apontam esta como a melhor linhagem obtida. A eficiência no uso de água relaciona a produção de biomassa por quantidade de água utilizada, sendo importante na agronomia por otimizar o uso da água na produção agrícola (Taiz & Zeiger, 2004*b*; Silva *et al.*, 2013).

As linhagens transformadas apresentaram altura (Figura 15) e maior massa fresca da parte aérea (Figura 17) durante o período de estresse quando comparadas a linhagem WT o que pode ser explicado pelos fatores avaliados como fotossíntese e maior eficiência no uso da água que permitiram manter uma pressão de turgor por

mais tempo permitindo a continuidade do crescimento mesmo que em menor velocidade. Ao analisarmos a massa seca da parte aérea é observado um maior acúmulo de biomassa nas linhagens transformadas (Figura 18) que é resultado da biomassa acumulada pela fotossíntese que foi mantida por um período maior (Figura 9).

O comprimento radicular (Figura 16) massa fresca da raiz (Figura 19) e massa seca da raiz (Figura 20) não indicaram divergências entre a linhagem WT e as linhagens transformadas. Entretanto ao analisar os dados das relações raiz/parte aérea de massa fresca e massa seca (Figura 21, Figura 22) podemos observar que a linhagem WT apresentou uma maior relação entre raiz/parte aérea que as linhagens transformadas indicando um maior investimento em raiz nas linhagens WT e maior investimento das linhagens transformadas em parte aérea (Taiz & Zeiger, 2004b).

Todos os parâmetros fisiológicos avaliados tiveram como objetivo observar como as plantas transformadas respondem ao estresse e tentar entender a possível rota de sinalização em que este fator de transcrição está envolvido. Acreditamos que este gene pode estar associado à sinalização por ABA uma vez que os resultados mostram que as plantas transgênicas aparentemente respondem de forma mais rápida ao estresse uma vez que foi observado em algumas linhagens a maior redução da condutância estomática logo no início do estresse e maior manutenção do conteúdo de água durante o estresse. A linhagem T6 se destaca como melhor linhagem por ter uma resposta mais rápida ao estresse, sendo capaz de fechar mais rapidamente os estômatos e manter a fotossíntese maior que a encontrada nos controles durante o estresse. O crescimento radicular apesar de não ser estatisticamente menor nos mostra através das relações raiz/parte aérea que houve

menor investimento em raízes por parte das plantas transgênicas e este fato vai ao encontro das plantas mais sensíveis a sinalização realizada por ABA (Chaves *et al.*, 2002; Jaleel *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2014)

Os pólenes expostos ao estresse por calor das linhagens transformadas apresentaram uma maior viabilidade que o pólen da linhagem WT (Figura 24). Shivanna *et al.*, (1991) relatam que a viabilidade do pólen não está diretamente ligada ao vigor do pólen ou seja a capacidade de fecundar a flor, contudo a alta viabilidade quando em estresse das linhagens transformadas é um grande avanço pois os pólenes da linhagem WT apresentaram uma viabilidade muito menor. Os genes *APETALA-2* já são conhecidos por terem papel no desenvolvimento do meristema floral. O gene *RcDREB1* teve sua expressão observada inicialmente em grãos de pólen em antese, momento no qual a flor está aberta e o pólen está exposto ao ambiente e vulnerável, devido a isso é esperado que o gene *RcDREB1* atua elevando a tolerância aos estresses abióticos nos quais os pólenes serão submetidos (Taiz & Zeiger, 2004b; Dinh *et al.*, 2012; Cipriano *et al.*, 2013).

Conclusão

O gene *RcDREB1* ao ser expresso de forma constitutiva concedeu maior tolerância as plantas submetidas a seca e elevando a viabilidade do pólen em condições estressantes de alta temperatura. Dentre as linhagens transformadas a linhagem T6 teve um destaque apresentando melhores resultados nos testes de estresse hídrico, porém a linhagem T6 não teve os melhores resultados durante o teste do pólen. No entanto, embora tenha apresentado uma redução inicial da viabilidade de pólen, também teve baixa redução na viabilidade após o estresse por calor.

Perspectivas

Os dados obtidos nesse estudo indicam que o gene *RcDREB1* é um gene que pode ser utilizado em programas de melhoramento de cultivares comerciais como feijão e soja por não induzir fenótipo indesejado e não somente elevar a tolerância ao estresse hídrico como permitir um certo ganho de massa durante o período do estresse. Também foi observado que os grãos de pólen têm uma maior viabilidade durante períodos de estresse por calor sendo um bom candidato ao melhoramento de milho, pois a produtividade do milho depende da polinização, assim é muito provável que pólenes que se mantem viáveis por mais tempo elevem a produtividade dessas plantas.

Como continuidade do estudo do gene *RcDREB1* há a necessidade de avaliar as plantas das melhores linhagens obtidas em homozigose e quantificar os níveis de prolina que é um osmorregulador e ABA para assim compreender o mecanismo de ação do gene.

Referências bibliográficas

- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK** (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* **25**: 1263–74
- Aragão FJL, Rech EL** (1998). Isolamento de vetores para transformação direta In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro), pp. 17-34. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL** (1999) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* **101**:1–6.
- Aragão FJL, Santos MO, Moraes LS, Romano E** (2002) Metodologias para transformação genética de plantas-modelo. Circular técnica 15.
- Babita M, Maheswari M, Rao LM, Shanker AK, D. Rao DG** (2010) Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. *Environ Exp Bot* **69**: 243–249
- Ban Q, Liu G, Wang Y** (2011) A *DREB* gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco. *J Plant Physiol* **168**: 449–58
- Bouaziz D, Pirrello J, Ben Amor H, Hammami A, Charfeddine M, Dhieb A, Bouzayen M, Gargouri-Bouزيد R** (2012) Ectopic expression of dehydration

responsive element binding proteins (*StDREB2*) confers higher tolerance to salt stress in potato. *Plant Physiol Biochem* **60**: 98-108

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, et al., (2002) How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Ann Botany* **89**: 907-916

Chen M, Wang Q-Y, Cheng X-G, Xu Z-S, Li L-C, Ye X-G, Xia L-Q, Ma Y-Z (2007) *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun* **353**: 299–305

Chen J, Xia X, Yin W (2009) Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica*. *Biochem Biophys Res Commun* **378**: 483–7

Cipriano TM, Morais AT, Aragão FJL (2013) Characterization of a pollen-specific and desiccation-associated *AP2/ERF* type transcription factor gene from castor bean (*Ricinus communis* L.). *Int J Plant Biol.* **4**: 1-7.

Cong L, Chai T-Y, Zhang Y-X (2008a) Characterization of the novel gene *BjDREB1B* encoding a DRE-binding transcription factor from *Brassica juncea* L. *Biochem Biophys Res Commun* **371**: 702–6

Cong L, Zheng H, Zhang Y, Chai T (2008b) Arabidopsis *DREB1A* confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in Tobacco. *Plant Sci* **174**: 156–164.

Dinh TT, Girke T, Liu X, Yant L, Schmid M, Chen X (2012) The floral homeotic protein *APETALA2* recognizes and acts through an AT-rich sequence element. *Dev Biol* **139**: 1978-1986

- Fujii H,• Zhu J K** (2012) Osmotic stress signaling via protein kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**: 3165–3173.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436–42
- Gutha LR, Reddy AR** (2008) Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* **68**: 533–55
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Jururi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R** (2009) Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int J Agric Biol* **11**: 100–105
- Kim Y, Yang K, Ryu S, Kim K, Song W, Kwon S, Lee H, Bang J, Kwak S** (2008) Molecular characterization of a cDNA encoding DRE-binding transcription factor from dehydration-treated fibrous roots of sweetpotato. *Plant Physiol Biochem* **46**: 196-204
- Knight H, Knight MR** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262–7
- Krasensky J; Jonak C.** (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593–1608.
- Lata C, Prasad M** (2011) Role of *DREBs* in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot* **62**: 4731–48

- Lacorte C, Romano E** (1998). Transferência de vetores para *Agrobacterium* In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro), pp. 93-109. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15–9
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2012) *AP2/ERF* family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 86–96
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473– 497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nayak SN, Balaji J, Upadhyaya HD, Hash CT, Kishor PBK, Chattopadhyay D, Rodriguez LM, Blair MW, Baum M, McNally K, et al.**, (2009) Isolation and sequence analysis of *DREB2A* homologues in three cereal and two legume species. *Plant Sci* **177**: 460–467
- Peleg ZVI, Apse MP, Blumwald E, Sciences P, Biosciences A** (2011) Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field abscisic acid catalase calcium-dependent protein kinase calcineurin B-like protein-interacting protein kinase cytokinin dehydration-responsive element binding pro, 1st ed. *Plant Responses to drought Salin Stress Dev a Post-Genomic Era* **57**: 405–443
- Reis RR, Andrade Dias Brito da Cunha B, Martins PK, Martins MTB, Alekcevetch JC, Chalfun-Júnior A, Andrade AC, Ribeiro AP, Qin F, Mizoi J, et al.**, (2014) Induced over-expression of *AtDREB2A* CA improves drought tolerance in sugarcane. *Plant Sci* **221-222**: 59–68

- Romano E** (1998). Extração de DNA de tecidos vegetais. In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro), pp. 163-177. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2002) DNA-binding specificity of the *ERF/AP2* domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 998–1009
- Severino LS, Auld DL, Baldanzi M, et al.**, (2012) A Review on the Challenges for Increased Production of *Castor*. *Agronomy Journal* **104**: 853-880
- Shivanna KR, Cresti M** (1989) Effects of high humidity and temperature stress on pollen membrane integrity and pollen vigour in *Nicotiana tabacum*. *Sex Plant Reprod* **2**: 137-141
- Silva AO, Silva EFF, Klar AE** (2013) Eficiência de uso da água em cultivares de beterraba submetidas a diferentes tensões da água no solo. *Water Resources and Irrigation Management* **2**: 27-36.
- Suzuki N, Rivero R M, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R** (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**: 32–43
- Taiz L, Zeiger E** (2004a) A água e as células vegetais *in*: *Fisiologia vegetal*. Artmed, p.61-74.
- Taiz L, Zeiger E** (2004b) Fisiologia do estresse *in*: *Fisiologia vegetal*. Artmed, p.613-643.

- Xie M, Wu D, Duan G, Wang L, He R, Li X, Tang D, Zhao X, Liu X** (2014) *AtWNK9* is regulated by ABA and dehydration and is involved in drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **77**: 73–83
- Zhang M, Liu W, Bi Y-P** (2009) Dehydration-responsive element-binding (DREB) transcription factor in plants and its role during abiotic stresses. *Hered* **31**: 236–244
- Zhang G, Chen M, Li L, et al.**, (2009). Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot.* **60**: 3781-3796
- Zhou M, Ma J, Pang J, Zhang Z, Tang Y** (2010) Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. *Afr J Biotechnol* **9**: 9255–9269
- Zhu L, Guo J, Zhu J, Zhou C** (2014) Enhanced expression of *EsWAX1* improves drought tolerance with increased accumulation of cuticular wax and ascorbic acid in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **75**: 24–35