

GILZA BARCELOS DE SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM O FATOR DE  
TRANSCRIÇÃO GmbZIP105 DE SOJA (*Glycine max*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729i  
2014 Souza, Gilza Barcelos de, 1990-  
Identificação de proteínas que interagem com o fator de  
transcrição GmbZIP105 de soja (*Glycine max*) / Gilza Barcelos  
de Souza. – Viçosa, MG, 2014.  
v, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Soja - Resistência. 2. Proteínas. 3. Patógenos.  
4. Estresse biótico. 5. Transfatores. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 583.74

GILZA BARCELOS DE SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM O FATOR DE  
TRANSCRIÇÃO GmbZIP105 DE SOJA (Glycine max)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014.

---

Claudine Márcia Carvalho

---

Cleberson Ribeiro

---

Luciano Gomes Fietto  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, pelo exemplo de vida.

Aos meus amados irmãos, meus primeiros e mais sinceros amigos.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar um curso de pós-graduação de excelente qualidade.

A Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação De Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Luciano Gomes Fietto, pela oportunidade.

Ao meu co-orientador Murilo Siqueira Alves, pela paciência, além da enorme contribuição durante a execução dos experimentos.

Aos meus novos e antigos amigos, pela amizade.

A todos os membros do Laboratório de Biotecnologia Molecular, que direto ou indiretamente contribuí para realização do presente trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1. Mecanismos de defesa vegetal contra estresse biótico .....	3
1.1 Vias de sinalização de hormônios na resposta a estresse biótico .....	5
1.1.1 Interações entre as vias de transdução de sinal de ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico .....	6
1.1.2 Interação entre vias de sinalização de ácido salicílico e auxina .....	8
1.2 Família de fatores de transcrição bZIPs .....	10
1.3 Interação entre proteínas em vias de sinalização .....	13
III. OBJETIVO .....	16
1 Metas específicas .....	16
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
1. Identificação e clonagem do gene de soja que codificam para transfator da família bZIP relacionados com a resposta a patógenos .....	17
2. Transformar e expressar o gene GmbZIP105 em leveduras .....	18
3. Identificação de proteínas que interagem com a proteína GmbZIP105 através da triagem pelo sistema do duplo-híbrido de leveduras .....	18
4. Sequenciamento dos cDNAs isolados .....	20
5. Análises de bioinformática .....	20
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
1. Clonagem do transfator GmZIP105 .....	22
2. Proteínas isoladas na triagem .....	24
3. Identificação dos clones positivos .....	26
3.1 Proteína não caracterizada de G. max .....	26
3.2 Asparagina sintetase .....	27
3.3 Proteína reprimida por auxina (ARP) .....	28
3.3.1 Função das proteínas reprimidas por auxinas em plantas .....	32
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	34
VII. CONCLUSÃO .....	36
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## RESUMO

SOUZA, Gilza Barcelos de, M.Sc., Universidade federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Identificação de proteínas que interagem com o fator de transcrição GmbZIP105 de soja (*Glycine max*)**. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientador: Murilo Siqueira Alves.

As plantas são organismos sésseis capazes de reconhecer e combater os diversos patógenos. O reconhecimento dos organismos estranhos ou efetores liberados por eles resulta em Imunidade Desencadeada por Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PTI) ou em Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI). Em resposta a reconhecimento dos patógenos a planta hospedeira ativam complexas vias de sinalização de defesa, que muitas vezes são mediadas pelos fito-hormônios tais como auxina, ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA) giberilinas e etileno (ET). Outro importante componente das vias de defesa são os transfatores. A família bZIP possuem alguns membros relatados por serem responsivos a estresses biótico e abiótico, entretanto, poucas interações entre proteínas que modulam esses transfatores são conhecidas. Alguns genes bZIPs do grupos C de *Arabidopsis thaliana* e seus ortólogos são relatados em resposta a estresse biótico. Considerando a similaridade de estrutura com esses genes, além de serem responsivos a fito-hormônios e ao fungo biotrófico em soja, acreditamos que o gene bZIP105 possui uma função relevante em vias de sinalização em resposta a estresse biótico. O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas que interagem com GmbZIP105 em ensaios de duplo híbrido de leveduras, utilizando o transfator como isca para obtenção de cDNAs alvos em biblioteca de soja submetidas a diferentes estresses. Foram identificadas três proteínas que interagem com GmbZIP105 na triagem da biblioteca de soja: proteínas não caracterizada de soja, asparagina sintetase e proteínas reprimida por auxina (ARP). A proteína não caracterizada não há relatos sobre seus domínios conservados e sua função bioquímica. A proteína asparagina sintetase é descrita por ser responsivo a infecção por patógenos e tratamento com fito-hormônios. A terceira proteína identificada foi a ARP, é uma proteína reprimida por auxina durante o desenvolvimento do fruto, dormência de gemas, e ativada durante o ataque de nematoides. Assim essas interações obtidas por ensaios *in vivo* indicam que essas proteínas são prováveis componentes de vias de sinalização de resposta a estresse biótico, podendo atuar modulando positivamente ou negativamente a atividade de GmbZIP105.

## ABSTRACT

SOUZA, Gilza Barcelos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Identification of proteins that interact with the transcription factor GmbZIP105 of soybean (*Glycine max*)**. Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-adviser: Murilo Siqueira Alves

Plants are sessile organisms capable of recognizing and attack various pathogens . Foreign organisms recognition or effectors released by them results in Pathogen-Associated Molecular Patterns -triggered immunity or effector-triggered immunity. In response to recognition of the host plant pathogens activate complex signaling pathways of defense, which are often mediated by plant hormones such as auxin, salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA) and ethylene giberilinas (ET). Other important components of defense pathways are transfators. The bZIP family members have reported some for being responsive to biotic and abiotic stresses, however, few interactions between proteins that modulate these transfatores are known. Some genes bZIPs groups of *C Arabidopsis thaliana* and their orthologs are reported in response to biotic stress. Considering similarity of structure with these genes, and are responsive to hormones and biotrophic fungus soybean believe that the bZIP 105 gene has an important role in signaling pathways in response to biotic stress. The objective of this study was to identify proteins that interact with GmbZIP105 two-hybrid assays in yeast using transfator as bait to obtain cDNAs targets in soybean subjected to different stresses library. Three proteins that interact with GmbZIP105 for screening soybean library were identified: uncharacterized protein soybean, asparagine synthetase and auxin repressed protein (ARP). The uncharacterized protein there are no reports about their conserved domains and their biochemical function. Asparagine synthetase protein is described to be responsive to infection by pathogens and treatment with hormones. The third protein was identified a ARP, is a protein repressed by auxin during fruit development, bud dormancy, and activated during the attack nematode. These interactions obtained by in vivo assays indicate that these proteins are likely components of signaling pathways in response to biotic stress, can act positively or negatively modulating the activity GmbZIP105.

## I. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução as plantas desenvolveram mecanismos básicos de defesa contra a invasão de patógeno: a Imunidade Desencadeada por PAMPs (PTI) e a Imunidade Desencadeada Por Efetores (ETI) (Jones e Dangl., 2006). Diferentes cascatas de sinalizações são ativadas por esses mecanismos basais de defesa vegetal, e resultam em reprogramação transcricional. Os produtos desses genes ajudam a planta hospedeira a adaptar-se ou superar as condições adversas (Mahajan e Tuteja, 2005).

Os fito-hormônios vegetais constituem um componente importante da defesa das plantas contra estresse biótico, entre eles podemos destacar: auxinas, SA, JA, giberilinas, ABA e ET (Verhage et al., 2010). Essas diferentes vias de sinalização mediadas por fito-hormônios podem interagir de forma antagônica ou sinérgica, proporcionando assim maior flexibilidade de resposta a uma gama patógenos (Glazebrook, 2005; Verhage et al., 2010; Pieterse et al., 2012; Xin e He, 2013).

A sinalização defesa mediada por JA é dividida em dois ramos, dependendo do organismo invasor: o primeiro ramo é mediado pelo transfator Octadecanoi Responsive Arabidopsis 59 (ORA59) que juntamente com a sinalização de ET, promovem a resistência contra patógenos necrotróficos, e o outro é mediado pelo transfator Jasmonate insensitive 1/MYC2 (JIN1/MYC2) e atua em resposta de defesa contra herbívoros (Dombrecht et al., 2007; Verhage et al., 2011).

As auxinas são fito-hormônios envolvidos principalmente no crescimento e desenvolvimento vegetal, mas recentemente foi relatado por atuar durante as interações planta-patógenos (Verhage et al., 2010; Multka et al., 2013). Esse fito-hormônio exerce papel positivo na regulação de resposta de defesa à patógenos necrotróficos (Gonzales-Lamothe et al., 2012; Qi et al., 2012;). Mas, parecem promover a susceptibilidade à patógenos biotróficos e hemibiotróficos. Em contrapartida, a planta por sua vez, desencadeia a sinalização de SA que é capaz de reprimir a sinalização de auxina, promovendo resistência a patógenos biotróficos (Wang et al., 2007).

Além dos fito-hormônios muitas proteínas atuam nas vias de sinalização de defesa, como por exemplo, os fatores de transcrição ou transfatores. Os transfatores são capazes de se ligarem aos *cis*-elementos presente nos promotores de genes alvos, resultando na ativação ou repressão da atividade transcricional (Udvardi et al., 2007). As seis principais famílias envolvidas em resposta de defesa são: *basic leucine zipper containing domain proteins* (bZIP), proteínas que contém uma ou duas regiões com a sequência WRKYGQK (WRKY), *myelocytomatosis related proteins* (MYC), *myeloblastosis related proteins* (MYB), *Apetala2/Ethylene-Responsive Element Binding Factors* (AP2/EREBP) e *no apical meristem* (NAM), *Arabidopsis transcription activation factor* (ATAF), and *cup-shaped cotyledon* (CUC), e também denominado NAC (Alves et al., 2014).

A família de transfatores que contém o domínio bZIP é uma das maiores famílias em eucariotos, e nas plantas, essas proteínas regulam genes de resposta ao estresse abiótico, maturação das sementes, desenvolvimento floral e defesa contra patógenos (Jakoby et al., 2002). Jakoby e colaboradores classificaram as proteínas bZIPs de *Arabidopsis thaliana* (AtbZIPs) em 10 grupos diferentes: A, B, C, D, E, F, G, H, I e S.

A modulação da função dos transfatores através de interações com proteínas reguladoras é um processo crucial para a ativação ou de repressão de vias de transdução de sinal. Algumas proteínas foram relatados por modular a função de transfatores bZIPs de planta, tais como o NPR1 e TGAs (membros da família bZIP que se ligam aos *cis*-elemento TGACGTCA) durante a sinalização de SA em resposta a patógenos biotróficos (Zhou et al., 2000). Outra interação relatada ocorre entre a proteína citosólica LSD1 (*lesions simulating resistance 1*) e o AtbZIP10, resultando na retenção do transfator no citoplasma (Kaminaka et al., 2006).

Considerando a importância da modulação da atividade dos transfatores por proteínas regulatória por meio de interação proteína-proteína, o objetivo desse trabalho é identificar parceiros de interação da proteína GmbZIP105.

## II REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Mecanismos de defesa vegetal contra estresse biótico

As plantas em seu habitat natural interagem com uma vasta gama de patógenos, como por exemplo, vírus, nematoides, oomicetos, fungos e bactérias. Essas interações planta-patógeno podem ser de dois tipos: interações incompatíveis e interações compatíveis. No primeiro caso a planta hospedeira possui genes R que são capazes de reconhecer os efetores microbianos evitando a doença, e nessas circunstâncias o patógeno é denominado avirulento e a planta resistente. Por outro lado, as interações compatíveis resultam no estabelecimento da infecção e ocorrem quando genes de avirulência e/ou gene R estão ausentes, assim tem-se um hospedeiro susceptível e um patógeno virulento (Glazebrook, 2005; Zhang et al., 2007).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos para sobreviverem às adversidades impostas pelos organismos invasores, como por exemplo, PTI e a ETI. A PTI ocorre quando os receptores presentes na superfície da membrana plasmática vegetal reconhecem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), e em determinados casos é suficiente para deter o microorganismo não patogênico (Jones e Dangl).

Entretanto alguns fito-patógenos desenvolveram estratégias para suprimir a PTI, como por exemplo, por meio de efetores secretados no interior da célula vegetal. Em contrapartida, na corrida armamentista da co-evolução, as plantas desenvolveram mecanismos mais sofisticados no qual resultam no reconhecimento direto ou indireto dos efetores patogênicos por meio de proteínas R, resultando na ETI, frequentemente associada com a morte celular programada, no qual restringe a proliferação do patógeno virulento nos tecidos (Jones e Dangl, 2006; Xin e He, 2013). Esses mecanismos de defesa das plantas contra patógenos é denominado esquema em Z e está representado na figura 1 (Jones e Dangl, 2006).

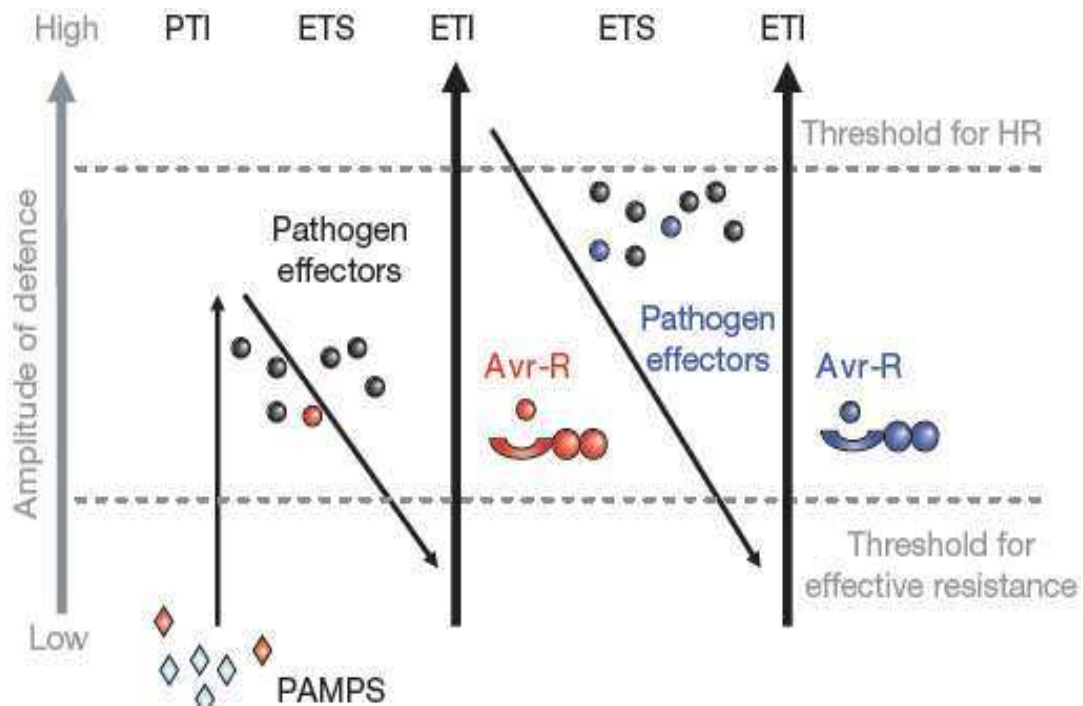


Figura 1- Imunidade da planta representada pelo esquema em Z: Na fase 1, o reconhecimento dos PAMPs (vermelho) pelos PRRs procede em PTI. Na fase dois os patógenos de sucesso conseguem suprimir a PTI, resultando em susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na terceira fase o efector (vermelho) é reconhecido por proteínas R ativando a ETI. Na fase 4 os efetores (em azul) evoluíram, e sendo capazes de suprimir ETI, e conseqüentemente tem-se ETS. A evolução favorece a seleção de novos alelos que codificam proteínas R capazes de reconhecer os novos efetores e assim novamente resulta em ETI (adaptado do artigo Jones e Dangl, 2006).

Os patógenos estão sujeitos, constantemente, à pressão seletiva, alguns desenvolveram estratégias para interferir e muitas vezes impedir a ETI, e conseqüentemente estabelecer a doença (Chisholm et al., 2006). Uma importante estratégia das bactérias fitopatogênicas para suprimir as respostas do hospedeiro vegetal é através dos efetores do tipo III, que são secretados no interior da célula vegetal, e interfere em algum ponto da sinalização de defesa. Um exemplo deste mecanismo de supressão é verificado quando a proteína XopD de *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* promove a realocização do transfator MYB30 de *A. thaliana* para os corpos nucleares, onde ambas as proteínas interagem de maneira específica por meio do domínio HLH (*helix-loop-helix*) de XopD. O efector XopD retém MYB30 nos corpos nucleares impedindo a transcrição de genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) (Raffaele et al., 2000; Canonne et al., 2011). Portanto a

alteração nuclear produzida por XopD é parte de uma estratégia de virulência que permite a bactéria *Xanthomonas* alterar a resposta de defesa da planta e consequentemente estabelecer a infecção (Canonne et al., 2011).

Outro interessante efector é a coronatina, uma fitotoxina produzida pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomato. A coronatina mimetiza o ácido jasmônico- isoleucina (JA-ILE) (Pieterse et al., 2012), e assim é capaz de se ligar ao receptor Coronatine-Insensitive1 (COI1) do fito-hormônio JA, desencadeando toda a via de sinalização subsequente. A coronatina induz a expressão de 3 genes da família NAC (NAM, ATAF e CUC) de fatores de transcrição: ANAC019, ANAC055, e ANAC072. Esses genes são ativados diretamente por MYC2, pois o mutante *myc2* apresenta redução substancial na expressão dos 3 genes. Por sua vez, os genes NACs descritos parecem atuar parcialmente na reabertura dos estômatos pós-infecção, bem como reprimindo o gene que codifica a enzima isocorismato sintase 1 (ICS1) da via de biossíntese de SA e ativando gene SA glicosil transferase 1 (SAGT1) que atua na conjugação desse hormônio. Assim a bactéria manipula componentes de vias de sinalização da planta por meio da coronatina, com consequente inibição da via de defesa mediada por SA do hospedeiro, promovendo o estabelecimento da infecção (Zheng et al., 2012).

Aparentemente a capacidade de secretar efetores no interior da célula vegetal não está restrita apenas as bactérias, pois o efector LxLR (Pi03192) do oomyceto *Phytophthora infestans* é capaz de interagir com dois fatores de transcrição da família NAC no retículo endoplasmático e impedir sua realocização para o núcleo, e consequentemente reprimir a atividade transcricional exercida pelo transfator. Possivelmente, esses transfatores NACs atuam em vias de defesa da célula na resposta a estresse biótico, uma vez que estudos funcionais utilizando Silenciamento Gênico Induzido por Vírus (VIGS) dos genes que codificam esses dois NACs resultam no aumento da susceptibilidade à infecção por *P. infestans*. Por outro lado, o silenciamento do efector Pi03192 em *P. infestans* diminuiu a virulência do oomyceto em *Nicotiana benthamiana* (McLellan et al., 2013).

### **1.1 Vias de sinalização de hormônios na resposta a estresse biótico**

Muitos dos mecanismos de defesa utilizados para minimizar os danos causados pelo estresse biótico envolvem vias de transdução de sinal controlado por fito-hormônios. Os primeiros hormônios descritos por atuar em vias de defesa a estresse biótico foram: SA, JA e ET. Mas recentemente a mesma função também foi atribuída a ABA, giberilinas, e

auxinas (Verhage et al., 2010). JA e ET são descritos por mediarem vias de defesa em resposta a insetos herbívoros e patógenos necrotróficos, parasitas que derivam seus nutrientes de células mortas ou prestes a morrer, enquanto o SA atua em defesas contra os hemibiotróficos e biotróficos, parasitas que requerem células vivas para sobreviver (Glazebrook, 2005; Pieterse et al., 2012; Xin e He, 2013). Interessantemente, as auxinas parecem atuar promovendo a suscetibilidade do hospedeiro na presença de patógenos biotróficos e hemibiotróficos (Zhang et al., 2007; Kidd et al., 2011). Por outro lado, o acúmulo de auxina resulta em resistência contra necrotróficos (Mah et al., 2012; Qi et al., 2012). As diferentes vias de sinalização podem agir de forma antagonista ou sinérgica, proporcionando assim uma flexibilidade de resposta adaptativa da planta a uma variedade de organismos invasores (Verhage et al., 2010). As interações entre as vias mais bem relatadas na literatura são: sinergia entre JA/ET em resposta a necrotróficos e insetos, antagonismo entre JA/SA (Glazebrook, 2005) e SA/Auxina contra biotróficos e hemibiotróficos (Wang et al., 2007).

### **1.1.1 Interações entre as vias de transdução de sinal de ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico**

JA é um importante fito-hormônio vegetal que atua durante a reprodução e em vias de defesa a estresse abiótico e biótico (Katsir et al., 2008). A via de sinalização de JA é desencadeada quando o conjugado bioativo JA-ILE, produzido após o estresse biótico se liga as repetições ricas em leucina dos receptores COI1 de JA, e conseqüentemente promove uma interação específica entre COI1 e a proteína Jasmonate ZIM-Domain (JAZ) (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). COI1 é parte do complexo Skp, Cullin e F-box ( $SCF^{COI1}$ ), e possui um domínio F-box capaz de ubiquitinar JAZ para subseqüente degradação no proteossoma 26S. Mutantes *coi1* apresentam a sinalização de JA bloqueada, pois não são capazes de remover a proteína repressora JAZ, e assim essa mantém-se ligada ao transfator JIN1/MYC2, reprimindo a transcrição de genes responsivos a JA (Chini et al., 2007).

A sinalização de defesa mediada por JA é dividida em dois ramos dependendo do tipo de organismo invasor em questão: o primeiro ramo é mediado pelo transfator Octadecanoi Responsive Arabidopsis 59 (ORA59), enquanto o outro segmento da via é regido pelo transfator MYC2 (Verhage et al., 2011).

A via de defesa a patógenos necrotróficos convergem para integração sinérgica do JA com ET mediada pelo fator de transcrição ORA59 (Verhage et al., 2011). O gene ORA59 é induzido na presença de ambos os hormônios em planta selvagem, e fortemente reprimido nos mutantes com deficiência na sinalização de JA e ET (Verhage et al., 2011; Zarei et al., 2011). Plantas que superexpressam ORA59 apresentam maior resistência ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, em contraste com o mutante RNA de interferência (RNAi) para silenciamento do gene *ora59* que é susceptíveis a esse fungo (Pré et al., 2008; Verhage et al., 2011). O transfator ORA59 liga ao cis-elemento GCC presente no promotor do gene *Plant defensin 1.2* (PDF1.2) ativando sua transcrição (Zarei et al., 2011). O gene PDF1.2 codifica uma defensina de planta, grupo de proteínas que atuam em resposta a diferentes espécies de fungos alterando a permeabilidade da membrana celular, e assim levando a morte (Bart et al., 2002).

O outro ramo da sinalização de JA é orquestrado pelo fator de transcrição MYC2. O transfator MYC2 atua como regulador positivo na resposta a insetos herbívoros, também regula positivamente a tolerância ao estresse oxidativo e biossíntese de flavonoides. Bem como reprimi a transcrição de genes relacionados ao metabolismo de triptofano e alongamento de raízes (Dombrecht et al., 2007). Esse transfator tem papel central na via de resposta a insetos herbívoros, pois plantas mutantes MYC2 (*jin1-1*, *jin1-2*, *jin1-7* e *jin1-10*) infestadas com larvas do inseto herbívoro *Pieris rapae* apresentam redução significativa nos níveis de mRNA de *Vegetative Storage Protein 2* (VSP2), enquanto em plantas selvagens a expressão do mesmo gene é elevada sob condição de herbivoria, evidenciando o controle positivo exercido pelo transfator sobre a expressão do gene VSP2 (Verhage et al., 2011). O gene VSP2 codifica proteína com atividade de fosfatase ácida que tem propriedade anti-inseticida, o alvo exato dessa enzima no inseto ainda não está claro (Liu et al., 2005).

Além do sinergismo relatado entre JA/ET em resposta a patógenos necrotróficos, existe também o antagonismo entre SA/Auxina e SA/JA. SA reprime a sinalização de auxina estabilizando o repressor *Auxin/Indole-3-acetic acid* (AUX/AIA) de genes responsivos a auxina (Wang et al., 2007), entretanto parece não agir de forma semelhante no antagonismo sobre a sinalização de JA, ou seja, SA não estabiliza as proteínas JAZ, bem como não interfere nos componentes do complexo SCF<sup>COI1</sup>. SA atua sobre os cis-elemento GCC-box do promotor dos genes responsivos a JA via fator de transcrição ORA59. O mecanismo exato de como SA interfere no transfator ORA59 ainda não está claro, mas pode-se especular que provavelmente induz alguma modificação pós-

transcricional, como por exemplo, a ubiquitinação com subsequente degradação no proteassoma (Van der Does et al., 2013).

O Antagonismo SA/JA pode ser observado em plantas selvagens tratadas com SA e metil-jasmonato (MeJA), onde a expressão PDF1.2 é suprimida, entretanto em mutantes com deficiência na sinalização de SA (nahg, npr1-1, npr1-2 e quadruplo mutantes tga2-1/tga3-1/tga5-1/tga6-1) a transcrição de PDF1.2 é induzida por MeJA. Curiosamente determinadas concentrações de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor do fito-hormônio ET, é capaz de neutralizar o efeito antagônico de SA sobre a expressão de genes promovida por JA (Leon-Reyes et al., 2010).

### **1.1.2 Interação entre vias de sinalização de ácido salicílico e auxina**

Auxinas são fito-hormônios envolvidos principalmente no crescimento e desenvolvimento vegetal, e mais recentemente foi relatada sua ação durante as interações planta-patógeno (Verhage et al., 2010; Multka et al., 2013). São produzidos nos tecidos meristemáticos, incluindo parte aérea e ápices das raízes, e são transportados via floema (transporte não polar) ou célula a célula por meio de proteínas de transporte presente na membrana plasmática (transporte polar de auxina- PAT) para tecidos alvo (Kidd et al., 2011; Mah et al., 2012).

A sinalização de auxinas é desencadeada quando o fito-hormônio se liga a uma repetição rica em leucina na região C-terminal do receptor *Transport inhibitor response 1* (TIR1). A auxina atua como uma cola molecular promovendo a interação entre TIR1/ABF e AUX/AIA, sendo que após a interação a porção F-box do receptor TIR1 (Dharmasiri et al., 2005) adiciona uma cadeia de poliubiquitina em AUX/AIA marcando-o assim para a degradação no proteassoma 26S (Maraschin et al., 2009). Com a degradação da proteína AUX/AIA os genes responsivos a auxina são expressos, pois AUX/AIA atua como um repressor transcricional quando interage com os *auxin responsive factors* (ARFs) (Mockaitis e Estelle, 2008; Robert-Seilaniantz et al 2011).

Estudos recentes evidenciam que a auxina promove a resistência a patógenos necrotróficos, como por exemplo, o fungo *Alternaria brassicicola* (Qi et al., 2012), *Macrophomina phaseolina* (Mah et al., 2012), e *Botrytis cinerea* (Gonzalez-Lamothe et al., 2012).

Análises de transcriptoma de raízes de *Medicago truncatula* infectadas com o fungo *Macrophomina phaseolina* mostraram que os genes Gretchen Hagen 3 (GH3) envolvidos na homeostase de auxina, e no transporte polar de auxina Pin-Formed (PIN9), Auxin Efflux Carrier (AEC) são diferencialmente expressos durante a infecção. Bem como os genes Auxin Response Factor 4 (ARF4), Aux/IAA Repressor 30 (IAA30) e Aux/IAA Repressor 20 (IAA20) envolvidos na sinalização de auxina foram induzidos 24 horas pós-inoculação (Mah et al., 2012).

Plantas de *Arabidopsis* infectadas com o fungo necrotrófico *A. brassicicola* apresentaram aumento substancial na expressão de genes relacionados à biossíntese de auxinas: Anthranilate Synthase Alpha Subunit (ASA1), Anthranilate Synthase Beta Subunit 1 (ASB1), Cytochrome P450, Family 79, Subfamily B, Polypeptide 2/3 (CYP79B2 e CYP79B3) e consequentemente resultou no aumento do conteúdo de AIA livre (Qi et al., 2012). Plantas de *Arabidopsis* mutantes para os genes *asa1-1*, *cyp79b2/b3* e *axr2-1* (Auxin Resistent 2) são mais susceptíveis a infecção pelo fungo necrotrófico. Assim esses resultados sugerem que a via de sinalização de auxina exerce uma papel positivo na regulação na resposta de defesa à *A. brassicicola* (Qi et al., 2012).

Além da regulação dos genes relacionados as vias de biossínteses de auxina, a regulação de enzimas que controlam a homeostase da auxina é de grande importância para a resposta de defesa das plantas em condições de estresse biótico, e nessas circunstâncias as enzimas de conjugação de auxina GH3, também denominada ácido indol-3-acético amido sintetase representa um papel de destaque (Ding et al., 2008). Essa enzima atua conjugando a auxina AIA com aminoácidos, geralmente aspartato e alanina, tornando-a inativa. A conversão da auxina em uma forma inativa (AIA-Asp) contribui para a susceptibilidade de plantas de *Arabidopsis* selvagens à *Botrytis cinerea*. Por outro lado, mutantes *gh3-2* apresentam menor conteúdo de AIA-Asp e maior resistência ao fungo (Gonzalez-Lamothe et al., 2012).

A forma conjugada da auxina AIA-Asp também contribui para a susceptibilidade de plantas de *Arabidopsis*, tabaco (*N. benthamiana*) e tomate (*Solanum lycopersicum* cv MoneyMaker) ao hemibiotrófico *P. syringae* (Gonzalez-Lamothe et al., 2012). Portanto a via de sinalização de auxina parece contribuir para a resistência de *Arabidopsis*, tomate e tabaco ao hemibiotrófico, entretanto esse dado é conflitante com alguns relatos da literatura no qual a auxina promove a susceptibilidade a *P. syringae* (Mutka et al., 2013).

Plantas mutantes de arroz superexpressando o gene GH3-8 apresentam maior resistência a infecção por bactérias *Xanthomonas oryzae* e ao fungo hemibiotrófico

*Magnaporthe grisea*. A resistência é devida a conversão do excesso de AIA na forma inativa, e consequentemente resulta no bloqueio da sinalização de auxina (Ding et al., 2008; Fu et al., 2011; Kidd et al., 2011). Os genes de biossíntese de expansinas são induzidos por auxina (Ding et al., 2008). As expansinas atuam enfraquecendo a parede celular vegetal e consequentemente promovendo a expansão celular, o que no caso de organismos biotróficos e hemibiotróficos contribui para sobrevivência no tecido hospedeiro, pois esses organismos requerem, pelo menos por um determinado tempo, células vivas para sobreviver (Ding et al., 2008). Todavia a auxina parece promover a susceptibilidade a determinados organismo biotróficos e hemiotróficos, assim para se defender contra esses parasitas as plantas desencadeiam a cascata de sinalização mediada por SA (Glazebrook, 2005; Pieterse et al., 2012). Nesta circunstância tem-se uma importante interação entre duas vias de sinalização que agem de maneira antagônica. O SA inibe a sinalização de auxina por meio da repressão na transcrição do gene TIR1, e consequentemente ocorre uma redução na degradação do repressor Aux/AIA via proteassoma, pois tratamento com SA resultou em aumento drástico desse repressor detectado com um anticorpo contra AXR2/AIA7 (Wang et al., 2007).

## **1.2 Família de fatores de transcrição bZIPs**

Os transfator são proteínas capazes de se ligarem a sequências específicas no DNA resultando na ativação ou repressão de genes alvos (Udvardi et al., 2007). A família dos transfatores bZIPs é encontrada em todos os eucariotos, e em plantas atuam em diferentes processos fisiológicos tais como desenvolvimento de flores, maturação de sementes, e estresse abiótico e biótico (Jakoby et al., 2002). O motivo bZIP presente nessa família caracteriza-se por possuir um domínio de ligação ao DNA formado por duas estruturas em forma de alfa hélice: a primeira é composta por uma região básica que contém um sinal de localização nuclear seguida por um motivo N-x7-R/K; a outra região é rica em leucina espaçados regularmente em intervalos de seis aminoácidos, localizados exatamente 9 resíduos de aminoácidos antes do C-terminal, criando assim uma hélice anfipática. Para se ligar ao DNA duas subunidades se ligam por meio de interações hidrofóbicas formando homodímeros e heterodímeros, dando origem ao zíper de leucina (Schutze et al., 2008).

Em *Arabidopsis* os 75 genes bZIPs (AtbZIP) descritos foram separados em dez grupos de acordo com a similaridades da sequência da sua região básica: A, B, C, D, E, F, G, H, I e S (Jakoby et al., 2002). Alguns membros desses grupos ou ortólogos desses genes estão relacionados a resposta a estresse biótico.

Os representantes (AtbZIP9, AtbZIP10, AtbZIP25 e AtbZIP63) do grupo C de *A. thaliana* possuem sítios para fosforilação conservados que regulam a translocação nuclear e a ligação ao DNA, bem como um zíper de leucina extenso o qual é responsável pela dimerização (Jackoby et al., 2002; Kaminaka et al., 2006). Os genes bZIPs de outras espécies possuem estruturas relacionadas aos membros do grupo C: Opaque2 de milho, CPFR2 de salsa (*Petroselinum crispum*), BZI1 de tabaco e SBZ1 e G/HBF1 de soja (*G. max*) (Alves et al., 2013). Os representantes desse grupo atuam principalmente no desenvolvimento da semente e defesa a patógenos (Jackoby et al., 2002).

O fator de transcrição bZIP10 de *Arabidopsis thaliana* é um regulador positivo de morte celular programa em resposta ao ataque do oomiceto biotrófico *Hyaloperonospora parasitica*, visto que plantas mutantes de *Arabidopsis* que superexpressam AtbZIP10 são mais resistentes a esse biotrófico (Kaminaka et al., 2006).

O fator de transcrição bZIP de soja G-box/H-box binding factor 1(G/HBF1) é fosforilado pela G/HBF1 cinase que é ativa na presença de elicitores e patógenos. A fosforilação do transfator possibilita a ligação ao DNA. G/HBF1 é capaz de se ligar aos cis-elementos CACGTG (G-Box) e TCACCTACCCTA (H-BoxIII) do promotor do gene CHS15, promovendo assim a ativação da transcrição desse gene em resposta a estresse biótico (Droge-Laser et al., 1997). O gene CHS15 codifica chalcona sintase, enzima chave na via de biossíntese de fenilpropanoides, compostos relatados por atuar em mecanismos de defesa a estresse biótico (Dão et al., 2011). Mas recentemente foi descrito outra proteína bZIP de soja (SBZ1) capaz de se ligar ao promotor dos genes CHS1 e CHS7 de soja, entretanto ao contrário de G/HBF1 a atividade de ligação ao DNA de SBZ1 não é regulada por fosforilação, embora possui sítio de fosforilação na região N-terminal (Yoshida et al., 2008). BZI1 é transfator bZIP de *N. tabacum* que apresenta 97% de identidade de sequência de DNA com G/HBF1. BZI1 é capaz de se ligar aos cis-elementos G-box de CHS *in vitro*, entretanto a superexpressão do transfator não altera a expressão de gene CHS, assim ao contrário dos bZIPs de soja relatados, BZI1 não é um regulador da via de fenilpropanoides (Heinekamp et al., 2002).

O grupo D também é relado em resposta a patógenos, além de atuar durante o desenvolvimento vegetal (Jakoby et al., 2002). A esse grupo pertencem a subfamília TGA (AtbZIP47/TGA1, AtbZIP20/TGA2, AtbZIP22/TGA3, AtbZIP57/TGA4, AtbZIP26/TGA5, AtbZIP15/TGA6) em tabaco e *Arabidopsis*. Os TGAs juntamente com SA ativam genes relacionados a defesa e resistência sistêmica adquirida (SAR) (Schutze et al., 2008).

O gene bZIP de pimenta (*Capsicum annum*) (CabZIP1) possui sequência similar com HY5 do grupo H de *A. thaliana* (Alves et al., 2013), entretanto HY5 parece atuar durante a fotomorfogênese das sementes (Jakoby et al., 2002), enquanto CabZIP1 é fortemente induzido pela infecção de *X. campestris* pv. *Vesicatoria* e elicitores biótico (ET, SA e MeJA) em folhas de pimenta (Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b). O transfator CabZIP1 é capaz de se ligar ao cis-elemento G-box presente no promotor do gene CaPR-1, e provavelmente é capaz de ativar esse gene pois a expressão ortólogo NbPR-1 é aumentada quando CabZIP1 é superexpresso de forma transiente em folhas de *N. benthamiana* (Lee et al., 2006 a). A superexpressão do gene CabZIP1 em *arabidopsis* reduz o crescimento das plantas, mas por outro lado os mutantes são mais resistentes ao crescimento de *P. syringae* pv. *tomato*, seca e salinidade, sugerindo que CabZIP1 pode atuar em resposta a estresse biótico e abiótico (Lee et al., 2006). Portanto o fator de transcrição CabZIP1 parece atuar promovendo a interação entre a sinalização de SA e ET, bem como resposta a estresse biótico e abiótico (Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b).

VvbZIP23 é um fator de transcrição da família bZIP de uva (*Vitis vinifera*) que apresenta alta similaridade com AtbZIP23 que pertence ao grupo F de *A. thaliana* (Jakoby et al., 2002; Tak e Mhatre 2012). VvbZIP23 foi identificado como um importante regulador em resposta a estresse abiótico e biótico, sua expressão foi fortemente induzida por seca, salinidade, frio, ABA, ET, JA e SA. A indução de VvbZIP23 provavelmente está diretamente correlacionada a presença de vários *cis*-elementos responsivos a estresse na região 5' do gene VvbZIP23 (Tak e Mhatre 2012).

O grupo S é o maior grupo em *A. thaliana* (AtbZIP1, AtbZIP2, AtbZIP3, AtbZIP4, AtbZIP5, AtbZIP6, AtbZIP7, AtbZIP8, AtbZIP11, AtbZIP42, AtbZIP43, AtbZIP44, AtbZIP48, AtbZIP53, AtbZIP58, AtbZIP70 e AtbZIP75), mas apenas o AtbZIP11 foi analisado em detalhe, sendo sua transcrição induzida pela luz (Rook *et al.*, 1998, Jakoby et al., 2002). Uma característica importante desse grupo é a capacidade de formar heterodímeros com membros do grupo C, provavelmente devido a presença do domínio zíper longo encontrado nesses bZIPs (Jakoby et al., 2002; Ehlert et al., 2006).

### 1.3 Interação entre proteínas em vias de sinalização

Muitos fatores de transcrição estão diretamente relacionados com respostas a estresses, visto que controlam a expressão de genes que participam de vias de sinalização que levam a tolerância a essas condições adversas. Algumas famílias de fatores de transcrição de plantas possuem papel fundamental em vias moleculares de defesa da planta, são elas: bZIP, ERF, MYB, MYC, NAC, WRKY (Eulgem 2005). Transfatores destas famílias interagem com diversas proteínas que atuam modulando a atividade de controle transcricional do transfator. Entre as famílias menos estudadas com relação as interações em vias moleculares de defesa das plantas, a família bZIP apresenta um menor número de interações relatadas na literatura, sendo que são conhecidas as interações NPR1/TGA, LSD1/AtbZIP10 e BZI1/ANK1.

Um dos exemplos de interação mais bem elucidado é da proteína NPR1 com as proteínas TGA's (membros da família bZIP que se ligam a *cis*-elemento TGACGTCA). O hormônio vegetal SA é liberado no citoplasma após ataque de patógenos biotrófico resultando na alteração da condição redox e com consequente liberação de monômeros de *Nonexpressor of Pathogenesis-Related 1* (NPR1) que posteriormente será translocado para o núcleo, onde interage de forma específica com membros da subfamília TGA por meio do domínio de repetição de anquirina (Zhou et al., 2000). A acumulação nuclear de NPR1 resulta no aumento da expressão de genes Pathogenesis-Related 1 (PR1) relacionados com a defesa sistêmica da planta (Kinkema et al., 2000). Na ausência de NPR1 praticamente toda reprogramação transcricional induzida por SA é bloqueada (Fu et al., 2012). Após a ativação transcricional mediada por NPR1 a enzima E3 ligase *cullin 3* liga-se a NPR1. E3 é capaz de ubiquitinar NPR1 marcando-o para posterior degradação pelo complexo do proteassoma (Spoel et al., 2009). Plantas mutantes *cul3acul3b* apresentam acúmulo de NPR1 e expressão constitutiva de genes relacionados a SAR (genes PR1, PR2 e PR5). Plantas triplo mutantes, *cul3a cul3b npr1*, não são capazes de expressar esses genes marcadores, sugerindo que a expressão é dependente de NPR1 (Spoel et al., 2009). NPR3 e NPR4 são parálogos de NPR1 e parecem atuar como adaptadores para atuação de *Cullin 3*, visto que plantas duplo mutante, *npr3npr4*, apresentam acúmulo de NPR1 no núcleo. Assim NPR3/NPR4 media interação entre NPR1 e *Cullin 3* na presença de SA para promover a constante degradação de NPR1 no

proteassoma, após a ativação transcricional promovida por TGA (Spoel et al., 2009; Fu et al., 2012).

Outra interação relatada na literatura ocorre entre AtbZIP10 e a proteína citosólica *Lesions Simulating Disease Resistance 1* (LSD1). Em *A. thaliana*, o fator de transcrição AtbZIP10 é um importante regulador positivo de defesa basal e morte celular induzido por espécies reativas de oxigênio (ROS). A interação ocorre no citoplasma entre a região C-terminal de AtbZIP10 e a LSD1. A região C-terminal é menos conservada entre membros do grupo C, assim especula-se que essa divergência é a base molecular da interação, visto que LSD1 não é capaz de interagir com AtbZIP63, AtbZIP25 ou PcCPRF2 que também pertencem ao grupo C (Kaminaka et al., 2006).

O fator de transcrição de *N. tabacum* BZI1, quando supreexpresso em plantas de tabaco com deleção no domínio N-terminal afeta a sinalização de auxina e defesa à patógenos, evidenciando a importância dessa região para a função desse transcritor. O fragmento interno que codifica os domínios D1 e D2 fusionados com o domínio de ligação ao DNA de GAL4 para ensaios de duplo híbrido em leveduras resultou no isolamento de um cDNA que codifica a proteína ANK1 de *N. tabacum*. Analisando a estrutura de ANK1 pode-se observar a presença no domínio C-terminal de quatro repetições de ankirina, que são descritas por estar envolvidas em interação proteína-proteína. Considerando que BZI1 está envolvido em sinalização de auxina e estresse biótico, foi analisada a alteração no nível transcricional de ANK1 sob esses mesmos estímulos. Assim, infecção com *P. syringae* resulta em uma diminuição transitória no nível de transcrição ANK1, entretanto nenhuma alteração na transcrição de ANK1 foi observada quando as plantas foram tratadas com auxina, assim a transcrição de ANK1 responde especificamente a patógenos (Kuhlmann et al., 2003).

Os bZIP são capazes de interagir com membros de outras famílias de fatores de transcrição (Hartmann et al., 2005) ou até mesmo com outros bZIPs, neste caso formando homodímeros ou heterodímeros para regular a expressão gênica (Schutze et al., 2008). Os membros dos grupos C e S de *A. thaliana* são capazes de formar heterodímeros. As interações mais fortes foram observadas entre representantes de C e S1. Também foram identificadas algumas interações mais fracas entre membros do grupo S2 (AtbZIP42/AtbZIP58), grupo C (AtbZIP 10/AtbZIP63) e grupo S1 (Atb-ZIP53/AtbZIP11). A estrutura do domínio ZIP é muito importante para a dimerização, visto que mutações nessa região inibem interações (Shen et al., 2007). Interessante ressaltar que todos os representantes dos grupos S1 e C possuem um domínio ZIP longo (Jakoby et al., 2002;

Ehlert et al., 2006). Por outro lado, membros dos grupos S2 e S3 que não são capazes de interagir com bZIP do grupo C, possuem prolina e múltiplos resíduos de glicina nas últimas repetições em domínio ZIP reduzido (Ehlert et al., 2006). AtbZIP 34 e AtbZIP61 (grupos E) não são capazes de interagir em ensaios de duplo híbridos de leveduras formando homodímeros, entretanto quando ocorre uma mutação alterando um resíduo de prolina por um resíduo de alanina ambas as proteínas são capazes de formar homodímeros (Shen et al., 2007).

Nosso grupo de pesquisa identificou uma proteína bZIP da classe C (GmbZIP105) que é fortemente induzida por hormônios SA e MeJA e por infecção do fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, agente causador da ferrugem asiática da soja (Alves., 2013). Esse transfator tem estrutura similar às proteínas G/HBF1, SBZ1 e BZI1, já descritas na literatura como responsivas a estresse biótico (Droge-Laser et al., 1997; Heinekamp et al., 2002; Yoshida et al., 2008). Visto a importância das interconexões entre as vias de sinalização de defesa das plantas mediadas pelos diferentes hormônios (SA, JA, ET e Auxinas), bem como o papel decisivo da modulação da função de reguladores transcricionais a partir de interações proteína-proteína no funcionamento correto destas vias, este trabalho teve como objetivo principal identificar proteínas que interagem com a proteína GmbZIP105.

### III. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas que interagem com a proteína GmbZIP105.

#### 1 Metas específicas

1. Clonar o gene de soja que codifica o fator de transcrição GmbZIP105 em vetores de expressão em leveduras, para ensaios de duplo-híbrido.
2. Transformar e expressar o gene GmbZIP105 em leveduras, analisando sua capacidade de transativação.
3. Identificar proteínas que interagem com a proteína GmbZIP105 através de triagem pelo sistema de duplo-híbrido de leveduras.
4. Sequenciamento e análises de bioinformática dos cDNAs isolados na triagem.

## IV MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Identificação e clonagem do gene de soja que codificam para transfator da família bZIP relacionados com a resposta a patógenos

Uma busca textual foi realizada banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação de transfatores já documentados por estarem envolvidos na defesa contra patógenos em especial à ferrugem de diferentes espécies. Os textos “*transcription factors*”, “*rust*”, “*pathogen*” e “*soybean*” foram combinados de maneira a buscar as proteínas de interesse.

Após a identificação dos genes utilizou-se ferramentas do pacote CLC Main Workbench para um alinhamento acurado entre as sequências de transfatores bZIP de soja e as sequências mineradas pelo NCBI comprovadamente ligadas à defesa contra patógenos e ferrugem. Para o alinhamento foram utilizados os parâmetros padrões do programa (gap open cost de 10; gap extension cost de 1). Cladogramas foram construídos utilizando o algoritmo Neighbor Joining e 100 repetições para visualização das similaridades dos genes. O gene selecionado foi GmbZIP105, e sua sequência foi utilizada para o desenho de primers para clonagem (tabela 1).

Tabela 1- Oligonucleotídeos específicos utilizados para clonagem do gene GmbZIP105 e *primer* que flanqueia a região da biblioteca de cDNA no vetor pEXPAD502.

Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'
PEXPAD Fw	CGGTCCGAACCTCATAACAACCTC
PEXPAD Rv	GTAAATTTCTGGCAAGGTAGAC
GmbZIP10 5Fw	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAATGAAATTCAAATACT
GmbZIP105 Rv	AGAAAGCTGGGTCGCGGCCGCAAGCTTTCAATTAGAA GGAGTTCCAC

O gene GmbZIP105 foi primeiramente clonado em vetores para clonagem de fragmentos de PCR e transferidos para vetores doadores (pDONR201) do sistema Gateway da Invitrogen e posteriormente foi transferido por recombinação por meio da

enzima LR clonase para vetores de expressão em leveduras pDEST32 e pDEST22 para ensaios funcionais. A proteínas expressa em leveduras foi utilizada para ensaios de transativação e duplo híbrido.

## **2. Transformar e expressar o gene GmbZIP105 em leveduras**

Os cDNAs clonados nos vetores de expressão do sistema Gateway foram utilizados para os ensaios de expressão apropriados. Para os ensaios de duplo híbrido foi utilizado o gene clonado nos vetores pDEST22 (GmbZIP105-pDEST22) e pDEST32 (GmbZIP105-pDEST32) foram fusionados ao domínio de ativação da transcrição (AD) e ao domínio de ligação (BD) ao DNA, respectivamente, do fator GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Após a obtenção dos clones eles foram introduzidos em cepas de *S. cerevisiae* AH109 que possuem genes “repórteres” sob o controle do promotor GAL1, para os ensaios de duplo híbrido utilizando o vetor pDEST32.

## **3. Identificação de proteínas que interagem com a proteína GmbZIP105 através da triagem pelo sistema do duplo-híbrido de leveduras**

A triagem de proteínas que interagem com GmbZIP105 foi realizada pelo ensaio de duplo-híbrido de leveduras, por meio de protocolo de triagem sólida. Foi utilizada cepa de leveduras AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ), que é deficiente na produção de leucina (Leu), triptofano (Trp) e uracila (Ura) e possuem os genes repórteres LacZ e HIS3 sob o controle do promotor GAL1. Os transformantes com o vetor pDEST 32-GmbZIP105 foram inoculadas em meio seletivo deficiente em leucina (SD, *Synthetic Dropout*, – LEU) e crescidas durante a noite a 28° sob agitação de aproximadamente 180 rpm. Após o crescimento, todo o conteúdo foi inoculado em meio SD – LEU duas vezes concentrado e mantidas a 28°C sob agitação de 180 rpm até que fosse atingida a D.O. entre 0,4 e 0,6. A cultura foi centrifugada a 8000 rpm, e o *pellet* foi ressuspensionado em água destilada autoclavada para lavagem das células e retirada do meio de cultura. O passo anterior foi repetido por mais duas vezes, sendo que na última vez o *pellet* foi ressuspensionado no mix de transformação. O mix de transformação foi preparado com adição de PEG 50 %, acetato de lítio 1 M, DNA fita

simples de esperma de salmão (ssDNA) e biblioteca de cDNA de soja clonado no vetor pEXPAD502. Após adição do mix de transformação às células, estas foram mantidas em banho-maria 42° durante 50 minutos, sendo realizada uma homogeneização a cada 5 minutos. Após este período, todo o conteúdo foi centrifugado a 8000 rpm e o *pellet* ressuspensionado em água destilada autoclavada para a lavagem das células e retirada total do mix de transformação. Este passo foi repetido por mais duas vezes, sendo que por último o *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura SD – LEU - TRP – HIS e plaqueado em meio SD- LEU-TRP-HIS sólido com 10 mM de 3-amino-triazol (3 AT) e ampicilina 50µg/mL. As colônias positivas foram submetidas ao ensaio para medida da atividade de  $\beta$ -galactosidase em membrana (Dadalto, 2012).

Em paralelo foi realizado também uma triagem em meio líquido, no qual o precipitado foi posteriormente ressuspensionado em 150 mL de meio de cultura SD–Trp – Leu contendo 10 mM de 3AT, além de ampicilina 100 µg/mL e distribuídos em placas *deepwell* (1,5 mL por poço). Após incubação a 28°C e 200 rpm por 72 horas, foi realizada uma diluição de 1:10, utilizando nova placa *deepwell*, que foram mantidas a 28°C e 200 rpm. Após 24 horas, foi realizada uma nova diluição 1:10, as culturas foram novamente incubadas a 28°C por mais 24 horas e tiveram sua D.O600 aferidas em leitor de microplaca (Versa Max – Molecular Devices). As culturas dos poços que apresentaram os maiores valores de D.O. foram plaqueadas em meio SD–Trp –Leu com uma concentração de 3AT de 10mM. As células que cresceram foram inoculadas em meio SD–TRP –HIS líquido contendo 20mM de 3AT, e então submetidas a extração de DNA plasmidial, utilizando o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega). Estas culturas foram inoculadas em placas *deepwell* com concentrações crescentes de 3AT e tiveram seu crescimento observado através da medida da DO600 em leitor de microplaca após 4 dias (Dadalto, 2012).

A interação dos possíveis candidatos foi monitorada pela ativação dos genes repórteres  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*) e imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (*HIS3*). Os transformantes de levedura obtidos durante os ensaios de duplo híbrido, o controle positivo (AH109 com vetores pDEST32- bZIPE2 e pDEST22- bZIPE2), e o controle negativo (AH109 com vetores pDEST32 e pDEST22 vazios) foram crescidos em meio seletivo para marca auxotrófica do respectivo vetor por 72 horas, e a ativação do gene repórter *LacZ* foi avaliada por revelação em membrana de *nylon*, embebida em solução reveladora específica para atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase segundo Clontech 1989.

A prototrofia a histidina foi monitorada por crescimento em meio SD- Leu- Trp- His com adição de concentração de 5mM a 30mM de 3 AT com diluição da cultura em meio SD- Leu- Trp- His 1:1, 1:10 e 1:100 segundo protocolo (manual Clontech 1989).

A biblioteca de cDNA utilizada foi construída anteriormente, utilizando cDNA obtido a partir de RNA extraído da soja (*G. max*) submetida a diversos estresses (Alves *et al.*, 2011).

#### **4. Sequenciamento dos cDNAs isolados**

As culturas que tiveram sua interação confirmada na etapa anterior foram submetidas à extração de DNA plasmidial de leveduras, utilizando o *Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega). O DNA extraído foi utilizado para transformar *Escherichia coli* da linhagem DH5 $\alpha$  por eletroporação. Estas células foram selecionadas em meio contendo ampicilina 50 $\mu$ g/mL. As colônias transformadas foram inoculadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) com 50 $\mu$ g/mL de ampicilina, incubadas por 24h para extração do DNA plasmidial que foi quantificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, confirmada a presença do vetor da biblioteca por meio de PCR com *primer* específico para o vetor pEXPAD502 (tabela 1). Após a confirmação as amostras devidamente liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram enviadas para o sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul).

#### **5. Análises de bioinformática**

As sequências obtidas foram analisadas no programa Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) para eliminar a região correspondente ao vetor pEXPAD-502. Após excluir a sequência referente ao vetor, as sequências foram analisadas pelo programa ORFINDER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) no qual identificou-se se as sequências obtidas estavam em correta janela de leitura (*frame*) com a sequência do vetor.

Os resultados do sequenciamento também foram analisados no programa Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para identificação das proteínas isoladas no duplo híbrido de leveduras, e escolha do menor *E-value* e maior identidade.

As sequências mais similares as das proteínas identificadas foram obtidas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) sendo utilizadas para construção do dendrograma no programa Mega e alinhamento das sequências no programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

## V RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Clonagem do transfator GmZIP105

A proteína codificada pelo gene GmbZIP105 possui 414 resíduos de aminoácidos, sendo que as proteínas bZIPs de outras espécies relacionadas variam de 314 a 450 resíduos de aminoácidos.

O alinhamento da sequência predita para proteína GmbZIP105 com proteínas relacionadas, evidencia a presença de algumas regiões conservadas destacado em preto, essa região corresponde ao zíper de leucina que é conservada entres os membros do grupo C (Jakoby 2002) na figura 2.

GmbZIP105_NP_001237113.1_	MNEIQILIVAITIHKRLDFGMERVLVDE-ISEQYVWAASSSSSSSSSSF	49
GmbZIP89_NP_001237085.1_	-----MDRVFVDD-ISDFWPPPIPVSGANTS-	28
MtOpaque_XP_003626455.1_	-----MERVLVIAE-ITEQYWLT-----SKACKGG	24
NtbZIP_AAL27150.1_	-----MERVFSMEDDIGDFWSTPPTADLGVDSPT	30
G/HBF1_NP_001236299.1_	-----	
PcCPRF2_Q99090.2_	-----MDRVFVVED-ISDQFWSPPAREDS-----	23
AtbZIP63_NP_568508.2_	-----MEKVFSDDEEISGNHHWSVNG-----	20
OsbZIP_BAA36492.1_	-----MERVFSVEE-ISDPFVWPPPPQSAAAAQQ	29
ZmOpaque-2_ACG33567.1_	-----MERVFSMEE-IPNPHYWAPPHD-----QP	22
GmbZIP105_NP_001237113.1_	-----KSKMNRSESEW	60
GmbZIP89_NP_001237085.1_	-----SQMSRSASEW	38
MtOpaque_XP_003626455.1_	-----DTKMNRSDSEW	35
NtbZIP_AAL27150.1_	AAAAVSYSKMNRSSSEWAFQRFLOEATAAGTSTSSPPQPTMTASSSSS	80
G/HBF1_NP_001236299.1_	-----MTASSSSS	8
PcCPRF2_Q99090.2_	-----SKLVMNRSDSEW	35
AtbZIP63_NP_568508.2_	-----MTSLNRSASEW	31
OsbZIP_BAA36492.1_	QGGGG-----VASGGGGVAGGGGGGNAMNRCPSEW	60
ZmOpaque-2_ACG33567.1_	AAGGA-----VAAPGG--VGGGGDAAGAMNRCPSEW	51
GmbZIP105_NP_001237113.1_	AFQQFLQEEAASSSS-----NSDHHDDHHHAKLKESNTNIPVTLH	101
GmbZIP89_NP_001237085.1_	AFQRFIQEASASAPSP-----PSSSSPADVVFVEIDDPKPTPPPPSH	81
MtOpaque_XP_003626455.1_	AFQKFLREQEAEEAE-----AATAKPSSSSTSTSTSSSTVDVNLKIN	78
NtbZIP_AAL27150.1_	SHQNDVWEIKDENLS-----IPNLNPSTALNSKPASSFGLAPPNIA	122
G/HBF1_NP_001236299.1_	SHQNDVWEIKDENLS-----IPNLNPSTALNSKPASSFGLAPPNIA	50
PcCPRF2_Q99090.2_	AFQSFLQASALESS-----QP--LPSDPVAVGDKVKNPVEIPANVP	75
AtbZIP63_NP_568508.2_	AFNRFIQESSAAADD-----GESTTACGVSVSSPNNVP	64
OsbZIP_BAA36492.1_	YFQKFLLEEAVLDSFVPNPSPRAEAGGIRGAGGVVVPVVKQPLSAAATTS	110
ZmOpaque-2_ACG33567.1_	YFQKFLLEEAVLDS---PGPVAGVGRNSGQAGVEAAESKPLGAAPASVS	97
GmbZIP105_NP_001237113.1_	-----VDSQDYHAILKTKLNLACAAMTRG-SLVKSQNP---	135
GmbZIP89_NP_001237085.1_	GGVLPSPDGGVVALDSEEQAFLLKSKLNLACAAMTRG-SLAKSQDPSPF	130
MtOpaque_XP_003626455.1_	N-----SIDSEDYQALLKTKLDLACAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	114
NtbZIP_AAL27150.1_	-----VDSEEQAFLLKSKLNLACAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	160
G/HBF1_NP_001236299.1_	-----VDSEEQAFLLKSKLNLACAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	88
PcCPRF2_Q99090.2_	-----VDSEDYQAYLKSRLDLACAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	112
AtbZIP63_NP_568508.2_	-----VDSEDYQAYLKSRLDLACAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	101
OsbZIP_BAA36492.1_	-----AVVDPVVEYNAMLKQKLEKDLAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	148
ZmOpaque-2_ACG33567.1_	S-----SVVDPVVEYNAMLKQKLEKDLAAMVAKSRG-SLVKSQDP---	136

GmbZIP105_NP_001237113.1	-DSGPQASNFSEVGSHTLKG-----SGPFGNDPSKLNQKD	171
GmbZIP89_NP_001237085.1	SEGGSQPTNPSLVESQTTSTKG-----SIPSEND-PSKLDQDK	166
MtOpaque_XP_003626455.1	-DNQSQPSYPYELGLPLATLKGLEFFGIHICMCLLKCGPSGND-PSKLNQKD	162
NtbZIP_AAL27150.1	HDKGSETASAAQSGSHVSTLG-----SQQE-WAKIQDKD	193
G/HBF1_NP_001236299.1	HDKGSETASAAQSGSHVSTLG-----SQQE-WAKIQDKD	121
PcCPRF2_Q99090.2	LDNGSQASNTSQVWSQVPPKG-----SGHD-LSKEEDKE	145
AtbZIP63_NP_568508.2	SDNGG--ANESEQASLASSKA-----	120
OsbZIP_BAA36492.1	AGSSLLNADVSHIGAPISIGG-----NATPVQNML	178
ZmOpaque-2_ACG33567.1	AAASLPSVDVPHAAPLKPVGG-----TESLVQNML	166
GmbZIP105_NP_001237113.1	TPVDAKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHLTELETQVSQLRSENSSLLRRL	270
GmbZIP89_NP_001237085.1	DPADVKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHLDLELTQVSQLRGENSTLLKRL	264
MtOpaque_XP_003626455.1	NPTDAKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHLTELETQVSELRGENSLLLRRL	252
NtbZIP_AAL27150.1	DPADAKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHLTELETQVSQLRVENSLLLRRL	291
G/HBF1_NP_001236299.1	DPADAKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHLTELETQVSQLRVENSLLLRRL	219
PcCPRF2_Q99090.2	DPDAKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHMTELETQVSQLRVENSLLLRRL	244
AtbZIP63_NP_568508.2	NPTNVKRVRLMLSNRESARRSRRRKQAHLSELETQVSQLRVENSKLMLKGL	197
OsbZIP_BAA36492.1	RPADQRLQRKQKSNRESARRSRRKAHLNLEAQVSQLRVENSLLLRRL	274
ZmOpaque-2_ACG33567.1	NPVQQRQQRKQKSNRESARRSRRKAHLNLEAQVQLRVENSLLLRRL	263
GmbZIP105_NP_001237113.1	TDVSRKYSNAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEETVKKITGLSPMLHAMT-	319
GmbZIP89_NP_001237085.1	TDVSRKYSDSAVDNRVLKADVETLRKVKMAEETVKKITGLNPLLHAMS-	313
MtOpaque_XP_003626455.1	TDVTQKFNNSAVDNRILKADVETLRKVKMAEETVKKITGSPVFNAMS-	301
NtbZIP_AAL27150.1	TDISQKYNAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEETVKKITGLNPLFQAMS-	340
G/HBF1_NP_001236299.1	TDISQKYNAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEETVKKITGLNPLFQAMS-	268
PcCPRF2_Q99090.2	TDISQRYNDAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEETVKKITGLNPMFQSMSS	294
AtbZIP63_NP_568508.2	TDVTQTFNDAVSNRVLKANVETLRKVKMAEETVKKITGFNPMFHNMPQ	247
OsbZIP_BAA36492.1	ADVNRKYNDAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEDSVKKITGMNALFPAAS-	323
ZmOpaque-2_ACG33567.1	ADVNRKYNAAVDNRVLKADVETLRKVKMAEDSVKKITGMNALYPAVS-	312

```

GmbZIP105_NP_001237113.1_  EMSLGLMPLFD-ESPSETSADAAPVQEDPNHHLQPTS----- 357
GmbZIP89_NP_001237085.1_  DISSLGLPSFDGRSPSDTSADAAPVQDDPHHFFYQPTSTNPIPSHDPIV 363
MtOpaque_XP_003626455.1_  EVSSMGMSLFD-GSPSESSADASVPVQEDPNHHPFQPLPNHLMSSHMNG 350
NtbZIP_AAL27150.1_       EISSMVMPYSYS-GSPSDTSADAAPVQDDPKHHYQQPPNNLMPTHDPRI 389
G/HBF1_NP_001236299.1_  EISSMVMPYSYS-GSPSDTSADAAPVQDDPKHHYQQPPNNLMPTHDPRI 317
PcCPRF2_Q99090.2_       EISTIGMQSFS-GSPSDTSADT---TQDGSKQHFYQPAPTSHMPAQDQKI 340
AtbZIP63_NP_568508.2_   IVSTVSLPSETSNSPDTTSSQVTTPEIISS----- 277
OsbZIP_BAA36492.1_      DMSLSMPFNS--SPSEATSDAAVPIQDDPNNYFATNNDIG----- 362
ZmOpaque-2_ACG33567.1_  DMSLSMPFNG--SPSDASDSTVPVQDDLNSYFANPSEIG----- 351

GmbZIP105_NP_001237113.1_  NNGLGG--ISSIETVQQN-VAAVVGGNKMGRTTSLHRVASLEYLQKRIRG 404
GmbZIP89_NP_001237085.1_  NNGLGG--ISSIENVQQN-AAVVLGGNKGQTASLQRFVASLEHL----- 404
MtOpaque_XP_003626455.1_  ANNRSGSIISAESEQN---TPAGGNKIGRTNSLPRVASLEHLQSRIRG 396
NtbZIP_AAL27150.1_       QNGMVD--VPIENVEQNATAAVGGNKGRTTSMQRFVASLEHLQKRIRG 437
G/HBF1_NP_001236299.1_  QNGMVD--VPIENVEQNATAAVGGNKGRTTSMQRFVASLEHLQKRIRG 365
PcCPRF2_Q99090.2_       QNGLLQ--VPPVDNLQHSASGVVEGNKEMERTSSMQRFVASLEHLQKRIRG 388
AtbZIP63_NP_568508.2_   --GNKG-----KALIGCKMNRRTASMRVSVESLEHLQKRIRP 310
OsbZIP_BAA36492.1_      GNNNYMPDIPSSAQEDEDVNGALAAKRIGRPASLQRFVASLEHLQKRMC 412
ZmOpaque-2_ACG33567.1_  GNNAYMPDIASSVQQDDNFVNGYQAAGKMGRTDLSLQRFVASLEHLQKRMC 401

PcCPRF2_Q99090.2_       GVSSCEAQVSGKQ 401
AtbZIP63_NP_568508.2_  VGDQ----- 314
OsbZIP_BAA36492.1_     GPASSGSTS---- 421
ZmOpaque-2_ACG33567.1_  GPASSGSTS---- 410

```

Figura 2- Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos da proteína GmbZIP105 obtido pelo BLAST do NCBI com sequências homólogas: GmbZIP105 de *G. max* (NP001237113.1), GmbZIP89 *G. max* (NP001237085.1), OsbZIP de *Oryza sativa* (BAA36492.1), NtbZIP de *N. tabacum* (AAL27150.1), MtOpaque de *Medicago Medicago truncatula* (XP\_003626455.1), G/HBF1 de *G. max* (NP001236299.1), ZmOpaque-2 de *Zea mays* (ACG33567.1), PcCPRF2 de *Petroselinum crispum* (Q99090.2) e AtbZIP63 de *A. thaliana* (NP568508.2). As regiões conservadas entre essas proteínas estão destacadas em preto.

## 2. Proteínas isoladas na triagem

Com a finalidade de identificar parceiros de interação do fator de transcrição GmbZIP105 foi utilizada em uma biblioteca de cDNA de soja construída no vetor pEXPAD 502 como presa e o pDEST32- GmbZIP105 como isca. Foram obtidos nove clones na triagem sólida, mas apenas três clones cresceram em meio seletivo (SD- leu- Trp- His) até 30mM de 3AT (figura 3A), evidenciando a ativação do gene repórter HIS3. Nenhum clone foi obtido por meio da triagem líquida. Para confirmar a expressão do outro gene repórter foi realizado o ensaio de atividade de  $\beta$ - galactosidase em membrana,

onde foi possível observar a ativação desse gene evidenciado pela coloração azul produzida após a conversão do substrato *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside* (X-gal) em um precipitado de coloração azul (figura 3B)

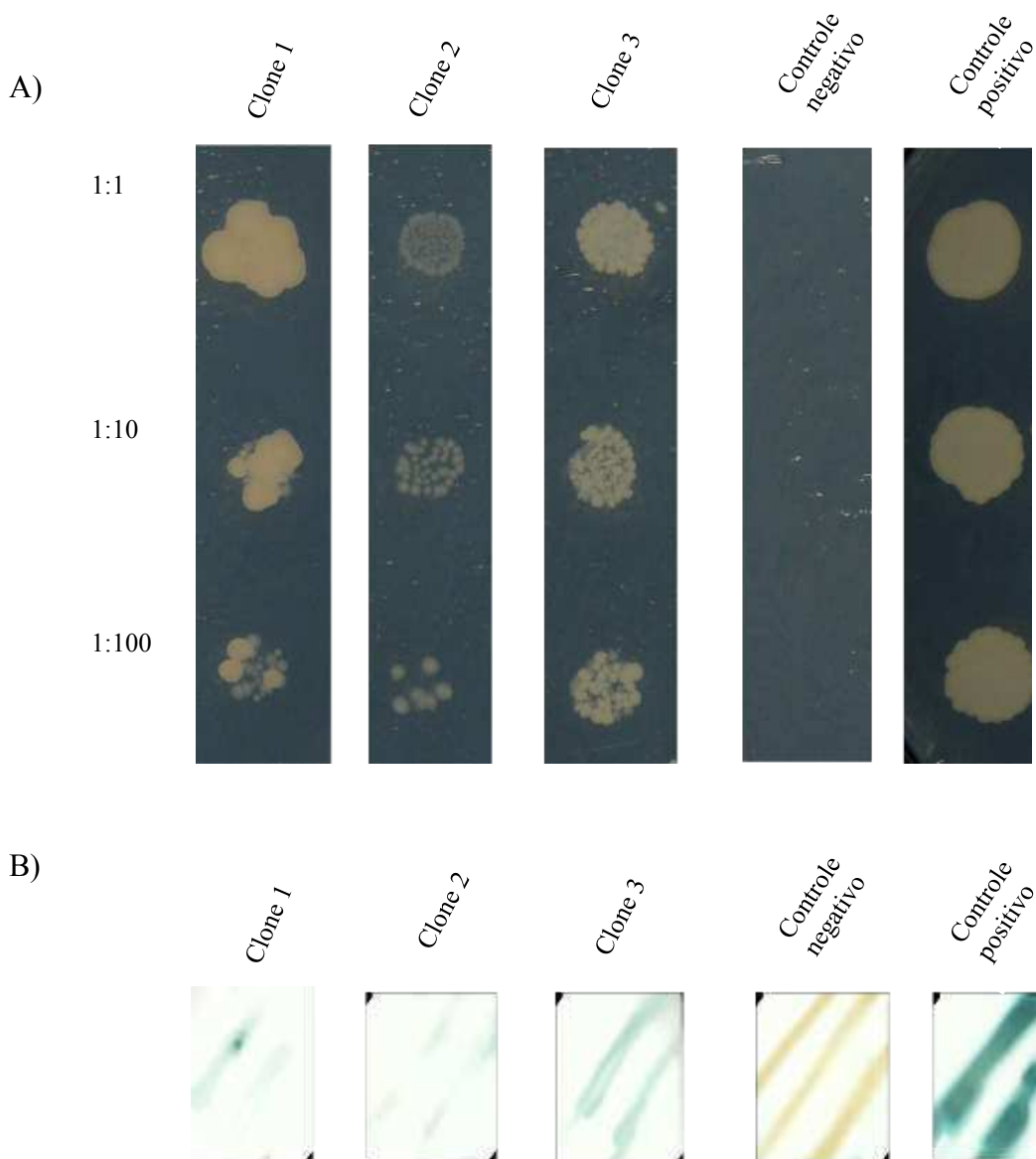


Figura 3- Confirmação da ativação dos genes repórteres: a) Crescimento dos clones positivos (1, 2 e 3) na triagem em meio seletivo deficiente em leucina, triptofano e histidina, suplementado com 25 mM de 3AT. O duplo transformante contendo os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios foi utilizado como controle negativo. A levedura mutante AH109 pDEST22-GmbZIPE2/pDEST32- GmbZIPE2 foi utilizada como controle positivo do ensaio, visto que a proteína GmbZIPE2 apresenta uma forte capacidade de homodimerização em leveduras (dados não publicados). Todos os clones estão nas seguintes diluições 1:1; 1:10 e 1:100. B) Medida qualitativa da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, feita em membrana de nylon.

Esses clones de levedura foram submetidos a extração de DNA plasmidial, e a presença do vetor da biblioteca foi confirmada por meio da reação de PCR com primer específico para o vetor pEXPAD502 bem como do gene GmbZIP105 (tabela 1). O DNA plasmidial foi utilizado para transformação de cepas de DH5 $\alpha$ . E entre as colônias positivas foram selecionados 12 para o sequenciamento.

### 3 Identificação dos clones positivos

Após o sequenciamento do DNA extraído dos clones positivos e análise de sua sequência através do programa BLAST, verificou-se que os cDNAs contidos em cada clone codificam para as seguintes proteínas: clone 1 uma proteína não caracterizada de soja (Glyma04g29490) (figura 4), clone 2 a uma asparagina sintetase (Glyma11g27720) (figura 5) e clone 3 uma proteína denominada *Auxin repressed proteins* (ARP) (Glyma15g08300) (figura 6). A análise do sequenciamento dos clones 1, 2 e 3 demonstrou que ele estavam em *frame* com o domínio AD-GAL4 de ativação transcricional no vetor pEXPAD502, descartando a possibilidade de isolamento de um gene inexistente devido a alteração na ordem de leitura.

#### 3.1 Proteína não caracterizada de *G. max*

O cDNA do clone 1 de levedura codifica uma proteína com 58 resíduos de aminoácidos. Esse polipeptídeo possui domínio e função desconhecido de acordo com as análises nos bancos de dados NCBI e PFAM (figura 4). A proteína desconhecida de soja possui 59% de identidade com a proteína hipotética PHAVU (ESW20930.1) de *P. vulgaris*, 73 % com a proteína hipotética MTR (XP 003598552.1) e 63% com a proteína hipotética MTR (XP 003598551.1), ambas de *M. truncatula*.

```
AAATTCTATTTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGGGTGGGTTCGAT  
CACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGTTCGACCACGCGTCCGGACCCAATATGCTGC  
CAAAGGCAAGTTGAATACCAAAAAATAATCAAATCAGACAGCACTGGGTTTCAAGGAC  
AAAACCTTGCTGTGGAGAAGAAGATATATTTGCAAACATACTACTAATAAATTATAGTAT  
TAAATTGTTTTGGAATTACGATTTCTTGTGAATGTCAATAATTAGGTTAATAAATTGAGT  
GCATTGTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGG
```

Figura 4 O cDNA da proteína não caracterizada (Glyma04g29490.1) clonado no vetor pEXPAD502 foi sequenciado e as sequências de nucleotídeos estão representadas na figura. O provável condon de iniciação está destacado em azul, e os sítios de restrição utilizados na clonagem estão marcados em amarelo (Sall), região marcada em vermelho corresponde a parte da sequência do vetor.

### 3.2 Asparagina sintetase

O clone 2 possuía um cDNA com parte da sequência codificadora da proteína asparagina sintetase (figura 5). A asparagina sintetase é uma enzima presente em procariotos e eucariotos que catalisa a transferência dependente de ATP da amônia para o aspartato resultando em uma asparagina (Gaufichon et al., 2010).

A asparagina sintetase desempenha um papel central no transporte e armazenamento de nitrogênio nas plantas em diferentes fases do desenvolvimento vegetal: mobilização do nitrogênio armazenado nas sementes, reciclagem do nitrogênio e fluxo no tecido vegetativo em resposta a estresse abiótico e biótico (Lam et al., 1998; Gaufichon et al., 2010).

O gene asparagina sintetase 1 (CaAS1) de pimenta (*C.annuum*) é fortemente induzido por *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Xcv), SA, MeJA e ferimentos em folhas de pimenta. Esses dados sugerem que a asparagina sintetase pode estar envolvida em vias de defesa, e a expressão de CaAS1 pode ser regulada por meio da sinalização de SA e MeJA (Hwang et al., 2011). O silenciamento do gene CaAS1 resultou em aumento da susceptibilidade a Xcv. Por outro lado a superexpressão de CaAS1 em *Arabidopsis* resultou em redução da susceptibilidade a *P. syringae* e ao oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* isolado Noco2. Os experimentos mostram que a asparagina sintetase codificada pelo gene CaAS1 é um regulador positivo de defesa basal contra microorganismos (Hwang et al., 2011), entretanto a asparagina sintetase pode atuar também como proteína efetora em vias de defesa.

A interação entre asparagina sintetase com o transfator GmbZIP105 em ensaios de duplo híbrido pode indicar que essa enzima modula de alguma forma a atividade de GmbZIP105 em resposta a estresse em soja.

```
TACAAACATTTAAAACGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGGGTGGGTCTGA  
TCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGTCTGACCCACGCGTCCGCAAATGGTTATATCTGG  
AGAAGGATCTGATGAGATCTTTGGAGGGTATCTATATTTCCACAAGGCACCAAACAAGAAGA  
ATTTTCATCAAGAAACATGCCGCAAGATTAAGCACTCCACAAATATGATTGCTTGCGAGCCAA  
TAAATCGACCTTTGCCTGGGGTCTAGAAGCCAGAGTGCCATTTTTGGACAAAGATTTTATCAG  
AGTTGCAATGAACATTGATCCTGAGTATAAAATGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAGG
```

Figura 5 O cDNA de asparagina sintetase (Glyma11g27720) clonado no vetor pEXPAD502 foi sequenciado e as sequências de nucleotídeos estão representadas na figura. O provável condon de iniciação está destacado em azul. O sítio de restrição utilizado na clonagem está marcado em amarelo (Sall), e região marcada em vermelho corresponde a parte da sequência do vetor.

### 3.3 Proteína reprimida por auxina (ARP)

Verifica-se que a sequência estava completa, contendo sítio de iniciação e terminação de tradução do gene (figura 6). A sequência de nucleotídeos obtida codifica um polipeptídeo de 117 resíduos de aminoácidos. Wood et al. (2013) relataram que os genes da família DMR/ARP geralmente codificam um polipeptídeo de 92 a 155 resíduos de aminoácidos. O que pode ser observado nas espécies de *Pyrus pyrifolia* (Shi et al., 2013), *Robinia pseudoacacia* (Park e Han, 2003) e *Elaeagnus umbellata* (Kim et al., 2007). A sequência de aminoácidos de ARP não possui sinais de localização nuclear nem para organelas (Lee et al., 2013b).

Os genes ARP são relacionados com os genes DMRs que codifica para proteína associada a dormência. Juntos esses genes formam uma superfamília de genes reprimidos por auxina (ARP/DMR). Essa superfamília de proteínas é restrita às plantas superiores o que indica que desempenham papel específico nesse grupo taxonômico. Alguns trabalhos relatam o envolvimento em manutenção da dormência e resposta a estresse biótico e abiótico, entretanto ainda não se conhece a função bioquímica destas proteínas (Rae et al., 2013a).

O gene DMR de *Actinidia deliciosa* (AdeMR1) da família ARP/DMR, pertence a classe das proteínas denominadas intrinsecamente desordenadas, esses polipeptídeos mesmo em condições nativas não possui uma estrutura terciária definida. Essas proteínas estão envolvidas em vários processos fisiológicos: regulação da transcrição e tradução, transdução de sinal e modificação de proteínas (Wood et al., 2013). Devido à estrutura desordenada podem se ligar a múltiplos parceiros, e muitas vezes participam de redes de interação entre proteínas desempenhando funções cruciais (Patil e Nakamura, 2006). A estrutura altamente conservada das proteínas ARP/DMR indica que, provavelmente, outros homólogos de AdeDMR1 também possuem estruturas intrinsecamente desorganizada.

```

AATTCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGGGTGGGTCGATCACAA
GTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGTCGACCCACGCGTCCGACTCACTTTTCATCCTTCGATCAT
ACACTTAGTTGCTTCCAATTAAGATGGTTCTGCTAGAGAAGCTCTGGGATGATGTTGTGGCTG
GCCCTCAACCTGAGCGTGGCCTTGGCAAGCTCAGAAAACCTCACCACCTCAAACTATTGAT
GAAGGAGAAAGTAGCAAGCTGCAGAAGACGTTGTCGATGCCGTCGACACCAACAACCCCGA
TGACTCCGACGACTCCAACGACACCCGGGATCGGCCCGTAAAGCTGACAACGTTTGGAGGAG
CGTCTTCCATCCTGGGAGCAACTCCGCCACAAAGACCATCGGTGCTCAGATGTTTGACAAAC
CACTTCCCAACACTCCCACTGTCTATGACTGGCTGTACAGTGGGGAGACCAGAAGCAGGCAC
CGCTGAAGCTGAAGTCTTTAGCTAAGATGACCGTGGGTGTCATGTAAATATTGTCGTTTTTCGT
TAAGCATCTGCCACGTTTGCAGCTACTATTACTATTATGTGTCGGGAATTTATTGCTCCGTTGCT
GACTCAAACATAATATTACTAGCGTGTGGTTTTTTTGGAGCAAGTGAATGTAAAAATGCTAAA
TAATTCGTTAGTATGCTAAGTTTTGTTAAGCCAGATCTGCCTTGAACCTTTGGCGATTGGTTAATC
TTTTCTCCCTTTGTTAAATGATTAGTATTAATAAATAAATAAATTTTTGTTAAAAAATAAATAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGG

```

Figura 6 O cDNA de ARP (Glyma15g08300) clonado no vetor pEXPAD502 foi sequenciado e as seqüências de nucleotídeos estão representadas na figura. O provável condon de iniciação está destacado em azul, e os sítios de restrição utilizados na clonagem estão marcados em amarelo (Sall), região marcada em vermelho corresponde a parte da seqüência do vetor.

O alinhamento da seqüência de GmARP com outros membros da família DMR/ARP indicou a presença de regiões conservadas na região C- terminal e outro na região N-terminal (destacado em preto na figura 7). A presença de domínio conservados foram previamente relatados no alinhamento de proteína ARPs de pera (Shi et al., 2013) e Brassica rapa L. ssp. pekinensis (Lee et al., 2013), bem como no alinhamento de ARP de Robinia pseudoacacias com seqüências de outras espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Park e Han, 2003). Entretanto a função destes domínios conservados não é conhecido.

GmARP	MVLLERLWDDVVGPRPERGLGKLRKLTTLKTI----DEGESS--KLQKTLSPSTPTTP	54
FvARP	MVLLERLWDDVVGPPERGLGKLRKLTTLKT-----DEGESS--RLQKSLSPNTPTSTP	53
GuARP	--MLEKRWDDVVGPPERGLERLRKLTTSVK-----DEGQGI--KLQRNPSMPSTPTTP	51
SdARP	MVLLERLWDDIVAGPQPERGLGKLRKLVKDD-----GEGSS--KLQRNLSMPTTPTTP	52
EuARP	MVLLDKRWDDVAAGPQESGLGRLRKYTKPSAL-NIKDVEGS--TLQKSMSPASSVTP	57
AtDMR1	MVLLERLWDDVVGPPDRGLGRLRKITQPINIRDIGEGSSSKVVMHRSITMP-AAVSP	59
DMR1.1	MVLLERLWDDVVGPPDRGLGRLRKITQPINIRDIGEGSSSKVVMHRSITMP-AAVSP	59
ClARP	MVLLERLWDDVVGPPDRGLGKLRKIKTKPFILKDLGEGGSK---YQRSMSPASPGTP	57
PsARP	MVLLDRWDDVLAGPQPERGLGKLRKIKTKP---IDVEVEGSKL--YQRSLSMPASPGTP	55
SvARP	MVLIDKRWDDVMAGPSPDKGLGKLRKSLTVQTAGESSGEGSSK---YQRSLSMPASPATP	57
NtARP	MVLIDKRWDDVMAGPSPDKGLGKLRKSLTVQTAGESSGEGSSK---YQRSLSMPASPATP	57
GmARP	MTPTTPTT-----PGSARKADNVWRSVFHPGSNSATKTIGAQMFDKP-LPNTPTVYD	105
FvARP	LTPTTPTT-----PGSGRKADNVWRSVFHPGSNSATKTIGAQMFDKP-LPNTPTVYD	104
GuARP	GTPTTPTT-----PGSARKADNVWRSVFNPGSNSATKSIGAEYFDKP-LPNTPTVYD	102
SdARP	VTPTTPTT-----PVSARKVDNVWRSVFHPGSNAATKTIGAQMFDKP-LPNSPTVYD	103
EuARP	ATPSTPAT-----PGSARK-ENVWRSVFNPGSNLATRGLGTEMFDKPSQPNSTVYD	108
AtDMR1	GTPTTPTT-----PTTARK-DNVWRSVFNPGSNLATRAIGSNIFDKPHTPNSPSVYD	110
DMR1.1	GTPTTPTT-----PTTARK-DNVWRSVFNPGSNLATRAIGSNIFDKPHTPNSPSVYD	110
ClARP	TFVTPPT-----PLTARK-DNVWRSVFNPGSNLATRIGSNVFDKP-QPNSPTVYD	108
PsARP	VIPLTPTAGSPSSVGSPPSVRK-DNVWRSVFNPGSNLATRIGSNVFDKP-QPNSPTVYD	113
SvARP	GTFTPTN-----ISPTVRK-ENVWRSVFHPGSNLATKRIGAEVFDKPSHPNAPTVD	109
NtARP	GTFTPTN-----ISPTVRK-ENVWRSVFHPGSNLATKRIGAEVFDKPSHPNAPTVD	109
GmARP	WLYSGETRSRHR--- 117	
FvARP	WLYSGETRSSHHR--- 116	
GuARP	WLYSGDTRSKHR--- 114	
SdARP	WLYSGETRSKHR--- 115	
EuARP	WLYSGETRSKHR--- 120	
AtDMR1	WLYSGDSRSQHR--- 122	
DMR1.1	WLYSGDSRSQHQWIK 125	
ClARP	WLYSGDTKSQHR--- 120	
PsARP	WLYSGDTRSKHHR-- 126	
SvARP	WLYSGNTRSKHHEKL 124	
NtARP	WLYSGNTRSKHHEKL 124	

Figura 7 Alinhamento múltiplo de sequência de aminoácidos de GmARP com proteínas ARP de outras espécies: GmARP de *G. max* (NP001236920.1), PvARP de *Phaseolus vulgaris* (AGV54274.1), SdARP de *Sesbania drummondii* (ABQ44282.1), GuARP de *Glycyrrhiza uralensis* (ABR15095.1), EuARP de *Elaeagnus umbellata* (AAC62104.2), ClARP de *Citrullus lanatus* subsp. *Vulgaris* (BAI52956.1), PsARP *Paeonia suffruticosa* (ABW74471.1), AtDMR1 (NP564305.1) e DMR1.1 de *A.thaliana* (NP001154378.1), SvARP de *Solanum virginianum* (AAS75891.1) e NtARP de *Nicotiana tabacum* (AAS76635.1). As regiões conservadas estão destacadas em preto.

Análise do agrupamento entre GmARP com outros membros da família DMR/ARP está representado na figura 9. Pode-se observar no agrupamento a formação de quatro grupos. O primeiro grupo é formado GmARPA, PvARP, SdARP, GuARP e EuARP. O segundo grupo é representado por CIARP e PsARP. O terceiro grupo AtDMR1 e DMR1.1 proteínas de *A. thaliana*. E o último grupo é composto por SvARP e NtARP. O agrupamento de proteínas ARP de espécies diferentes pode sugerir que desempenham a mesma função em diferentes espécies de planta.

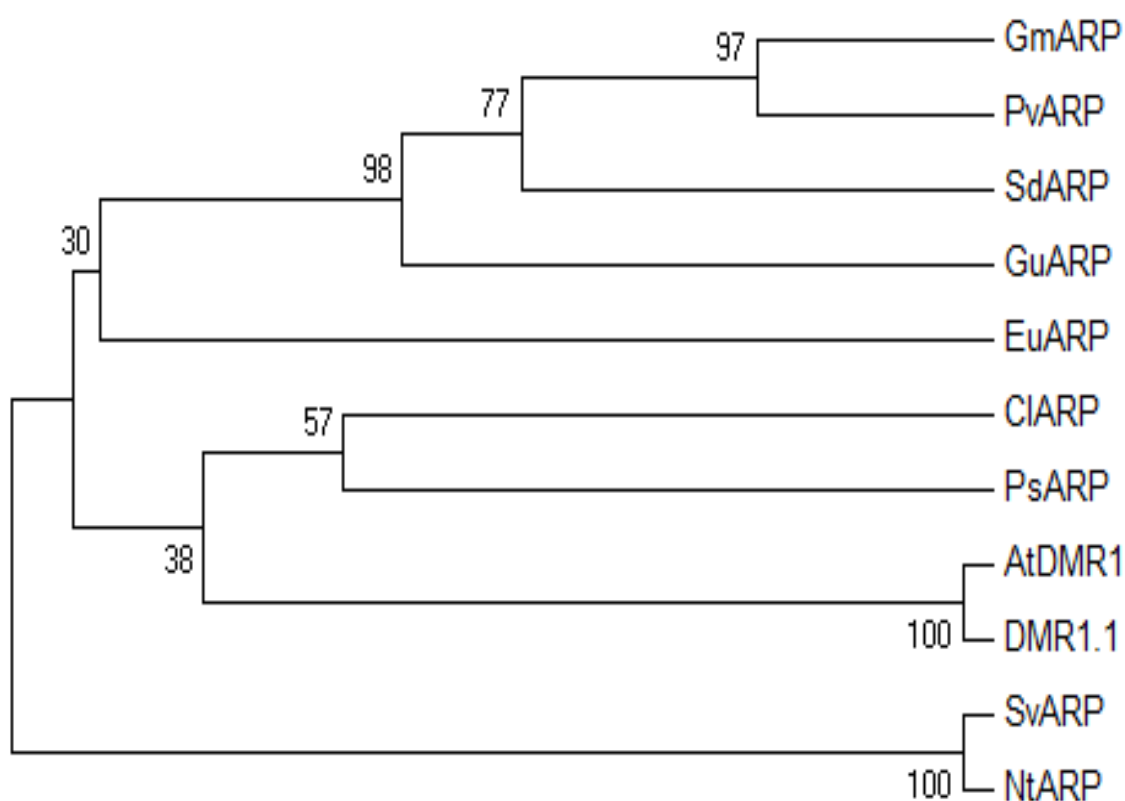


Figura 8- Dendrograma de ARP de soja com outras proteínas ARP. O número de acesso das proteínas no NCBI são: GmARP (*Glycine max*, NP\_001236920.1), PvARP (*Phaseolus vulgaris*, AGV54274.1), SdARP (*Sesbania drummondii*, ABQ44282.1), GuARP (*Glycyrrhiza uralensis*, ABR15095.1), EuARP (*Elaeagnus umbellata*, AAC62104.2), CIARP (*Citrullus lanatus* subsp. *Vulgaris*, BAI52956.1), PsARP (*Paeonia suffruticosa*, ABW74471.1), AtDMR1 (*A.thaliana* NP564305.1), DMR1.1 (*A.thaliana*, NP 001154378.1) SvARP (*Solanum virginianum*, AAS75891.1) e NtARP (*Nicotiana tabacum*, AAS76635.1). Os grupos formados estão destacados em vermelho.

### 3.3.1 Função das proteínas reprimidas por auxinas em plantas

Dentre os cDNAs identificados neste trabalho a *auxin repressed* foi o que mais nos chamou a atenção, pois o clone contém toda a região codificadora da proteína. A literatura mostra que existe uma relação entre a via de auxina e a via de resposta a patógeno, indicando que pode ser uma interação funcional entre o GmbZIP105 e a ARP.

Os genes PpARP1 e PpARP2 de pera (*Pyrus pyrifolia*) são predominantemente expressos no mesocarpo. Sugerindo envolvimento no desenvolvimento do fruto, assim analisou-se o padrão de expressão dos genes PpARPs, e observaram que PpARP1 foi expresso em níveis elevados, enquanto PpARP2 apresentaram níveis relativamente baixos durante o desenvolvimento do fruto, indicando que ambos os genes estão envolvidos em processos diferentes no desenvolvimento desse órgão vegetal (Shi et al 2013). Por outro lado, o gene  $\lambda$ SAR5 (ARP de *Fragaria ananassa*) é reprimido durante o desenvolvimento normal do fruto do morango em resposta a auxina endógena produzida nos aquênios desse órgão, pois quando os aquênios são removidos os níveis de mRNA de  $\lambda$ SAR5 começam a aumentar 2 horas após a depreciação de auxina (Reddy e Poovaiah, 1990).

Em tabaco os níveis da proteína ARP são elevados durante a maturação do pólen, mas cai rapidamente durante a germinação do pólen (Steiner et al., 2003). Em *R. pseudoacacia* a expressão de RpARP é correlacionada negativamente com alongamento do hipocótilo (Park e Han, 2003). Em brassica os níveis de transcritos de BrARP1 e BrDRM1 são relativamente baixo em cotilédones, folhas jovens, botões florais, estames e anteras. Por outro lado em raízes, hipocótilo, folhas maduras, pétalas e sépalas os níveis dos transcritos de BrARP1 e BrDRM1 são elevados (Lee et al., 2013b). A superexpressão de BrARP1 e BrDRM1 em *Arabidopsis* resulta em redução do crescimento vegetativo e produção de sementes (Lee et al., 2013b).

Além da expressão diferencial em diferentes estágios do desenvolvimento vegetal, os genes ARP também são regulados sob tratamento com fito-hormônios e estresse biótico (Steiner et al., 2003; Park e Han, 2003; Lee et al., 2013b; Shi et al 2013). A família DRM1/ARP de *A. thaliana* tem cinco membros, sendo que algumas variantes

são produzidas por splincing aumentando a complexidade da família. A transcrição dos genes AtDRM1 e AtDRM2 foi reduzida sob tratamento com MeJA, etherfon e AIA em *A. thaliana* (Rae et al., 2013). Em pera os genes PpARP1 e PpARP2 são reprimidos por SA (Shi et al, 2013). Atuação da auxina sobre a expressão dos genes ARP varia de acordo com a espécie, em *A. thaliana*, *R. pseudoacacia* e morango os genes ARP são reprimidos por auxina, enquanto em raízes de *Elaeagnus umbellata* e fruto de pera são induzidos por auxina (Reddy e Poovaiah, 1990; Park e Han, 2003; Kim et al, 2007; Rae et al., 2013b, Shi et al, 2013).

A interação incompatível entre o nematóide biotrófico *Meloidogyne arenaria* (Trudgill, 1997) e plantas resistentes de amendoim (*Arachis stenosperma*) induz a expressão diferencial de genes ARP no estágio inicial da infecção quando comparado com a expressão de raízes não inoculadas (Guimarães et al., 2010; Morgante et al., 2013). Dois genes ARP também foram diferencialmente expressos em raízes de soja resistente infectadas com o nematoide *Meloidogyne javanica* (Sá et al., 2012). Por outro lado em plantas susceptíveis *Arachis hypogaea* o gene ARP foi reprimido em raízes inoculadas quando comparado com as não parasitadas (Guimarães et al., 2010). Os resultados indicam que a proteína ARP desempenha uma função na resposta da planta ao ataque de nematóides em plantas resistentes.

## VI CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteína não caracterizada de soja não possui função descrita na literatura, a interação forte com o transfator GmbZIP105 em ensaio in vivo indicam que pode desempenhar algum papel na modulação desse transfator.

A proteína asparagina sintetase possui função no metabolismo de aminoácidos durante o desenvolvimento da planta bem como em respostas a estresse biótico em espécie pimenta. A interação com o transfator GmbZIP105 pode indicar alguma função específica na modulação da atividade transcricional de GmbZIP105, ou mesmo como proteínas efetora nas vias de defesa.

A interação identificada entre GmbZIP105 e ARP indica que essa proteína pode ter um papel na modulação desse transfator. Segundo trabalhos anteriores a proteína ARP pode ser ativada ou reprimida pela via de sinalização de auxina sob diferentes condições fisiológicas da planta. A proteína ARP é ativada por infecção de nematoides, e GmbZIP105 é ativado na presença do fungos *Phakopsora pachyrhizi* e SA, assim podemos especular que ambas as proteínas interagem sob condição de estresse biótico podendo ativar ou reprimir genes de vias de resposta a estresse biótico em soja (figura 9).

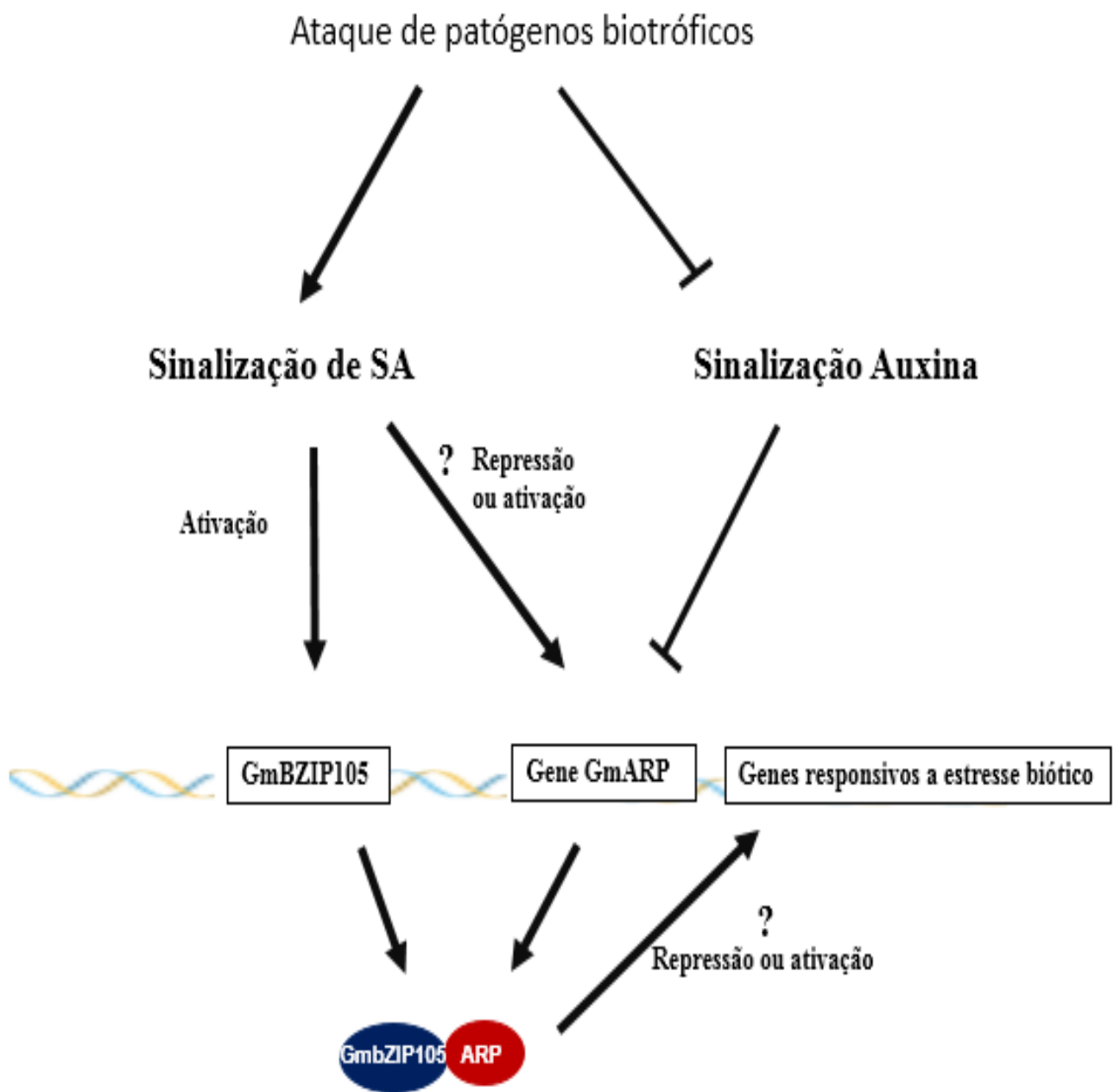


Figura 9- Modelo de via de sinalização mediada pelo fator de transcrição GmbZIP105 em resposta a estresse biótico

## VII CONCLUSÃO

No presente trabalho verificou-se que o transfator GmbZIP105 possui capacidade de interagir com três proteínas diferentes de soja em um sistema *in vivo*, denominado duplo híbrido de levedura, utilizando bibliotecas de cDNA de soja submetidos a diferentes estresses. As proteínas identificadas foram: proteínas não caracterizada, asparagina sintetase e proteína reprimida por auxina.

Futuros estudos funcionais e de expressão dos três genes e GmbZIP105 podem contribuir para a elucidação da função bioquímica dessa proteína em vias de sinalização de defesa da planta à estresse biótico e abiótico.

## VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, S. M. 2013. Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição de soja. Tese de doutorado em Bioquímica Agrícola. UFV. Viçosa.

Alves, M. S., Reis, P. A. B., Dadalto, S. P., Faria, J. Q. A., Fontes, E. P.B., and Fietto, L. G. 2011. A Novel Transcription Factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), Connects Endoplasmic Reticulum Stress with an Osmotic Stress-induced Cell Death Signal. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 20020–20030.

Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. G., De Souza, G. B., Barros, V. A., and Fietto, L. G. 2013. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 7815-7828.

Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. G., De Souza, G. B., Barros, V. A., and Fietto, L. G. 2014. Transcription Factor Functional Protein-Protein Interactions in Plant Defense Responses. *Proteomes* 1: 85-106.

Amberg, D. C., Burke, D. J., Strathern, J. N. 2005. Assay of  $\beta$ -galactosidase in yeast: Assay of crude extracts. *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Bart, P.H.J., Thomma, B. P.A., and Thevissen, C. K. 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193–202.

Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Roby, D., Rivas, S. 2011. The Xanthomonas Type III Effector XopD Targets the Arabidopsis Transcription Factor MYB30 to Suppress Plant Defense. *The Plant Cell* 23: 3498–3511.

Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448:666-673.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124: 803–814.

Dadalto, S. P. 2012. Identificação de fatores de transcrição que controlam a expressão do gene *gmsr3* de soja. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola. UFV. Viçosa.

Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. M., and Verpoorte, R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews* 10:397–412.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.

Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., and Wang, S. 2008. Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *The Plant Cell* 20: 228-240.

Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., and Kazan, K. 2007. MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19: 2225–2245.

Droge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W. P., Halkier, B. A., Loake, G. J., Doerner, P., Dixon, R. A., and Chris Lamb, C. 1997 Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The European Molecular Biology Organization Journal* 16: .726–738.

Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C.S., Smeeckens, S., Carbajosa, J.V., and Droge-Laser, W. 2006. Two-hybrid protein–protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *The Plant Journal* 46: 890–900.

Eulgem T. 2005. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *TRENDS in Plant Science* 10: 71-78.

Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J., and Wang, S. 2011. Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice. *Plant Physiology* 155: 589-602.

Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., and Dong, X. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486: 228-233.

Gaufichon, L., Reisdorf-Crena, M., Rothsteinc, S. J., Chardona, F. and Suzukia, A. 2010. Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* 179: 141–153.

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205–227.

Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Proite, K., Araújo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M., Pic-Taylor, A., Silva, F. R., Morgante, C. V., Ribeiro, S. G., Bertioli, D. J. 2010. A Study of Gene Expression in the Nematode Resistant Wild Peanut Relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biol* 3:183–192.

Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrrens, F., Stracke, R., and Weisshaar, B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology* 57:155–171.

Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A., and Droge-Laser, W. 2002. The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Molecular Genetics Genomics* 267: 16–26.

Hwang, I. S., An, S. H., and Hwang, B. K. 2011. Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *The Plant Journal* 67: 749–762.

Jackoby, M., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. 2002. The bZIP research group (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *TRENDS in Plant Science* 7: 106-111.

Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*: 444: 323-329.

Kaminaka, H., Näke, C., Epple, P., Dittgen, J., Schütze, K., Chaban, C., Holt, B. F., Merkle, T., Schäfer, E., Harter, K., and Dangl, J. L. 2006. bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *The European Molecular Biology Organization Journal* 25: 4400–4411.

Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J.K., and Howe, G.A.2008. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology* 11:428–435.

Kidd, B.N., Kadoo, N.Y., Dombrecht, B., Tekeoglu, M., Gardiner, D.M., L.F., Aitken, E.A.B., Schenk, P.M., Manners, J. M., and Kazan, K. 2011. Auxin Signaling and Transport Promote Susceptibility to the Root-Infecting Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 733–748.

Kim, H. B., Lee, H., Oh, C. J., Lee, N. H., and Na, C. S. 2007. Expression of *EuNOD-AR1* Encoding Auxin-repressed Protein Homolog Is Upregulated by Auxin and Localized to the Fixation Zone in Root Nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Molecules and Cells* 23: 115-121.

Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. 2000. Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression. *The Plant Cell* 12: 2339–2350.

Kuhlmann, M., Horvay, K., Strathmann, A., Heinekamp, T., Fischer, U., Bottner, S., and Droge-Laser, W. 2003. The  $\alpha$ -helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 8786–8794.

Lam, H. M., Hsieh, M. H., and Coruzzi, G. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 345–353.

Lee, B. J., Park, C. J., Kim, S. K., Kim, K. J., Paek, K. H. 2006. In vivo binding of hot pepper bZIP transcription factor CabZIP1 to the G-box region of pathogenesis-related protein 1 promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344: 55–62.a

Lee, S.C., Choi, H.W., Hwang, I.S., Choi, D.S., Hwang, B.K. 2006. Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, CABZIP1, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta* 224: 1209–1225.

Lee, J., Han, C.T., and Hur, Y. 2013. Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, BrARP1 and BrDRM1. *Molecular Biology Reports* 40:197–209.b

Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A.P., Memelink, J., Pieterse, C.M.J., and Ritsema, T. 2010. Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of *Arabidopsis* Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 187–197.

Liu, Y., Ahn, J. E., Datta, S., Salzman, R. A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Koiwa, H., and Zhu-Salzman, K. 2005. *Arabidopsis* Vegetative Storage Protein Is an Anti-Insect Acid Phosphatase. *Plant Physiology* 139: 1545–1556.

Mah, K. M., Uppalapati, S.R., Tang, Y., Allen, S., and Shuai, B. 2012. Gene expression profiling of *Macrophomina phaseolina* infected *Medicago truncatula* roots reveals a role for auxin in plant tolerance against the charcoal rot pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 21-30.

Mahajan, S, and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys* 139-158.

Maraschin, F.S., Memelink, J., and Offringa, R. 2009. Auxin-induced, SCF<sup>TIR1</sup>-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *The Plant Journal* 59: 100–109.

McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L. 2013. Paul Birch RJAn RxLR Effector from *Phytophthora infestans* Prevents Re-localisation of Two Plant NAC Transcription Factors from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus. *PLOS Pathogens* 9: 1-16.

Mockaitis, K., and Estelle, M. 2008. Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24:55–80.

Morgante, C.V., Brasileiro, A.C. M., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C. G., Fonseca, L. N., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J and Guimaraes, P. M. 2013. A survey of genes involved in *Arachis stenoperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race. *Functional Plant Biology* 40: 1298–1309.

Mutka, A. M., Fawley, S., Tsao, T., and Kunkel, B.N. 2013. Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. *The Plant Journal* 74: 746–754.

Park, S., and Han, K. H. 2003. An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. *Tree Physiology* 23: 815–823.

Patil, A., and Nakamura, H. 2006. Disordered domains and high surface charge confer hubs with the ability to interact with multiple proteins in interaction networks. *Federation of European Biochemical Societies letters* 580: 2041–2045

Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C. M. J., and Memelink, J. 2008. The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense1. *Plant Physiology* 147:1347–1357.

Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:489–521.

Qi, L., Yan, J., Li, Y., Jiang, H., Sun, J., Chen, Q., Li, H., Chu, J., Yan, C., Sun, X., Yu, Y., Li, C and Li, C. 2012. *Arabidopsis thaliana* plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytologist* 195: 872–882.

Rae, G. M., David, K., and Wood, M. 2013. The Dormancy Marker DRM1/ARP Associated with Dormancy but a Broader Role In Planta. *Developmental Biology Journal* 2013: 1-13.a

Rae, G. M., N. Uversky, V. N., David, K., and Wood, M. 2013. DRM1 and DRM2 expression regulation: potential role of splice variants in response to stress and environmental factors in *Arabidopsis*. *Molecular genetics genomics*.b

Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., Blee, E., Mongrand, S., Domergue, F., and Roby, D. 2008. A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 752–767.

Reddy, A. S. N., and Poovaiah, B. W. 1990. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for na auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene. *Plant Molecular Biology* 14: 127-136.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G. 2011. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just jasmonate salicylate Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49:317–343.

Rook, F. Guerrets, N., Kortstee, A., Kampen, M. V., Borrias, M., Weisbeeks, P., and Sjeff, S. 1998. Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal* 15: 253-263.

Sá, M. E. L., Lopes, M. J. C., Campos, M. A., Paiva, L. V., Santos, R. M. A., Beneventi, M. A., Firmino, A. A. P., and Sá, M. F. G. 2012. Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica* *Genetics and Molecular Biology* 35: 272-282.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.

Schutze, K., Kand, H., and Chaban, C. 2008. Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends in Plant Science* 13: 247-255.

Shen, H., Cao, K., and Wang, X. 2007. Conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in *Arabidopsis thaliana* interferes with the formation of homodimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 425-430.

Shi, H. Y., Zhang, Y.X., and Chen, L. 2013. Two pear auxin-repressed protein genes, PpARP1 and PpARP2, are predominantly expressed in fruit and involved in response to salicylic acid signaling. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 114:279-286.

Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., and Dong X. 2009. Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* 137: 860–872.

Steiner, C., Bauer, J., Amrhein, N., and Bucher, M. 2003. Two novel genes are differentially expressed during early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1625: 123– 133

Tak, H., and Mhatre, M. 2012. Cloning and molecular characterization of a putative bZIP transcription factor VvbZIP23 from *Vitis vinifera*. *Protoplasma* 250: 333–345.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Gregg A. Howe G.A., and Browse, J. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661–666.

Trudgill, D. L. 1997. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology* 46: 26–32.

Udvardi, M.K., Kakar, K., Wandrey, M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja, A., Zhang, J., Benedito, V., Hofer, J.M.I., Chueng, F., and Christopher D. Town, C. D. 2007. Legume transcription factors: Global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol* 144: 538–549.

Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C. M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Körbes, A. P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S. C.M., and Corné M.J. Pieterse, C.M.J. 2013. Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCF<sup>COI1</sup>-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell* 25: 744–761.

Verhage, A., Wees, S. C. M., and Pieterse, C. M.J. 2010. Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say? *Plant Physiology* 154: 536–540.

Verhage, A., Vlaardingerbroek, I., Raaymakers, C., Van Dam, N. M., Dicke, M., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J. 2011. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Front Plant Microbe Interact* 2: 1–12.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X. 2007. Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology* 17: 1784–1790.

Wood, M., Rae, G. M., Wu, R. M., Walton, E. F., Xue, B., Hellens, R. P., and Uversky, V. N. 2013. Actinidia DRM1 - An Intrinsically Disordered Protein Whose mRNA Expression Is Inversely Correlated with Spring Budbreak in Kiwifruit. *Plos One* 8: 1-18.

Xin, X.F., and Yang He, S.Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *The Annual Review of Phytopathology* 51:473–98.

Yoshida, K., Wakamatsu, S., and Sakuta, M. 2008. Characterization of SBZ1, a soybean bZIP protein that binds to the chalcone synthase gene promoter. *Plant Biotechnol* 25: 131–140.

Zarei, A., Korbes, A. P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., and Memelink, J. 2011. Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 75:321–331.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. 2007. Dual Regulation Role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signaling during *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* Interaction. *Plant Physiology* 145: 450–464.

Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P.P., Qing Fu, Z.Q., F. Klessig, D.F., He, S.Y., and Dong, X. 2012. Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host and Microbe* 11, 587–596.

Zhou, J. M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., and Klessig, D. F. 2000. NPR1 Differentially Interacts with Members of the TGA/OBF Family of Transcription Factors That Bind an Element of the PR-1 Gene Required for Induction by Salicylic Acid. *The American Phytopathological Society* 13: 191-202.