

DÉBORA PELLANDA FAGUNDES

**ZAR1: UM MODULADOR NEGATIVO DA RESPOSTA AOS ESTRESSES POR
DEFICIÊNCIA HÍDRICA E DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

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

Orientador: Pedro Augusto B. dos Reis

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F156z
2020 Fagundes, Débora Pellanda, 1994-
ZAR1 : um modulador negativo da resposta aos estresses por
deficiência hídrica e do retículo endoplasmático / Débora Pellanda
Fagundes. - Viçosa, MG, 2020.
53f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.46-50.

1. Proteínas cinases. 2. Estresse hídrico. 3. Comunicação celular.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 572.6

DÉBORA PELLANDA FAGUNDES

**ZAR1: UM MODULADOR NEGATIVO DA RESPOSTA AOS ESTRESSES
POR DEFICIÊNCIA HÍDRICA E DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Débora Pellanda Fagundes
Autora



Pedro Augusto Braga dos Reis
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao Onipotente Onisciente e Onipresente Deus, por sempre está comigo me sustentando e provendo todas as coisas ao longo da minha vida, jamais poderei agradecer tudo que fez e tem feito a mim.

Aos meus pais Luiz Cousaqueviti Fagundes e Iraci Pellanda, minha irmã Diana e meus familiares, pelo suporte e amor incondicional, ao Vítor por todo amor e compreensão demonstrada.

Ao Professor e Orientador Pedro Augusto por todo conhecimento passado, paciência no meu processo de aprendizado, toda contribuição na produção deste trabalho e pelo exemplo de profissional.

À professora Elizabeth Fontes pela confiança, por permitir que eu fizesse parte de sua equipe de pesquisa e pelos ensinamentos passados ao longo destes dois anos.

A todos os meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas por todas as vezes que me ajudaram com as técnicas, mas principalmente por todo apoio e palavras de incentivo em momentos em que a perseverança foi exigida.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas, (NuBioMo/UFV), em especial ao Edivaldo pela assistência no trabalho com proteínas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de estudo, aos meus professores pelo conhecimento passado.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP) pela estrutura de trabalho disponibilizada.

Agradeço as agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Arthur Bernardes (Funarbe) pelo suporte financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, além da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à FINEP.

A todos os amigos que fiz neste curto período, em especial Igreja Cristã Maranata que me acolheu, e me ajudou com suas orações.

RESUMO

FAGUNDES, Débora Pellanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **ZAR1: um modulador negativo da resposta aos estresses por deficiência hídrica e do retículo endoplasmático.** Orientador: Pedro Augusto Braga dos Reis.

Estresses bióticos e abióticos são os principais desafios na agricultura e estudos de vias de sinalização são importantes para contornar essa problemática. A via de sinalização de morte celular programada (PCD) mediada por NRP/DCDs se destaca pela integração da resposta molecular de diversos estresses bióticos e abióticos culminando na morte celular programada. Esta via é modulada negativamente pela chaperona molecular BiP por mecanismos ainda não elucidados. A superexpressão da chaperona molecular BiP permite uma maior tolerância a condições de estresses osmótico e do retículo endoplasmático (RE) sob condições de deficiência hídrica. Em busca de genes envolvidos no mecanismo de tolerância mediado por BiP e seu efeito na via PCD mediada por NRP/DCDs, um escrutínio genético em plantas superexpressando BiP mutagenizadas foi realizado. Foram selecionadas plantas mutantes que suprimiam o fenótipo de tolerância a seca mediado pelo chaperone molecular BiP. Estas linhagens tiveram o genoma sequenciado e a identificação de mutações específicas permitiu a identificação de alguns genes candidatos. Assim ZAR1 (Zygotic Arrest 1), gene que codifica um receptor do tipo cinase (RLK) foi selecionado como gene candidato a supressor do mecanismo mediado por BiP. O presente trabalho realizou experimentos para tentar caracterizar o papel molecular e fisiológico de ZAR1. Foram geradas plantas superexpressando ZAR1 e plantas que tinham o gene de *zar1* silenciado. Nos experimentos realizados foi demonstrado que o nível de expressão de ZAR1 altera o fenótipo de plantas de *Arabidopsis thaliana*, em condições de estresse no RE e estresse por deficiência hídrica. Sob deficiência hídrica plantas silenciadas para o gene *zar1* apresentaram um fenótipo mais sensível a deficiência hídrica, comparado com plantas Col0, enquanto plantas superexpressando ZAR1 apresentaram um fenótipo mais tolerante que a Col0. Além disso, plantas superexpressando ZAR1 possuem um atraso do processo de morte celular induzida por um agente causador de estresse no RE (tunicamicina), enquanto plantas silenciadas apresentaram o processo de morte celular acelerado comparado com plantas controle. Através de ensaios de fosforilação *in vivo* foi demonstrado que ZAR1 é fosforilada em resíduos de serina e tirosina em condições de estresse no RE

ou estresse osmótico. No entanto, não foi possível identificar quais os resíduos específicos de aminoácidos são os alvos de modificações pós-traducionais nestas condições. Embora se saiba que há interação entre ZAR1 e RGS1 (Regulador da Sinalização de Proteína G), a fosforilação de ZAR1 sobre RGS1 não havia sido identificada. Assim, um ensaio de fosforilação *in vitro* também foi realizado e demonstrou que ZAR1 pode fosforilar RGS1 em resíduos de serina ainda não caracterizados. Coletivamente, os resultados indicam que ZAR1 pode estar envolvido com a via de tolerância ao estresse por déficit hídrico e no RE ao atenuar da morte celular ativada por estresses. Além disso, ZAR1 pode atuar como um modulador da via de proteínas G heterotriméricas através da interação/modulação de RGS1, apresentando um papel-chave na resposta de estresse abiótico.

Palavras-chave: RLK. Resposta a Estresse. Sinalização Celular.

ABSTRACT

FAGUNDES, Débora Pellanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **ZAR1: A negative modulator of the stress response due to water deficiency and reticulum stress.** Adviser: Pedro Augusto Braga dos Reis.

Biotic and abiotic stresses are plants is the major challenge on the agriculture worldwide, consequently, the understanding of signaling pathways is essential to cope with these conditions. The NRP/DCD cell death pathway integrates some biotic and abiotic stresses in a programmed cell death response. This pathway is modulated by the molecular chaperone BiP by an unknown mechanism. BiP overexpression in plants promotes tolerance to osmotic stress, endoplasmic reticulum (ER) stress, as well as drought conditions. Furthermore, this overexpression promotes the delay in the cell death response triggered by stresses conditions. In order to elucidate the mechanism of the BiP mediated drought tolerance and BiP role in the modulation of NRP/DCD pathway, it was performed a genetic screening on Arabidopsis BiP overexpressing plants. We select mutant plants based on the suppression of BiP-mediated tolerance phenotype. It was identified one candidate, which corresponds to a receptor-like kinases (RLK) family member, ZAR1 (Zygote Arrest 1), thus, the present work sought characterize the molecular and physiologic role ZAR1. We generated ZAR1 overexpressing lines in Arabidopsis, as well as silenced plants for ZAR1 gene. We demonstrated that the ZAR1 level is important to modulate the *Arabidopsis thaliana* phenotype upon ER and water deficit stress conditions. Upon water deficit ZAR1 silenced plants showed more sensitive phenotype compared to Col0, on the other hand, ZAR1 overexpressing lines showed a more tolerant phenotype. Moreover, ZAR1 overexpressing lines showed a delay of the cell death response upon ER stress induction by a stressor (tunicamycin), whereas, the ZAR1 silenced plants accelerated the cell death process. Through *in vivo* phosphorylation assay we demonstrate that ZAR1 is phosphorylated in serine and tyrosine residues under either ER stress or osmotic stress. Nevertheless, it was not possible to identify which specific residues are target for post-translational modifications under these conditions. Although previous experiments have shown the interaction between ZAR1 and RGS1 (Regulator of G-protein signaling 1), it is unknown that ZAR1 is able to phosphorylates RGS1. Thus, by

an *in vitro* phosphorylation assay we demonstrated that ZAR1 is able to phosphorylates RGS1 an unkown serine residues. Accordingly, the results in this work indicate that ZAR1 can be involved on the BiP mediated water deficit tolerance, as well as the cell death response attenuation, moreover, ZAR1 act as negative modulator in those pathways and also can act as modulator of G signaling through interaction/modulation of RGS1. Therefore, it demonstrates as a key component of abiotic stresses responses.

Keywords: RLK. Stress Response. Cell Signaling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Via de Sinalização de Morte Celular Programada (PCD) Mediada por Proteínas NRP/DCDs	13
2.2 BiP Modula a Via de Integração das Respostas ao Déficit Hídrico	14
2.3 ZAR1: Um Receptor do Tipo RLK	16
2.4 Importância Fisiológica da Modificação Pós-Traducional em Resposta ao Estresse Abiótico	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Genótipos Utilizados	19
3.2 Ensaio de Estresse Hídrico	20
3.3 Ensaio de Estresse no RE	21
3.4 Indução do Estresse no RE em Plântulas.....	21
3.5 Ensaio de Morte Celular pelo Método de Coloração com Azul de Evans	21
3.6 Estresse no RE por Infiltração em Folhas.....	21
3.7 Ensaio de Estresse Osmótico	22
3.8 Fosforilação de Proteínas <i>in vivo</i>	22
3.9 Fosforilação de Proteínas <i>in vitro</i>	22
3.10 Expressão Heteróloga de ZAR1ct e RGS1ct.....	23
3.11 Reação do Ensaio de Fosforilação <i>in vitro</i>	24
3.12 Western Blotting	24
3.13 Extração de RNA de <i>A. thaliana</i> e síntese de cDNA.....	24
3.14 <i>Real time</i> PCR.....	24
3.15 Análises Bioinformática	25
3.16 Técnicas de Biologia Molecular	26
3.17 Análise Estatística	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Avaliações Fenotípicas de Linhagens Transgênicas	27
4.2 A Superexpressão de ZAR1 Ameniza os Sintomas de Morte Celular Induzida por Estresse no RE	30
4.3 Plantas ZAR1ox Apresentam Retardo na Senescência Foliar Induzida por Estresse no RE	31
4.4 Ensaio de Fosforilação <i>in vivo</i>	34

4.5 Predições de Sítios de Fosfolização e Filogenia por Bioinformática	35
4.6 ZAR1 Pode Fosforilar RGS1	38
5. DISCUSSÃO	40
5.1 ZAR1 Possível Supressor da Via de Morte Celular Mediada por NRP/DCDs e Modulada por BiP	40
5.2 ZAR1 Sofre Modificações Pós-Traducionais Sob Estresse no REe Osmótico	41
5.3 ZAR1 Fosforila RGS1	42
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS	46
8. ANEXO 1.....	51
8. ANEXO 2.....	53

1. INTRODUÇÃO

Plantas estão constantemente expostas a diversas condições que geram estresses bióticos e abióticos; dentre os estresses abióticos se destacam os causados por extremos de irradiação, temperatura, o estresse nutricional, por toxidez, salino e o hídrico (seja por alagamento ou pela deficiência hídrica). Dentre os fatores estressantes ao vegetal a deficiência hídrica é o que frequentemente, causa maior limitação para o desenvolvimento e produtividade dos vegetais, pois a água é considerada o recurso-chave (Taiz, *et al.* 2017). A deficiência hídrica não só limita diretamente o crescimento dos vegetais, mas gera estresses secundários como o osmótico. Desencadeia danos em nível molecular e fisiológico, danifica a maquinaria celular e organelas como o retículo endoplasmático (RE).

Estudos de vias de sinalização são importantes na busca de conhecimento primário e de aplicação em melhorias na produção de cultivares agrícola. Em pesquisas com plantas sobre estresse essa abordagem é explorada através de recursos genéticos, fisiológicos e bioquímicos que proporcionem conhecimento de aplicação nos processos de reprogramação genética em plantas. Ao Ativar ou inibir vias de sinalização, por superexpressão ou repressão de genes específicos, de forma a minimizar efeitos deletérios nas células provocados por estresses (Reis *et al.*, 2016; Tweneboah e Oh, 2017).

As plantas possuem estratégias de resposta ao estresse, em níveis fisiológico, celular e molecular. No nível molecular, se destacam as alterações no padrão de expressão gênica, na tradução e modificações pós-traducionais de diferentes proteínas. Essas estratégias podem: i) promover tolerância protegendo as plantas contra o estresse de forma direta, como no caso das moléculas protetoras e chaperonas moleculares; ii) ou por atuar na percepção de sinais reguladores ao ativar cascatas de sinalização, na transdução de sinais de resposta ao estresse e regular a expressão gênica, como as moléculas receptoras de sinais e sinalizadoras. Em ambos os casos a elucidação da estrutura e função dessas proteínas contribui para a compreensão do funcionamento das vias de sinalização e dos diferentes mecanismos de respostas das plantas ao estresse.

A via de sinalização de morte celular programada (PCD), mediada por proteínas ricas em asparagina com domínios de desenvolvimento da morte celular (NRP/DCDs), se destaca pela integração da resposta molecular a diversos estresses

bióticos e abióticos, como o provocado por patógenos, estresses no RE e osmótico (Costa *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2011, Reis *et al.*, 2016; Fraga *et al.*, 2019).

A via PCD foi caracterizada inicialmente em soja, entretanto genes ortólogos também foram descritos em *Arabidopsis thaliana*, um indício de que esta sinalização ocorre de forma análoga em espécies de vegetais (Reis *et al.*, 2016). Os componentes descritos da via PCD mediada por NRP/DCDs incluem a proteína NRPs, transfadores da família NAC e a enzima de processamento vacuolar (VPE) (Mendes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2016).

A chaperona molecular BiP (*chaperone binding protein*) também está envolvida na via PCD mediada por NRP/DCDs ao atuar como modulador negativo. Plantas com superexpressão de BiP possuem características fenotípicas frequentes no processo de morte celular programada (Cascardo *et al.*, 2000; Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2016). No entanto o mecanismo de atenuação da via PCD por BiP é constituído de múltiplos mecanismos reguladores e alguns dos componentes moleculares envolvidos no processo requerem elucidação havendo, portanto a necessidade de entender os mecanismos de sinalização envolvidos no processo de atenuação do estresse (Reis *et al.*, 2011; Carvalho, *et al.*, 2014).

Considerando lacunas envolvendo mediadores na via PCD mediada por NRP/DCDs e a chaperona BiP, técnicas de genética direta foram utilizadas para identificar proteínas e os mecanismos de ativação/modulação da via PCD. Neste sentido, sementes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando BiPD foram mutagenizadas pelo etanosulfato de metila (EMS), um *screening* das sementes foi realizado. As plantas com perda no fenótipo de tolerância a deficiência hídrica foram selecionadas e tiveram o DNA genômico sequenciado, para mapeamento dos genes mutagenizados.

Com base nas informações do sequenciamento genômico um dos genes identificados foi *Zygotiic Arrest1* (ZAR), que codifica uma cinase do tipo receptor (RLK). Este grupo de proteínas em eucariotos é a chave central da comunicação e do controle intracelular (Silva *et al.*, 2009). RLKs são importantes sinalizadores responsivos a sinais intracelulares e extracelulares, podem desencadear cascatas de sinalização em resposta a estresses bióticos, abióticos e eventos do

desenvolvimento do vegetal, portanto importantes na regulação dos mecanismos da maquinaria celular, na ativação ou repressão de vias.

A maioria das RLKs são proteínas da membrana plasmática bastante conservadas, o que justifica a importância deste grupo de proteínas, que forma a maior família de genes das plantas e possuem uma diversidade de funções. Muitas das funções das *RLK* estão associadas diretamente a resposta ao estresse abiótico, como a seca, a extremos de temperatura e metais tóxicos; que envolvem a sinalização por cálcio, resposta a hormônios como o ácido abscísico, e de defesa antioxidante (Ye *et al.*, 2017).

Considerando a importância das RLKs, o presente trabalho consiste na caracterização molecular e fisiológica de ZAR1, identificada por meio de um escrutínio genético em plantas superexpressando BiPD mutagenizadas. Assim, se pretende entender o envolvimento de ZAR1 na via de morte celular programada e seu efeito supressor na resposta mediada pela chaperona molecular BiP. Além de avaliar o papel de ZAR1 em diversos estresses abióticos, como o osmótico, no RE e o causado por deficiência hídrica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Via de Sinalização de Morte Celular Programada (PCD) Mediada por Proteínas NRP/DCDs

Dentre as estratégias desenvolvidas pelas plantas para resistir às distintas condições ambientais, estão às ativações de vias induzidas por estresse, com vias de indução de morte celular programada - *Programmed Cell Death* - (PCD) (Petrov *et al.*, 2015). A ativação da via PCD é essencial durante os estágios de crescimento e desenvolvimento das plantas, porém pode ser induzida também por estresses bióticos e/ou abióticos, culminando em cascatas de sinalização (Pinto, Locato e Gara, 2012; Taiz, *et al.*, 2017). Para estas condições de estresses em plantas, tem sido caracterizada a via de sinalização PCD mediada por proteínas ricas em asparagina com domínio de morte celular (NRP/DCDs) que foram identificadas inicialmente por Ludwig e Tenhaken (2001), apresentando uma região C-terminal contendo o domínio de DCD (*Development and Cell death Domain*) conservado e um domínio adicional rico de asparagina (*N-rich domain*).

A ativação da via de sinalização PCD mediada por proteínas NRP/DCDs se inicia com a indução do fator de transcrição GmERD15 (*Glycine max Early Responsive to Dehydration 15*) em soja que é induzido por estresse osmótico ou no RE (Alves *et al.*, 2011). GmERD15 ativo se ligar ao promotor de genes das proteínas NRPs e assim há expressão das proteínas NRP-A e NRP-B, gerando uma cascata de sinalização que resulta na indução da expressão de genes da família NAC (GmNAC081 e GmNAC030), que atuam regulando a expressão de efetores da morte celular programada (Mendes *et al.*, 2013).

Os transfatores GmNAC081 e GmNAC030 se ligam a promotores de genes que codificam enzimas hidrolíticas, culminando principalmente na expressão da enzima de processamento vacuolar (VPE) (Mendes *et al.*, 2013). VPE possui atividade caspase-1 exercendo uma função crucial na execução da morte celular programada em plantas (Hatsugai *et al.*, 2015).

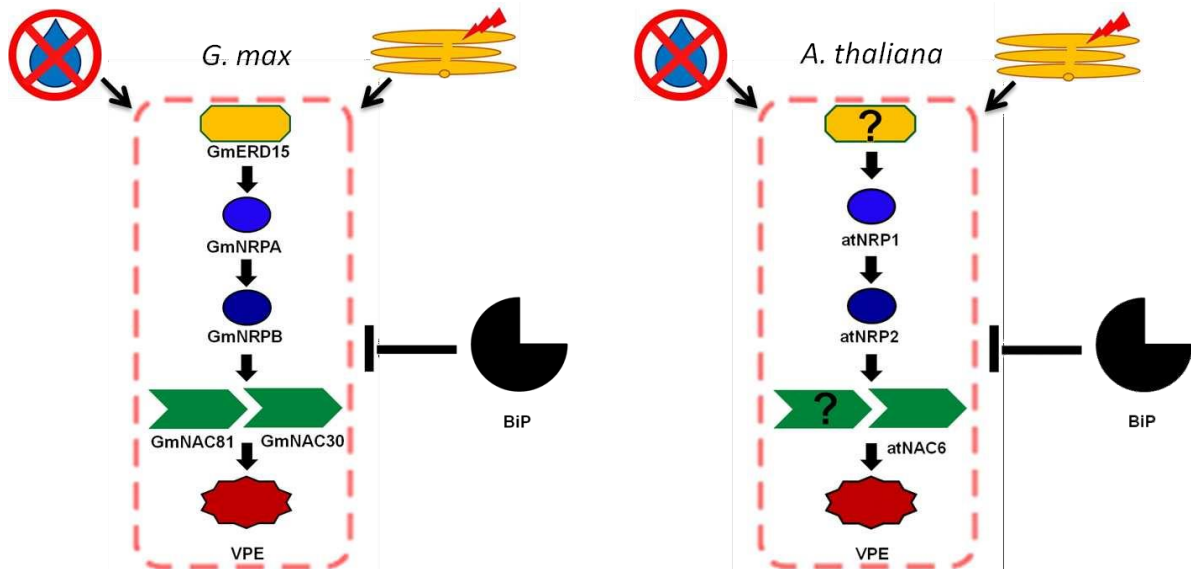


Figura 1: Via de sinalização de morte celular mediada (PCD) por NRP/DCDs: esquema demonstra o funcionamento da via PCD, ativada, em soja e em *Arabidopsis*, sob condições de estresse osmótico e do retículo endoplasmático (RE). As setas cheias indicam que o gene é um alvo imediato à jusante, pontos de interrogação indicam intermediários a serem elucidados (adaptado de Mendes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2016).

A ativação da via PCD, eminente no ciclo de vida das plantas, quanto resultado de uma condição estressante com o estresse no RE e osmótico pode levar a necrose de tecidos e órgãos, acelerando a senescência e morte do vegetal, portanto causando uma maior suscetibilidade ao estresse. Entretanto, a regulação da via PCD apresenta potencial para melhorar a tolerância das plantas ao estresse abiótico (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2016).

2.2 BiP Modula a Via de Integração das Respostas ao Déficit Hídrico.

A proteína BiP pertence à família das chaperonas Hsp70, de proteínas de choque térmico, residente no RE (Haas e Meo, 1988). Classificadas como chaperona molecular, BiP (*molecular chaperone binding protein*) é descrita como importante para a translocação, dobramento e transporte de proteínas, possuindo um sítio catalítico na região amino-terminal e um sítio de ligação ao substrato na porção C-terminal, característica da família Hsp70 (Mckay, *et al.*, 1993; Vitale e Boston, 2008). Esta chaperona é uma proteína multifuncional, envolvida na regulação de vários processos associados ao RE, além de possuir importância para plantas sob estresse biótico, atuando na imunidade inata, regulando positivamente genes relacionados com a susceptibilidade a patógenos (Park, *et al.*, 2010; Park e

Seo, 2015). Além disso, BiP aumenta a tolerância de plantas sob estresse abiótico, atenuando a ativação da via PCD, ativada por estresses no RE, osmótico e déficit hídrico (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Reis e Fontes, 2012).

O RE é uma organela chave nos processos de resposta ao estresse celular, possuindo papel primordial na integração de sinais gerados por estresse biótico e abiótico em plantas. Esta organela possui vias de comunicação com o núcleo celular, uma delas conhecida como via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), cujos eventos de sinalização são bem caracterizados em plantas (Alvim *et al.*, 2001). No RE chaperonas moleculares podem atuar como sensores responsivos as alterações quantitativas e qualitativas das proteínas que transpõem esta organela. Em uma condição de desequilíbrio no RE a via UPR é ativada, resultando na superexpressão das chaperonas moleculares e também de componentes da via de degradação das proteínas associadas ao RE (ERAD), além da degradação seletiva de mRNAs e repressão traducional (Gardner *et al.*, 2013; Wan e Jiang, 2016).

A chaperona BiP é responsável por manter inativos e ancorados à membrana do RE os fatores de transcrição que respondem a sinais de estresse. Em condições de estresse celular BiP pode se desligar dos receptores e se associar a proteínas mal dobradas, de maneira a evitar o acúmulo das proteínas mal conformadas. Concomitantemente, ao se desligar dos transdutores ocorre a ativação da via UPR e por consequência a expressão de proteínas, como a própria chaperona BiP para auxílio na estabilização do equilíbrio celular (Reis *et al.*, 2016).

Estudos utilizando plantas superexpressando a proteína BiP, em soja (*Glycine max*) e em tabaco (*Nicotiana tabacum*), demonstraram que esses transgênicos apresentam um retardo na senescência foliar induzida pelo déficit hídrico, além de possuírem uma menor diminuição do potencial hídrico e uma menor murcha das folhas (Valente *et al.*, 2009). A maior taxa de sobrevivência e atraso na senescência foliar em plantas sob déficit hídrico, são outras características advindas da superexpressão de BiP, podendo serem estes fatores responsáveis por mediar um aumento da tolerância ao déficit hídrico, quando comparadas com plantas controle (Reis *et al.*, 2011, Reis e Fontes, 2012).

Os produtos dos genes induzidos por estresses podem ser classificados em dois grupos, os que protegem as plantas de forma direta contra o estresse; e os que atuam sobre a transdução de sinais de resposta ao estresse e regulam a expressão

gênica. As chaperonas moleculares, de maneira geral, parecem pertencer ao primeiro grupo, possuindo função protetora contra diversos fatores estressantes para as plantas. O segundo grupo é formado por proteínas regulatórias, como fatores transcricionais (Hasegawa *et al.*, 2000). Porém, a regulação da expressão mediada por BiP é constituída de múltiplos mecanismos reguladores, sendo considerada complexa (Cascardo *et al.*, 2000; Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2016). As alternativas de modificações genéticas, baseadas em fatores regulatórios celulares são pouco exploradas, sendo o mecanismo de atuação de BiP, sobre a via de morte celular mediada por NRP/DCDs, não totalmente elucidado.

2.3 ZAR1: Um Receptor do Tipo RLK

O processo de aclimação das plantas requer uma fina regulação dos mecanismos moleculares. Estímulos extracelulares e intracelulares são percebidos por proteínas receptoras da membrana celular, desencadeando respostas diretas e/ou constitutivas, alterando a morfologia e a fisiologia no vegetal. Essas mudanças fisiológicas relacionadas com a aclimação não consistem em modificações genéticas e podem se reverter dinamicamente, sendo fundamentais para sobrevivência das plantas (Taiz *et al.*, 2017).

ZAR1 (*Zygotic Arrest1*) é uma proteína transmembrana pertencente à família de proteínas receptoras cinases RLKs. Estes receptores podem reconhecer sinais extracelulares na forma de ligante polipeptídico, desencadeando autofosforilações no domínio cinase – citoplasmática – e gera propagação de sinais. Em plantas, as RLKs apresentam um elevado grau de homologia do domínio cinase, entretanto os domínios extracelulares apresentam intensa divergência, por este motivo RLKs são classificadas com base no domínio extracelular (Walker, 1994). ZAR1 é uma RLK-LRR, pois além do domínio cinase (RLK), possui um receptor rico em leucina (LRR), sendo esta subfamília de proteínas considerada o maior grupo de RLKs em *Arabidopsis*.

A estrutura de ZAR1 é constituída por 716 aminoácidos, que formam o peptídeo sinal na região amino terminal, sete repetições de leucina, a porção transmembrana, o motivo de ligação a calmodulina (CaM), o motivo de ligação a

subunidade β da proteína G e um domínio serina/treonina cinase na região C-terminal (Figura 2).

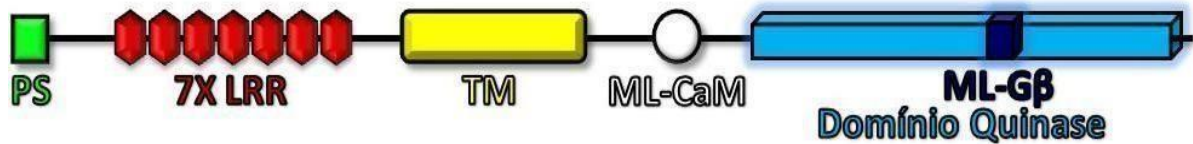


Figura 2: Apresentação esquemática da estrutura de ZAR1: PS representa o peptídeo sinal; LRR, repetição rica em leucina; TM, porção transmembranar; ML-CaM, o motivo de ligação à calmodulina; ML- β BS, motivo de ligação à subunidade β da proteína G.

Os estudos de proteínas RLK em vias de sinalização de plantas são muito promissores, pois estes reguladores endógenos são fundamentais desde a embriogênese até o estabelecimento da arquitetura do vegetal, bem como nas respostas fisiológicas ao estresse e no processo de aclimação. Especificamente ZAR1 é descrito na literatura como trivial na embriogênese de plantas de *Arabidopsis*. Mutantes nulos deste gene, não conseguem fazer corretamente a primeira divisão assimétrica do zigoto, prejudicando a formação do zigoto e o destino das células filhas posteriormente formadas (Yu *et al.*, 2016).

A proteína ZAR1 também pode interagir fisicamente com a proteína Calmodulina, o que sugere que a proteína esteja envolvida na sinalização por cálcio, funcionando como um integrador de membrana para sinais extrínsecos. ZAR1 também pode se integrar com a subunidade β da proteína G heterotrimérica, que está envolvida na transdução de sinais celulares, sendo considerado um mediador de vias metabólicas na forma de heterotrímero (Yu *et al.*, 2016).

2.4 Importância Fisiológica da Modificação Pós-Traducional em Resposta ao Estresse Abiótico

Modificações moleculares pós-traducionais de proteínas são alterações capazes de determinar a atividade, localização e interações de proteínas. Estas mudanças moleculares covalentes, podem proporcionar uma maior flexibilidade a maquinaria celular frente aos fatores ambientais nos processos de aclimação e nas respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Howden *et al.*, 2012). Essas mudanças pós-traducionais são dependentes de sinais moleculares e são importantes em vias de sinalização.

Dentre as alterações das proteínas que ocorrem após a tradução, as fosforilações ocupam uma posição de destaque, principalmente na regulação celular catalisadas por cinases. As fosforilações de proteínas ocorrem através da transferência de um grupo fosfato retirados de moléculas de ATP ou, em casos raros, de moléculas de GTP. Resíduos de aminoácidos como a serina, treonina e tirosina são responsáveis por receber a fosforilação. A fosforilação de resíduos de aminoácidos em resposta a estímulos extracelulares e intracelulares é um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas (Silva *et al.*, 2009).

A importância de modificações pós-traducionais em resposta a diferentes condições de estresse é justificativa de estudos de resposta à deficiência hídrica, à mudanças de temperaturas, salinidade e ataque de patógenos. Nos últimos anos muitos sítios de fosforilação de proteínas vegetais foram identificados por espectrometria de massas (Mayank *et al.*, 2012). A proteína ZAR1 na função de cinase tem potencial para se auto-fosforilar e fosforilar outras proteínas, podendo responder a estímulos ambientais e desencadeando cascatas de sinalização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais, cultivo das plantas de *Arabidopsis thaliana* e as posteriores análises fisiológicas, genéticas e bioquímicas foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), situado na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1 Genótipos Utilizados

Nos experimentos foram utilizadas plantas de *Arabidopsis* da variedade Columbia selvagem (Col0), superexpressando ZAR1 (ZAR1-pEarley103) e BiPD (BiPD-pBI123), com silenciamento gênico no gene *zar1* por RNAi (ZAR1-PK7GWIWG2) e com mutação em um dos alelos codificantes de ZAR1, de um códon de glutamina para um stop códon (EMS11). Para cada linhagem as condições experimentais e de cultivo foram de temperatura de 22°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

As plantas EMS11 utilizadas foram previamente modificadas por metagênese realizada pelo professor Pedro Augusto Braga dos Reis (Laboratório de Biologia Vegetal do Salk - PBIO, localizado na Califórnia, EUA). Utilizou-se o agente etanosulfato de metila (EMS), para alterar pontualmente bases nitrogenadas modificando a sequência do genoma das plantas. No processo de mutagênese 20.000 sementes da planta modelo *A. thaliana* foram embebidas em água destilada e agitadas um período de 24 horas.

Em seguida, as sementes hidratadas foram submersas em solução de EMS na concentração de 0,5%, e deixadas em agitação por 12 horas no interior de uma capela de exaustão. Subsequentemente, as sementes foram lavadas com água destilada, sob agitação de 15 minutos, esse processo de lavagem foi realizado por 3 vezes, e então as sementes foram secas em papel filtro. As 20.000 sementes mutagenizadas de *A. thaliana*, de linhagens superexpressando BiPD, foram germinadas em substrato comercial e submetidas as condições de cultivo padrão, havendo a obtenção da primeira geração (plantas M1). As seleções das sementes M1 foram realizadas por estresses de temperatura e déficit hídrico.

Para as linhagens transgênicas superexpressando ZAR1 foram utilizadas plantas transformadas como ZAR1-pEarley103 (pUFV3136). Esta construção permite a expressão de ZAR1 fusionado ao GFP na porção carboxi-terminal, sob o

controle do promotor 35S. Além disso, plantas de *Arabidopsis* foram transformadas com ZAR1-PK7GWIWG2 (pUFV3129), gerando plantas com silenciamento gênico de ZAR1, além de transformadas com a construção BiPD-pBI123, superexpressando BiPD.

3.2 Ensaio de Estresse Hídrico

Para os ensaios de indução de estresse hídrico, as plantas de *A. thaliana* foram plaqueadas em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) e incubadas em temperatura de 4°C por 3 dias. Então transferidas para uma incubadora com temperatura de 22°C, 70% de umidade, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro vermelho intenso/azul/vermelho distante (Philips® GreenPower production module LED, irradiância de 83 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para o crescimento de plântulas. Após 15 dias as plântulas foram transplantadas em vasos contendo substrato comercial, aclimatadas as condições do solo e da câmara de crescimento, com temperatura de 22°C, 70% de umidade, fotoperíodo de 16 horas de escuro e 8 horas de luz branca (Osram® LED Tubo, T8, 18W).

A aclimação ocorreu por três semanas com irrigação, duas a três vezes por semana, posteriormente, as plantas foram submetidas a um período de até 15 dias de restrição de água (sem irrigação), podendo variar conforme os valores aferidos do Teor Relativo de Água (TRA) das folhas. Para padronização do experimento todos os potes foram distribuídos aleatoriamente nas bandejas, e casualizados frequentemente, durante todo o período experimental. O status hídrico das plantas foi avaliado, utilizando o método de quantificação do teor relativo da água (TRA) de folhas inteiras, totalmente expandidas, com base na fórmula $\text{TRA} = [(\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / (\text{massa saturada} - \text{massa seca})] \times 100$ proposta por Weatherly (1950). Todas as análises foram realizadas em cinco tempos diferentes, no tempo 0 (no primeiro dia de tratamento sob estresse); tempo 1 (após 5 dias de restrição de água); tempo 2 (com 10 dias de restrição de água); tempo 3 (13° dia de restrição de água) e no tempo 4 (15 dias sob estresse hídrico). Ao final do experimento a taxa de sobrevivência foi quantificada pelo valor da razão $(\text{Número de sobreviventes} \times 100) / (\text{número Total de Plantas})$ e expressa em porcentagem.

3.3 Ensaio de Estresse no RE

Para induzir estresse no RE se utilizou a tunicamicina, um composto de antibióticos nucleósidos homólogos, agente causador do estresse no RE clássico em animais e plantas. Como controle dos tratamentos utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO).

3.4 Indução do Estresse no RE em Plântulas

Todos os nove genótipos (Col0, BiPDox, EMS11, 3 linhagens de ZAR1ox e 3 linhagens de zar1) foram inicialmente germinados em meio MS sólido ($\frac{1}{2}$ de força) (Murashige e Skoog, 1962). Após 11 dias foram transferidas para placas de 24 poços contendo meio MS líquido ($\frac{1}{4}$ de força) e deixadas aclimatando por 24h. Transcorrido esse período, a submissão ao estresse no RE foi iniciada substituindo o meio MS líquido ($\frac{1}{4}$ de força) por uma solução contendo tunicamicina (TUN) 2,5 $\mu\text{g/mL}$ no tratamento de estresse no RE, ou dimetilsulfóxido (DMSO) no tratamento controle, por 6 horas. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, sendo cada uma composta por 8 plântulas para o experimento de qRT-PCR.

3.5 Ensaio de Morte Celular pelo Método de Coloração com Azul de Evans

As plântulas de *Arabidopsis* foram submetidas as condições de estresse no RE, a partir do tratamento com uma solução de tunicamicina (10 $\mu\text{g/mL}$) em meio MS ($\frac{1}{4}$ força) líquido. Após as plântulas foram estressadas por 48 horas foram coradas com o corante azul de Evans lavadas em solução 2% (p/v) de corante em água, durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada até a total retirada da solução corante e fotografadas. Os tratamentos contaram com 4 repetições por linhagem utilizada. Como controle as plântulas foram tratadas com DMSO.

3.6 Estresse no RE por Infiltração em Folhas

Para a avaliação indireta da morte celular, foram realizadas infiltrações de tunicamicina em folhas de plantas *Arabidopsis* com 5 semanas após a germinação, conforme descrito por Cai *et al.* (2018). Tunicamicina a 15 $\mu\text{g/mL}$ (ou DMSO) foi infiltrada no mesófilo foliar, com auxílio de uma seringa. Incubadas sob condições de tratamento padrão por 4 dias. Em seguida as folhas infiltradas foram avaliadas para observação de possíveis alterações genótípicas e posteriormente fotografadas.

3.7. Ensaio de Estresse Osmótico

Para o ensaio de estresse osmótico, plântulas de 11 dias, germinadas em placas de Petri foram colocadas em solução contendo 90% (p/v) de meio MS líquido ($1/4$ de força) e 10% de polietilenoglicol (p/v). O controle foi realizado apenas com água, cada tratamento, compostas por 20 plântulas que foram posteriormente utilizadas no ensaio de fosforilação *in vivo*.

3.8 Fosforilação de Proteínas *in vivo*

Plantas ZAR1ox germinadas em placas e sob condições de cultivo mencionadas anteriormente, tiveram o estresse no RE induzido por tunicamicina a 2,5 µg/mL (ou DMSO) por 2 horas. Posteriormente 500 miligramas de tecido vegetal foram macerados para a extração das proteínas. Utilizou-se 500 µl de tampão de lise: glicerol 20%, Triton x-100 2%, EDTA (1 mM), NaCl (150 mM), Tris (50 mM), pH = 7,5 e inibidores de fosfatases. Sonicação (70A, por 6 segundos) o macerado foi centrifugado por 10 minutos a 16.000 rpm. O sobrenadante foi imunoprecipitado com anti-corpo anti-GFP por 12 horas, depois as proteínas foram incubadas com a resina proteína A sepharose (Sigma®) por 4 horas, sob suave agitação. As beads foram precipitadas, lavadas com o tampão de lise e eluídas a 65°C em tampão de amostra SDS-PEGE com 30 minutos. Um Western Blotting foi realizado com as proteínas imunoprecipitadas e a membrana foi revelada com anti-fosfoserina, anti-fosfotirosina, anti-fosfotreonina e anti-GFP.

3.9 Fosforilação de Proteínas *in vitro*

No ensaio de fosforilação *in vitro*, a porção citosólica de ZAR1 e de proteína RGS1 foram expressas em *E. Coli* da estirpe C41 (DE3), transformadas com as construções ZAR1-ct-pDest15 (pUFV3179) e RGS1-ct-pDEST15 (pUFV3187), ambas com cDNA do domínio cinase fusionados com GST. As confirmações se realizaram mediante PCR com os primers ZAR1-ct-Fwd, ZAR1-Rvs para ZAR1-ct, e pDEST15-FWD, RGS1-RVS para RGS1-ct, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados em confirmações por PCR.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene/sequência de anelção
ZAR1 Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTTGG CCTCGCTGATCATC	ZAR1
ZAR1 Rvs	AGAAAGCTGGGTCATCGCCGGCC ACGGGTAATC	ZAR1
MC36	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	35S
BiPD Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCTG GCTCGTGG	BiPD
BiPD Rvs	AGAAAGCTGGGTCTTCAGAGCTC ATCGTGAGA	BiPD
ZAR1-ct Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTACT GCTACTCAAAGTTCTG	ZAR1-ct
RGS1 Rvs	AGAAAGCTGGGTCACCGGGACTA CTGCAT	RGS1
pDEst15 Fwd	CCAATGTGCCTGGATGCGTTCC	T7

3.10 Expressão Heteróloga de ZAR1ct e RGS1ct

As ativações da expressão das proteínas heterólogas aconteceram após teste de temperatura ótima e de concentração de isopropil β -d-1-tiogalactopiranósido (IPTG) para indução das proteínas na fração solúvel. ZAR1-ct (carboxi-terminal) possuiu maior rendimento a temperatura de 28°C por 16 horas, com a adição de 0,4mM de IPTG, e por isso foi induzida sob estas condições. Já RGS1-ct foi melhor induzida a uma temperatura de 33°C por 16 horas, na presença de 0,4mM de IPTG.

Para extração das proteínas *E. Coli* da estirpe C41 (DE3) foram centrifugada (8.000 RPM) por 10 minutos à 4°C. O pellet de bactérias foi lisado em tampão com tris-HCl (20 mM), lisozima (0.1 mg/mL) e inibidores de proteinases em um pH 7,5 após 30 minutos sonicados por 15 segundos (70A) no gelo. Essa suspensão foi centrifugada a 8.000 RPM por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e utilizado na purificação das proteínas de interesse. A purificação ocorreu utilizando a resina cromatografica glutathione sepharose 4B (Invitrogen®), conforme especificações do fabricante.

3.11 Reação do Ensaio de Fosforilação *in vitro*

O tampão cinase contendo HEPES pH7,4 (50mM), $MnCl_2$ (10mM), $MgCl_2$ (10mM), DTT(1mM), ATP (10 μ M) e cerca de 2 μ M de cada proteína foram adicionados com um volume final de 30 μ l. A reação ocorreu por 30 minutos em temperatura ambiente e as fosfoproteínas foram detectadas por immunoblotting.

3.12 Western Blotting

A técnica de *western blotting* foi realizada em quatro etapas na seguinte ordem cronológica: proteínas das amostras foram fracionadas através do uso gel de poliacrilamida; posteriormente as proteínas foram transferidas para uma membrana de celulose; seguida da incubação da membrana com um anticorpo de detecção específico para cada proteína a ser analisada, por fim para a revelação das membrana sondadas se utilizou o equipamento Chemidoc (Bio-Rad®) (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981; Towbin e Gordon, 1984).

3.13 Extração de RNA de *A. thaliana* e síntese de cDNA

O processo de extração de RNA consistiu na utilização de Trizol (Invitrogen), seguido por precipitação com isopropanol. O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro (Evolution 60 Thermo Scientific®) e a integridade do RNA foi monitorada pela análise de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2%. Então cerca de 4 μ g de RNAs foram tratados com DNase livre de RNase (Invitrogen®) e utilizados para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen®) e oligo-dT (18), cumprindo-se as especificações do fabricante.

3.14 Real time PCR

Real time PCR foi realizado conforme informações dos manuais Applied Biosystems. As reações foram realizadas no equipamento ABI7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems®).

As reações de amplificação continham cDNA (20 ng), os primers forward e reverse (0,6 μ M) e o Master Mix (Applied Biosystems®) com SYBR® Green PCR (Applied Biosystems®). A temperatura inicial das reações foi de 95°C (10 minutos),

seguida de 40 ciclos de 15 segundos (94°C) e 1 minuto (60°C), finalizando a reação com a etapa de dissociação.

A expressão de genes foi avaliada utilizando o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta Ct}$. Os oligonucleotídeos específicos para os cDNAs dos tratamentos foram utilizados e o gene da actina foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados (Tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos e sequências dos primers utilizadas em qRT-PCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene/ Sequência de anelação
qRTACTINA Fwd	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC	Actina 3
qRTACTINA Rvs	ACACCGGATTCGTGCGGCAT	Actina 3
qRTZAR1 Fwd	GGATTGCTACAGGGCTTGTT	ZAR1
qRTZAR1 Rvs	GAATGTTGCTTGGCTTGAGA	ZAR1

3.15 Análises de Bioinformática

O domínio cinase dos genes ZAR1, FLS2, BR1, BAK1, SEK4, NIK1 e NIK2 foram preditos usando modelos ocultos de *markup* implementados, através software *hmmer* (www.hmmer.org/) e utilizando a base de dados *Pfam* (www.pfam.xfam.org/). As sequências dos domínios foram alinhadas com algoritmo de alinhamento global clustalo (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), com objetivo de identificar as regiões e os sítios de fosforilação conservados respectivamente. O agrupamento filogenético foi realizado inicialmente através do alinhamento de sequências usando o software Muscle (www.drive5.com/muscle/). O agrupamento filogenético conduzido com base no software FastTree (Price *et al.* 2010). A árvore foi visualizada e editada usando o software Figtree (Coombes *et al.* 2000). Os sítios de fosforização do domínio cinase de ZAR1 foram preditos usando o software NetPhos v.3.1 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/). A identificação dos motivos conservados nos domínios cinase e as posições dos motivos, foram identificados por meio do algoritmo MEME (“*Multiple Em for Motif Elicitation*”) (Bailey *et al.* 2015).

3.16 Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de biologia molecular que não são explicitamente detalhadas, incluindo preparação de plasmídeos, extração de DNA genômico, DNA plasmidial, dentre outras, serão conduzidas segundo protocolos fornecidos pelo fabricante ou segundo informações contidas em Sambrook *et al.* (1989).

3.17 Análise Estatística

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar se havia diferenças entre as médias, posteriormente um teste de média Tukey mostrou quais médias são iguais ou diferentes através das letras que elas possuem. Para as análises dos dados foi utilizado o software R.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliações Fenotípicas de Linhagens Transgênicas

O mecanismo de tolerância ao estresse por deficiência hídrica mediado por BiP não é totalmente elucidado e muitos intermediários envolvidos nesse processo de tolerância não são conhecidos. Considerando as lacunas envolvendo BiP na modulação da via PCD mediada por NRP/DCDs, técnicas de genética direta foram utilizadas para identificar proteínas e os mecanismos de ativação/modulação da via PCD.

Neste sentido, sementes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando BiPD (BiPDox) foram mutagenizadas pelo etanosulfato de metila (EMS) e um *screening* das sementes por choque térmico e estresse por deficiência hídrica foi realizado. As plantas com perda no fenótipo de tolerância ao estresse por deficiência hídrica foram selecionadas e tiveram o DNA genômico sequenciado, para o mapeamento dos genes mutagenizados (Miguel, 2019). Com base nas informações do sequenciamento um dos genes candidatos identificados foi ZAR1.

Experimentos para comprovação do envolvimento de ZAR1 no mecanismo de resposta a deficiência hídrica foram utilizados. Plantas transgênicas superexpressando ZAR1 (ZAR1ox pl.6, ZAR1ox pl.10 e ZAR1ox pl.13), com o gene *zar1* silenciado (*zar1* pl.7, *zar1* pl.8 e *zar1* pl.10) (Figura 3). Além das linhagens de planta controle (Col0), transgênicos BiPDox, e das plantas BiPDox e mutagenizada pelo EMS no gene *zar1* (EMS11).

Os resultados das avaliações realizadas após a submissão de plantas ao déficit hídrico demonstraram, uma variação fenotípica entre as linhagens controle (Col0), superexpressando BiPDox e ZAR1, silenciada ou mutagenizada em *zar1*. Plantas das linhagens com expressão de *zar1* diminuída foram mais suscetíveis ao déficit hídrico, conseqüentemente plantas das linhagens modificadas para aumento da expressão de ZAR1 apresentaram ganho de tolerância a condições de restrição de água quando comparadas com a Col0 (Figura 4, Figura 5).

As linhagens silenciadas para *zar1* (*zar1*-pl.7, *zar1*-pl.8, *zar1*-pl.10), conjuntamente com as plantas EMS11, foram as que primeiro apresentaram perda na turgescência, evidenciada no 10º dia de estresse hídrico. Além disso, neste período as senescências das folhas foram aceleradas como amarelamento precoce nos tecidos fotossintetizantes (Figura 3). Valores do teor relativo de água das folhas

(TRA) declinaram com maior intensidade nas linhagens com a menor expressão de *zar1* (Figura 4B).

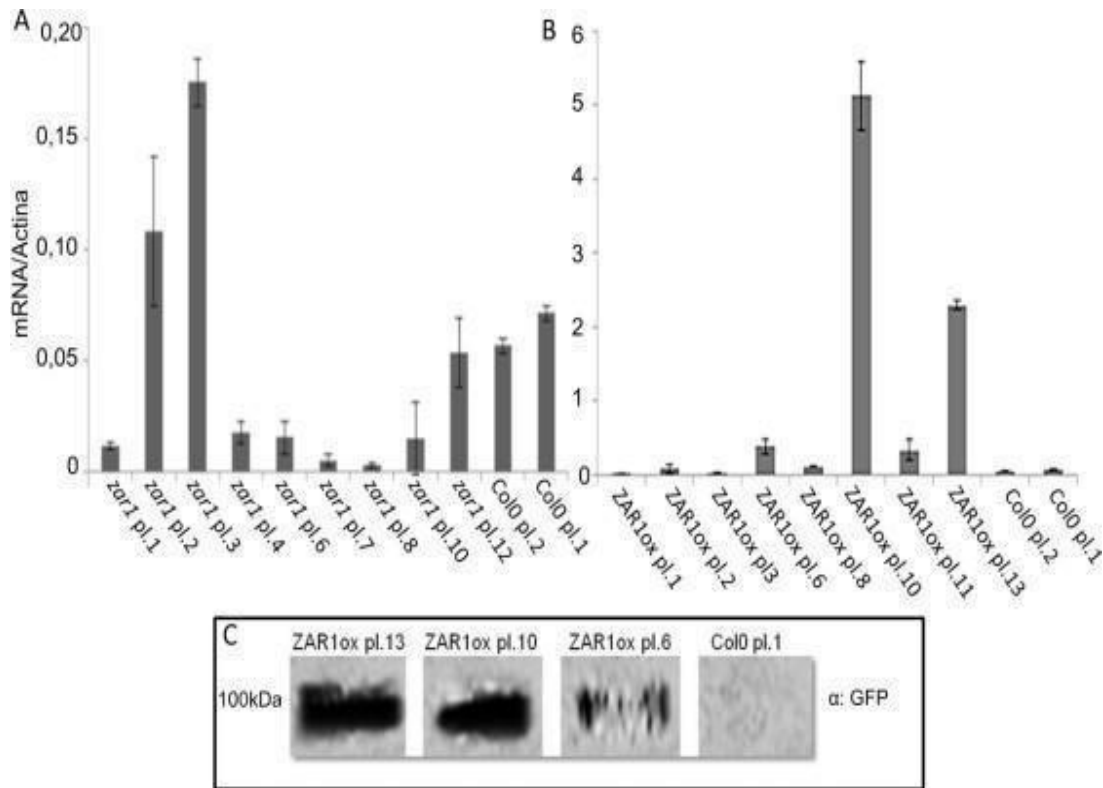


Figura 3: Caracterização fenotípica. (A) qRT-PCR de plantas ZAR1ox (linhagens selecionadas pl.6, 10 e 13). (B) qRT-PCR *zar1* as linhagens selecionadas pl.7, 8 e 10. (C) Werther Brotting ZAR1ox (ZAR1 (78kDa)+ GFP com (26kDa) tamanho aparente de 104kDa, membrada revelada com anti-GFP.

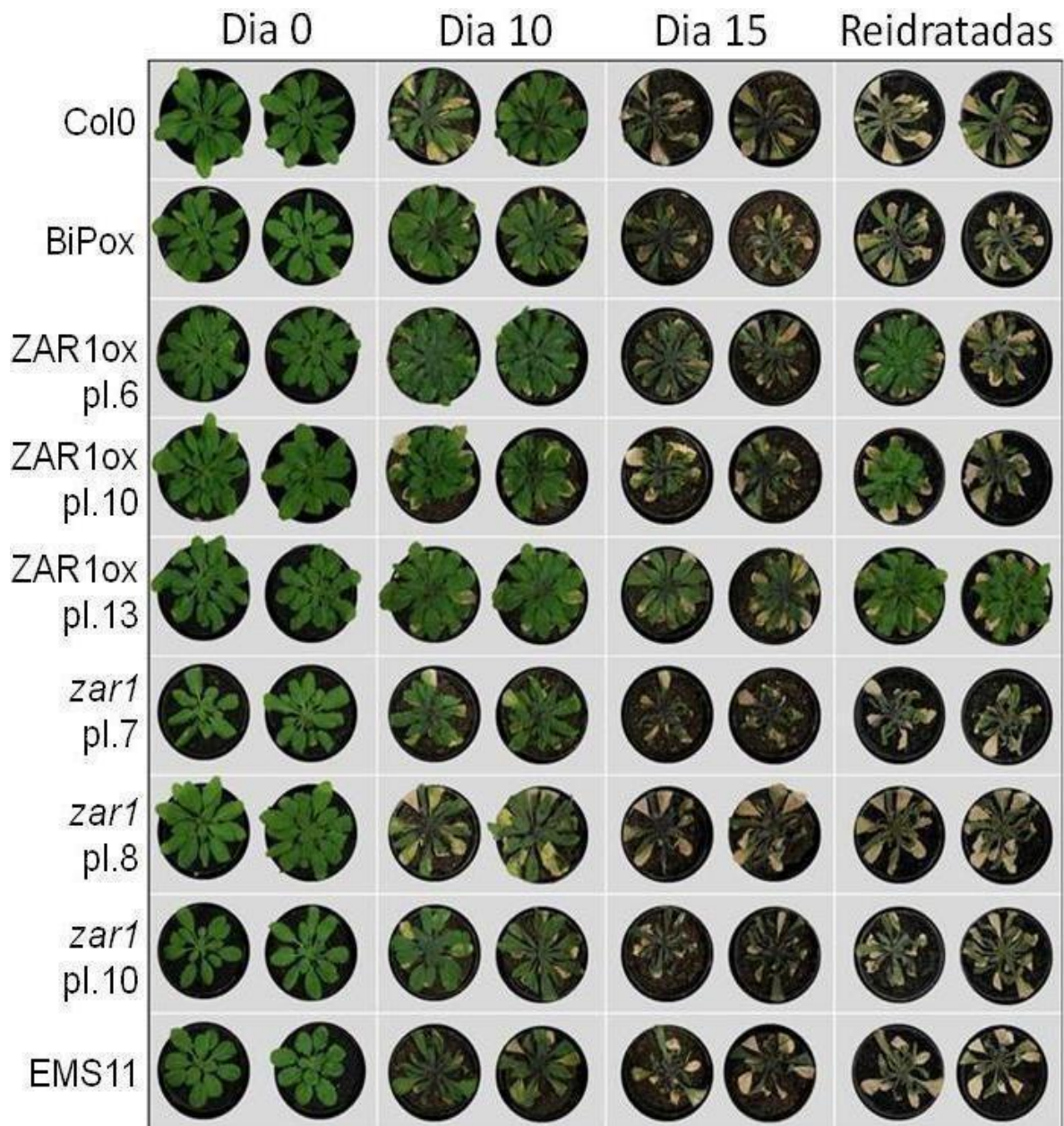


Figura 4: Plantas de *Arabidopsis* das linhagens Col0, BiPDox, ZAR1ox, *zar1* e mutagenizada por EMS no gene *zar1* (EMS11) submetidas a déficit hídrico e posteriormente irrigadas. Fotos das plantas com restrição de água no dia 0, 10, 15 e reidratadas. Experimento com cerca de 25 plantas por linhagem realizado 2 vezes.

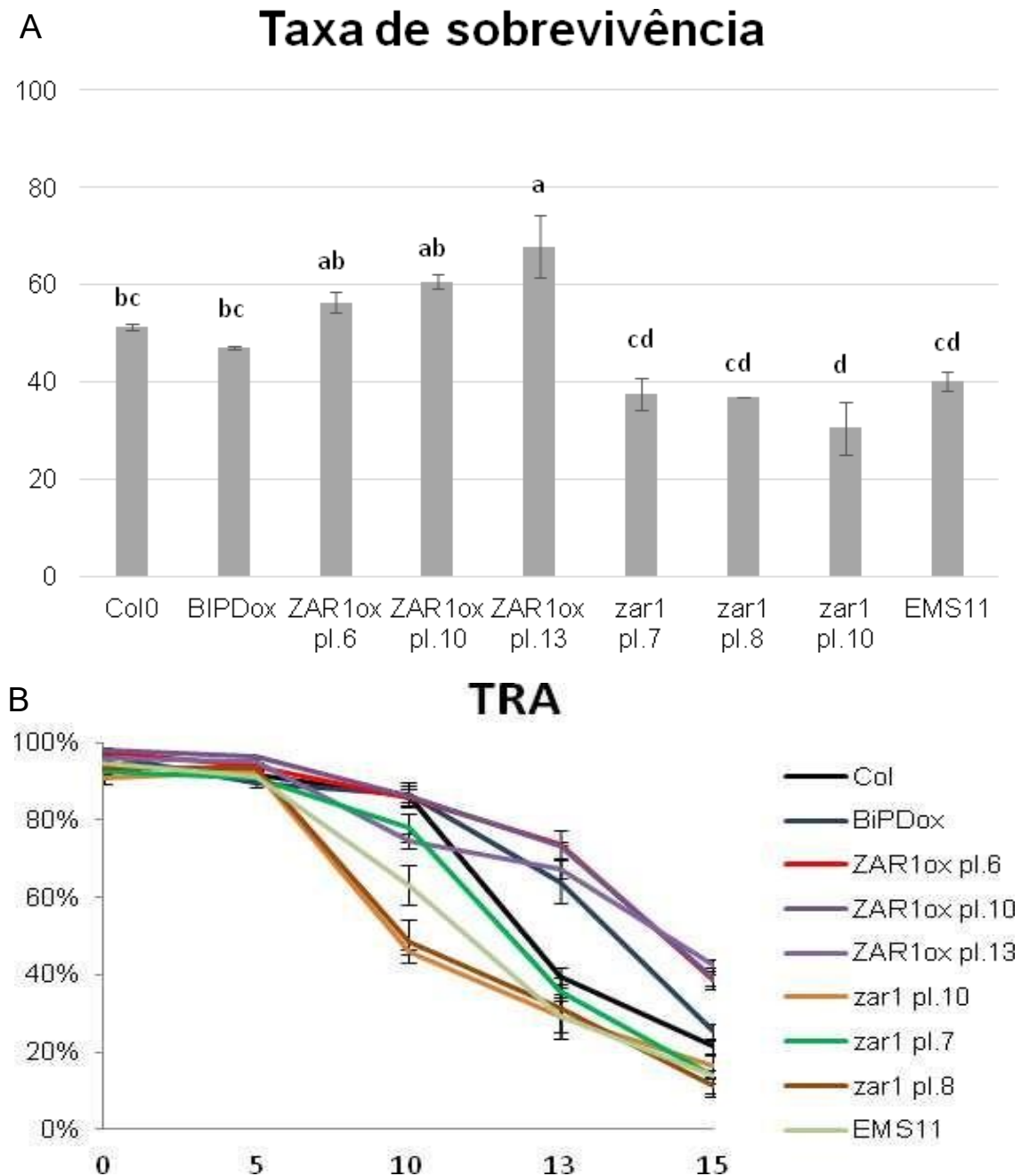


Figura 5: Plantas de *Arabidopsis* das linhagens Col0, BiPDox, ZAR1ox, *zar1* e mutagenizada por EMS no gene *zar1* (EMS11) submetidas a déficit hídrico e posteriormente irrigadas. (A) Taxa de sobrevivência em porcentagem. (B) Teor relativo de água foliar (TRA) ao longo dos dias. O experimento foi realizado duas vezes com cerca de 25 plantas a cada vez, para as médias de TRA houveram 3 repetição por período. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar se havia diferenças entre as médias, posteriormente um teste de média Tukey mostrou quais diferiram. Barras \pm erro-padrão acompanhados de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) as análises dos dados foi utilizado o software R.

4.2 A Superexpressão de ZAR1 Ameniza os Sintomas de Morte Celular Induzida por Estresse no RE

Para avaliar o efeito do estresse no RE, plantas Col0, BiPDox, ZAR1ox, EMS11 e *zar1* foram mergulhadas em solução de tunicamicina por 48h. Todas as plântulas submetidas à tunicamicina sofreram o estresse no RE, porém esse estresse se intensificou nas linhagens com a expressão de *zar1* comprometida (*zar1-pl.7*, *zar1-pl.8*, *zar1-pl.10* e EMS11). Ocorreu também atenuação do estresse no RE nas linhagens BiPDox e ZAR1ox (Figura 6).

No experimento realizado com plântulas, o estresse foi avaliado pela morte de tecidos, na comparação o corante de morte celular azul de Evans foi utilizado e a intensidade da coloração foi parâmetro de observação usado principalmente nas observações realizadas em folhas e caules das diferentes linhagens.

As raízes devido a grande facilidade de absorção da solução apresentaram a coloração azulada padrão em todas as linhagens, independente do tratamento. Consequentemente, nesses tecidos a coloração azul não foi considerada como marcação de morte celular. Contudo nos tecidos fotossintéticos das linhagens *zar1* e EMS11 notou-se mais proeminente as marcas de morte celular, demonstrando que para estas linhagens houve mais danos teciduais.

4.3 Plantas ZAR1ox Apresentam Retardo na Senescência Foliar Induzida por Estresse no RE.

A indução ao estresse no RE por infiltração, ocorreu por injeção de tunicamicina no mesofilo foliar e o estresse foi observado devido às alterações de coloração no limbo foliar. Regiões de amarelecimento sugerem degradação da clorofila, que é uma característica da senescência precoce provocada pelo estresse no RE. Observando esse parâmetro a superexpressão ZAR1ox demonstrou atenuar o estresse no RE, resultado que é observado com mais clareza nas linhagens ZAR1ox-pl.10 e ZAR1ox-pl.13 que preservaram mais seus tecidos fotossintetizantes em condições de estresse no RE (Figura 7).

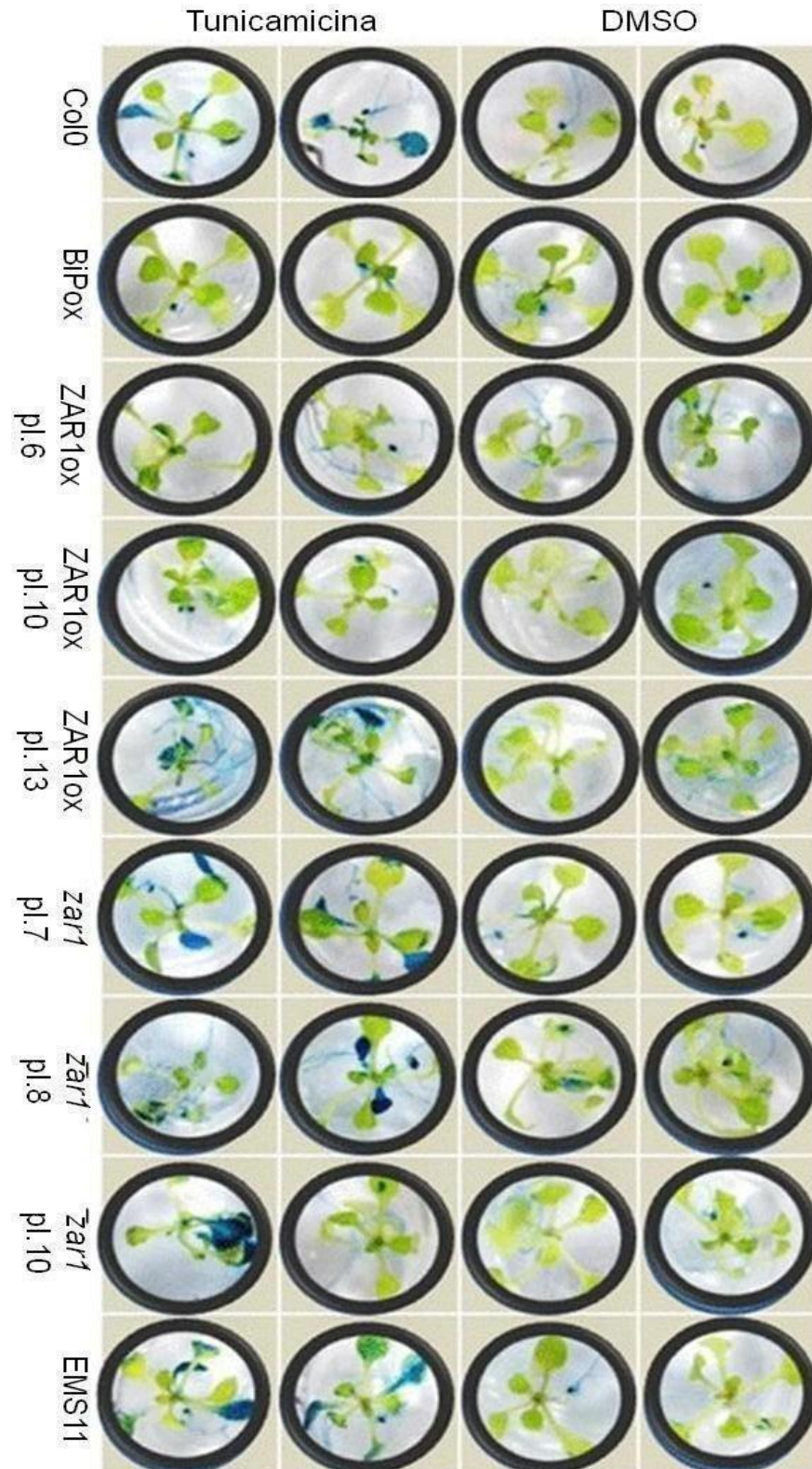


Figura 6: Estresse no Retículo Endoplasmático (RE): Linhagens Col0, BiPDox, ZAR1ox, *zar1* e EMS11 submetidas ao estresse no RE. Plântulas de *Arabidopsis* com 11 dias foram embebidas em solução com tunicamicina (5 μ mL) ou DMSO e após 48 horas coradas com azul de Evans.

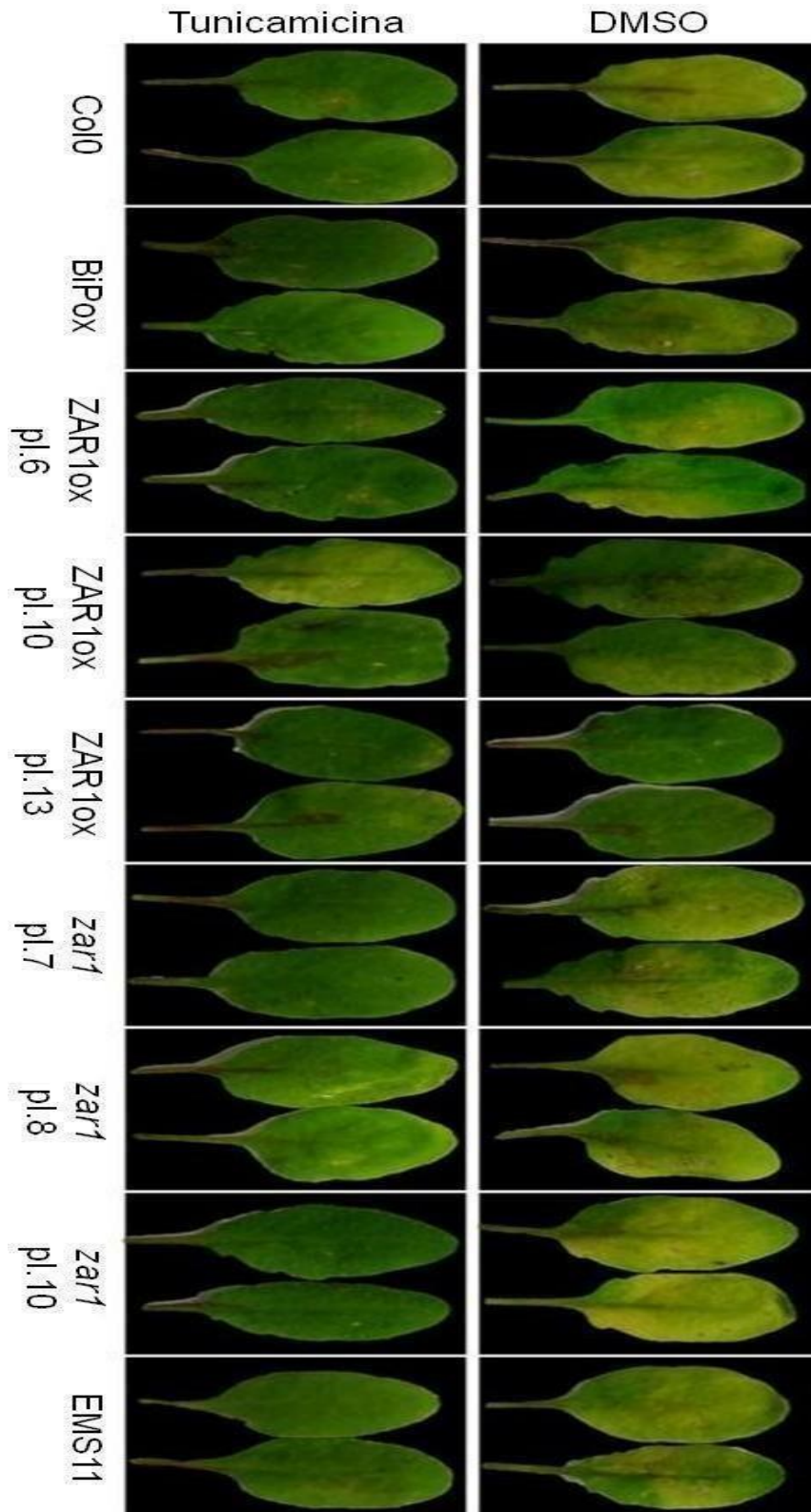


Figura 7: Estresse no Retículo Endoplasmático (RE): Linhagens Col0, BiPDox, ZAR1ox, *zar1* e EMS11 submetidas ao estresse no RE. Folhas de 5 semanas infiltradas com tunicamicina (10 μ /mL) ou DMSO após 4 dias.

4.4 Ensaio de Fosforilação *in vivo*

Para entender o envolvimento de ZAR1 no mecanismo de tolerância a estresse no RE, estresse por deficiência hídrica e caracterizar a função fisiológica deste gene, no processo de tolerância ao estresse abiótico foi realizado o ensaio de fosforilação *in vivo*. Plantas de ZAR1ox foram submetidas a estresse no RE (induzido por tunicamicina, com duração de 2 horas) e estresse osmótico (provocado por PEG, durante 6 horas). Como resultado pode se constatar que, ambos os estresses são capazes de ativar modificações pós-traducionais em ZAR1 (Figura 8 e Figura 9).

Para avaliar presença de fosforilação induzida por estresse, ZAR1 fusionada a GFP foi imunoprecipitada após as plantas serem induzidas ao estresse no RE (tunicamicina) ou osmótico (PEG) a fosforilação é evidenciada por imunoblotting. Resíduos dos aminoácidos serina e tirosina em ZAR1 foram detectados após a proteína ser sondada com anticorpos anti-fosforilação. A fosforilação de ZAR1 de plantas não submetidas a estresse no RE ou osmótico não foram notadas, quando a proteína foi sondada com anti-fosfoserina e anti-fosfotirosina.

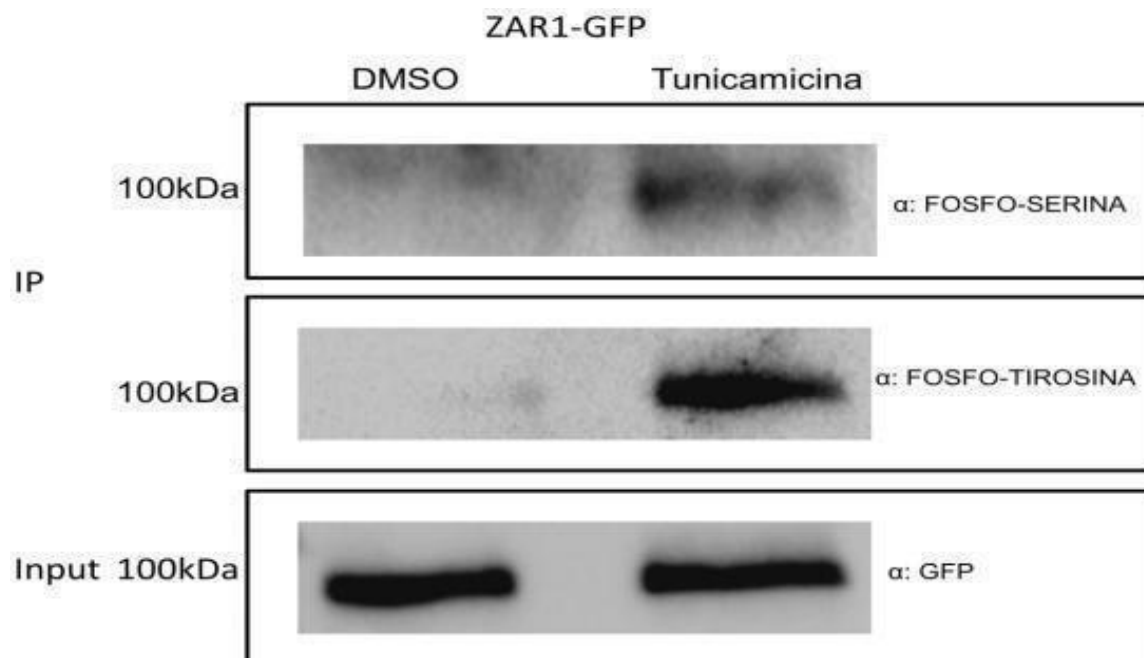


Figura 8: ZAR1 sob estresse no RE é fosforilada: Plantas transformadas com ZAR1-pEarly103 tiveram ZAR1 ativada na presença de agente causador de estresse no RE (tunicamicina-10 μ /mL) após 2 horas: O tratamento controle foi realizado com DMSO (10 μ /mL). A proteína ZAR1 foi imunoprecipitada com anti-GFP, e incubado com anticorpos anti-fosforilação.

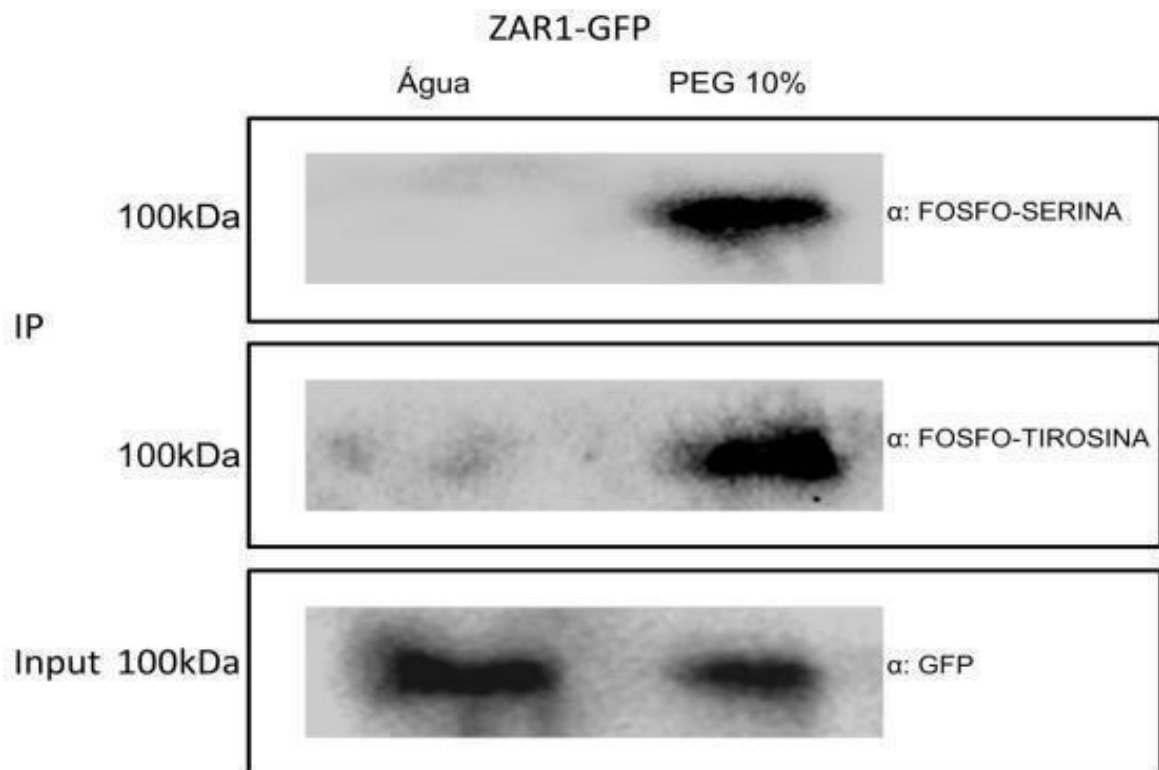


Figura 9: ZAR1 sob estresse osmótico é fosforilada: Plantas transgênicas ZAR1ox sob estresse osmótico causado por PEG. O tratamento teve um período de 6 horas. A proteína ZAR1 fusionada em GFP foi imunoprecipitada e revelada com anticorpo anti-fosfoserina, anti-fosfotirosina e anti-GFP.

4.5 Predições de Sítios de Fosforilação e Filogenia por Bioinformática

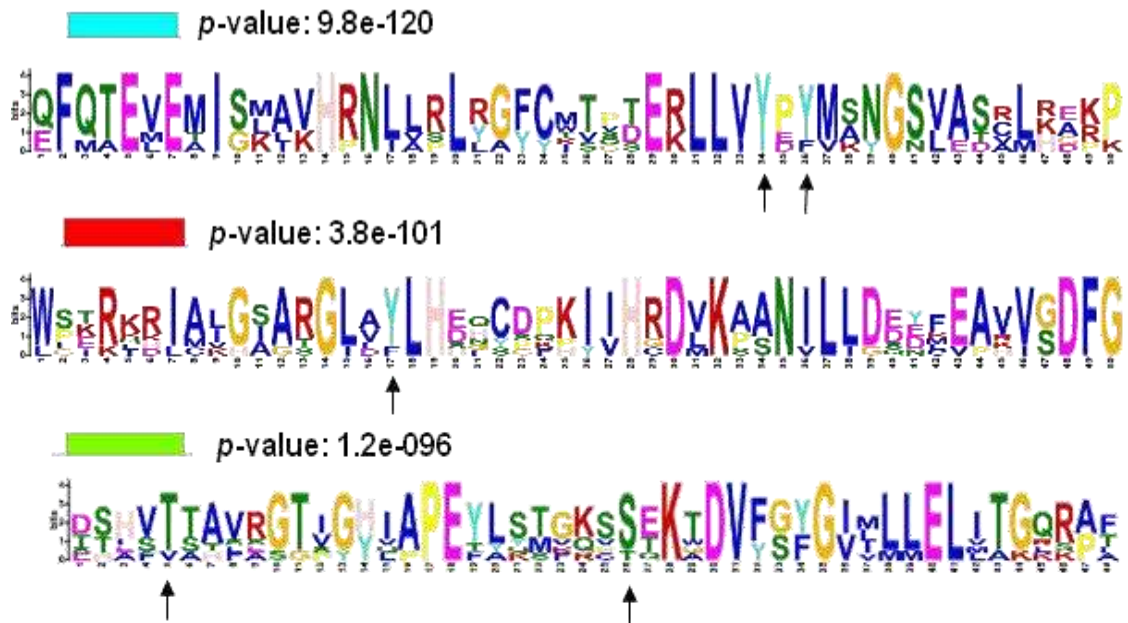
As proteínas cinases são ativadas ou desativadas por fosforilação, algumas vezes pela própria cinase (por cisfosforilação/autofosforilação) (Marshall *et al.*, 2012). E como a chave para ativação e resposta ao estresse o domínio cinase dos genes ZAR1, de outras RLKs (FLS2, BR1, BAK1, SEK4, NIK1 e NIK2) foram preditos, as sequências dos domínios foram alinhadas, as regiões e os sítios de fosforilação conservados identificados (Figura 10).



Figura 10: O domínio cinase dos genes ZAR1, FLS2, BR1, BAK1, SEK4, NIK1 e NIK2 foram preditos usando modelos ocultos de markup implementados, através software hmmer e utilizando a base de dados Pfam. As sequências dos domínios foram alinhadas com algoritmo de alinhamento global clustalo com objetivo de identificar as regiões e os sítios de fosforilação conservados respectivamente. As regiões de destacadas em azul representam os sítios de fosforilação com maior homologia de ZAR1 com as RLKs alinhadas. E as regiões destacadas em preto ao as com maior probabilidade de sofrerem fosforilação com os respectivos valores de probabilidade escritos acima.

Os sítios de fosforilação localizados nos domínio cinase de ZAR1 foram preditos e a posição das regiões conservadas na porção cinase de ZAR1 localizadas. A identificação dos motivos conservados nos domínios cinase e as posições dos motivos foram ilustradas na Figura 11 e Tabela 3, e revelaram elevado nível de homologia nas regiões em azul, vermelho e verde.

A Sequências dos domínios conservados da porção Cinase das LRR-RLKs



B Esquema das porções conservadas na porção cinase das LRR-RLKs

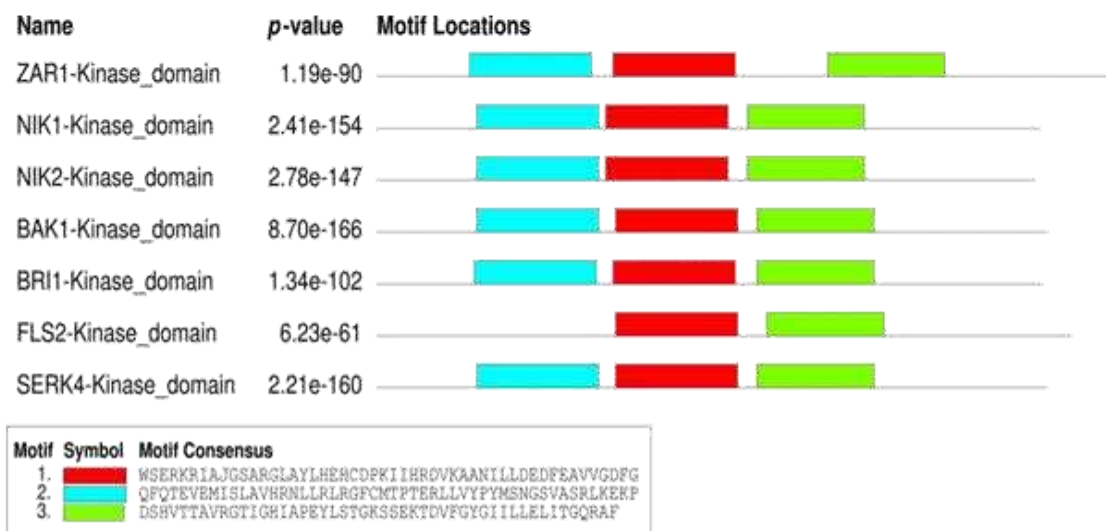


Figura 11: O domínio cinase de ZAR1, FLS2, BR1, BAK1, SEK4, NIK1 e NIK2. Os sítios de fosforização do domínio cinase de ZAR1 foram preditos usando o software NetPhos v.3. A identificação dos motivos conservados nos domínios cinase e as posições dos motivos, foram identificados por meio do algoritmo MEME (Bailey *et al.* 2015).

Tabela 3: sequências de ZAR1 com sítios de fosforilação conservados. As sequências grifadas foram as que apresentaram maiores valores segundo a análise gerada no NetPhos (versão 3.1).

Pos	AA	Context	Score	Kinase
42	T	<u>KEFQTEVEA</u>	0.968	Unsp
119	S	LHEFSPKKY	0.980	Unsp
123	Y	SPKKYVHGD	0.824	Unsp
159	S	AGGSSPTIQ	0.826	Unsp
186	S	HKSVSSEFT	0.967	Unsp
193	S	FTAHSSSGS	0.826	Unsp
197	S	SSSGSYQQA	0.867	Unsp
198	Y	SSGSYYQAP	0.877	unsp
204	T	QAPETLKMV	0.854	PKC
211	S	<u>MVKPSQKWD</u>	0.993	Unsp
239	S	EVGTSEMDL	0.983	Unsp
271	T	PEAETEDI	0.849	unsp
288	S	SCVNSSPEK	0.895	unsp
289	S	<u>CVNSSPEKR</u>	0.987	unsp
295	T	<u>EKRPTMRHV</u>	0.914	Unsp
300	S	MRHVSDT--	0.838	unsp

4.6 ZAR1 Pode Fosforilar RGS1

As RLKs frequentemente são ativadas em resposta a sinais extracelulares ou intracelulares, se autofosforilam e interagem fosforilando outra proteína e iniciando uma cadeia de resposta. Ensaios de interação de proteínas *in vivo* demonstraram que ZAR1 pode interagir com RGS1 (proteína que Regula a Sinalização das proteínas G heterotrimérica) envolvidas em diversas respostas celulares (Miguel, 2019).

Com base nestes resultados um ensaio de fosforilação *in vitro* para testar a capacidade de ZAR1 de fosforilar RGS1 foi realizado. Para isto o carboxiterminal de ZAR1(50kDa) foi fusionado a GST (26kDa), assim como RGS1(24kDa) fusionado a GST (26kDa) foram expressos em *E. Coli* e purificados por cromatografia de afinidade.

Os resultados comprovam que ZAR1 fosforila RGS1 em resíduos de serina (Figura 7). Apesar de no input das proteínas ZAR1 apresentar uma banda fraca, devido à baixa concentração de ZAR1 purificada. RGS1 é claramente fosforilada na presença de ZAR1, enquanto no controle com apenas a proteína RGS1 na presença de ATP, RGS1 não apresentou resíduos de fosforilação.

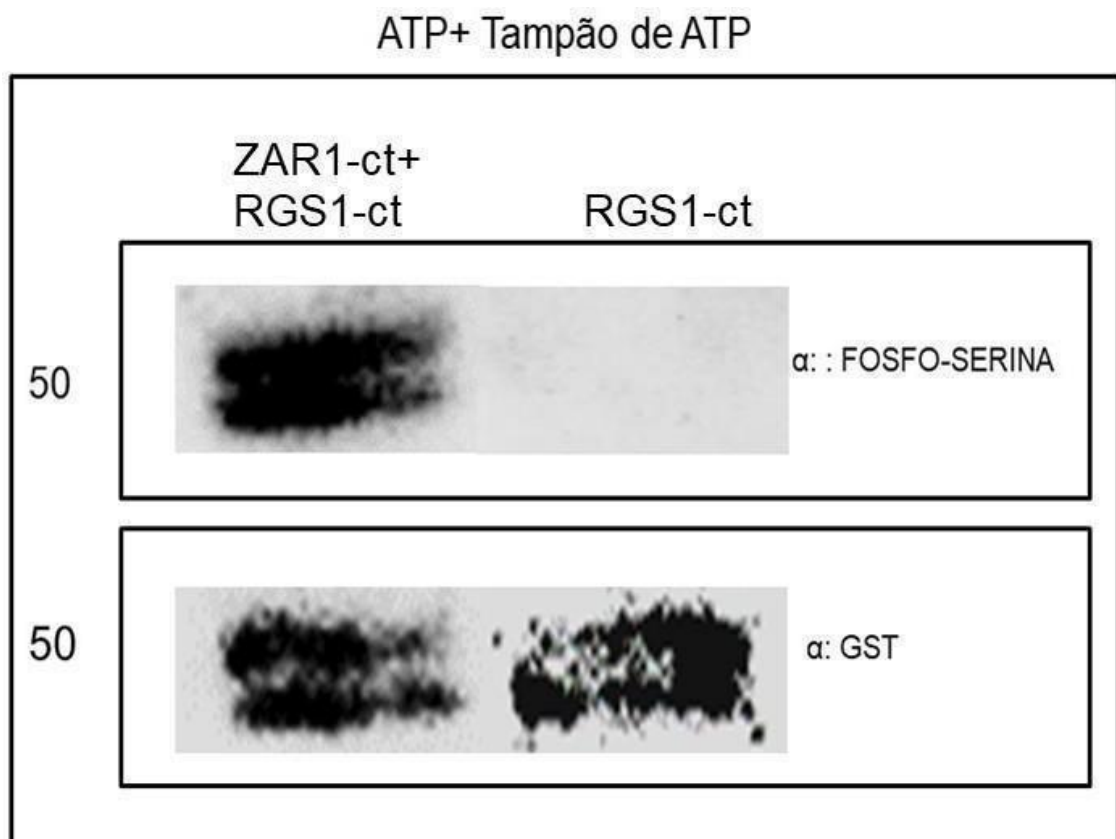


Figura 7: Ensaio de fosforilação *in vitro*. Proteínas RGS1ct e ZAR1ct fusionadas a tag GST, sondadas com anti-fosfoserina e anti-GST. A porção citosólica de RGS1ct apresenta em torno de 24kDa e a tag GST possui tamanho aparente de 26kDa, portanto a proteína marcada pelos anticorpos tem tamanho aparente de aproximadamente 50kDa.

5. DISCUSSÃO

5.1 ZAR1 Possível Supressor da Via de Morte Celular Mediada por NRP/DCDs e Modulada por BiP

Estudos da via de morte celular mediada por NRP/DCDs em condições de estresse demonstram BiPD como um modulador negativo da via, capaz de conferir tolerância a estresse abiótico. Pesquisas utilizando plantas superexpressando a proteína BiP em soja (*Glycine max*) e em tabaco (*Nicotiana tabacum*) revelam que esses transgênicos apresentam um retardo na senescência foliar e na murcha das folhas induzida pela deficiência hídrica (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011, Reis *et al.*, 2016).

Apesar do envolvimento de BiPD na via de morte celular mediada por NRP/DCDs, os mecanismos de atuação e mediadores do processo não são bem compreendidos, havendo a necessidade de buscar mediadores relacionados. Com base nisto um *screening* de sementes BiPDox mutagenizadas foi realizado por estresse hídrico. E revelou ZAR1 como um possível atenuador da resposta a deficiência hídrica.

Novos experimentos foram conduzidos para investigar o envolvimento de ZAR1 nos mecanismos de reposta a diferentes estresses abióticos. Os dados do estresse no RE e por deficiência hídrica revelaram que plantas silenciadas de *zar1* por RNA de interferência apresentaram fenótipo de susceptibilidade ao estresse no RE e estresse por deficiência hídrica, essa sensibilidade ao estresse abiótico também foi notada em plantas BiPox mutagenizadas (EMS11), que apresentam a expressão de ZAR1 comprometida.

No último caso, o comprometimento na expressão de ZAR1 ocorreu por uma alteração em um dos alelos que codifica ZAR1, no códon do aminoácido 144, localizado na quarta repetição de leucina do receptor de ZAR1. Nesta região a base citosina é substituída por uma timina, havendo a modificação do códon de glutamina (Q) por um *stop* códon (*) (Tabela S1 do Anexo 2). As plantas utilizadas nos experimentos possuem a mutação em heterozigose, pois ZAR1 é um gene deletério, necessário no processo de divisão assimétrica do zigoto, essencial para formação do zigoto e para o destino das células filha, posteriormente formada em plantas de *Arabidopsis* (Yu *et al.*, 2016).

Reforçando o envolvimento de ZAR1 no processo de tolerância ao estresse no RE e por deficiência hídrica, as linhagens de ZAR1ox apresentaram um fenótipo de tolerância maior que a linhagem controle (Col0), ou seja, o aumento da expressão de ZAR1 conferiu tolerância aos estresses abióticos testados.

No experimento de estresse hídrico o teor relativo de água das folhas (TRA), se manteve elevado até o 13° dia de restrição de água em plantas superexpressando ZAR1, assim como as BiPDox. Conseqüentemente, foi observado que plantas com a expressão de ZAR1 comprometida, tiveram uma queda radical do TRA desde o 10° dia de restrição de água, com murcha aparente das folhas.

BiP pode ativar atividades fisiológicas em plantas, como a fotossíntese mesmo com restrição de água, devido ao acúmulo de solutos osmoticamente ativos, como aminoácidos primários vindos da degradação de proteínas na célula, que propiciam a manutenção do turgor celular no genótipo transgênico sob condições de restrição de água (Coutinho *et al.*, 2019). A sensibilidade de plantas com pouca expressão de *zar1* ao estresse no RE também foi notada devido ao amarelamento em folhas que é um indício de perda da clorofila e indica a ativação de processos de senescência (Costa *et al.*, 2008).

5.2 ZAR1 Sofre Modificações Pós-Traducionais Sob Estresse no RE e Osmótico

A proteína ZAR1 pertence a superfamília RLK, esse grupo de cinases são altamente reguladas, sendo ativadas ou desativadas por fosforilação, essa mudança geralmente ocorre mediante a respostas de estímulos, podendo levar a ativação de cascatas de fosforilação de proteínas, sendo considerada um fator chave na resposta precoce ao estresse. Sob condições de deficiência hídrica ou estresse osmótico, várias proteínas RLK foram descritas como transdutores de sinal, muitas das vezes envolvidas no reconhecimento precoce de sinais externos e tradução para respostas celulares (Ramegowda *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014). Essa resposta precoce propicia condições para que o vegetal consiga melhor tolerar condições adversas, no processo de aclimação e de resposta ao estresse podendo conferir tolerância ao estresse ambiental.

A fosforilação de ZAR1 em plantas de *Arabidopsis* submetidas à estresse no RE é um indício do envolvimento desta RLK no processo de resposta ao estresse no

RE, esta organela é chave nos processos de resposta a diversos estresses, sendo altamente dinâmica, compartimentalizada e com organização complexa. Além de ser considerada como o principal compartimento de biossíntese e de fluxo de membranas (Mollenhauer e Morré, 1980). Portanto possuindo potencial para agir como portal da via secretória, sendo imprescindível para a fina regulação da concentração de cálcio (Staehelin, 1997).

Nas plantas, vários receptores de cálcio são essenciais para as respostas aos estímulos endógenos e ambientais. As cinases RLKs (Receptor-Like Kinases) conferem uma fina regulação considerada indispensável para a sobrevivência da planta (Souza *et al.*, 2006; Ramegowda *et al.*, 2014). ZAR1 uma RLK do tipo RRL possui capacidade de interagir com a calmodulina (CaM) na membrana plasmática por meio de seu motivo de ligação a CaM, um forte indício do envolvimento desta proteína na sinalização de cálcio (Yu *et al.*, 2016).

Predições de bioinformática com alinhamento de ZAR1 e outras RLKs importantes no processo de resposta à estresse foram realizadas e foram constatados vários sítios de fosforilação em ZAR1, alguns com homologia a sítios de auto-fosforilação de outras RLKs (ANEXOS 1, 2 e 3). Contudo, os testes de fosforilação *in vivo* de ZAR1 induzida por estresse foram realizados, considerando que proteínas cinases são conhecidas por sua importância em sinalização celular e participação ativa na aclimatação às mudanças ambientais, sendo ativadas ou desativadas por fosforilação. Essa resposta é iniciada, por vezes, pela própria proteína cinase, por cisfosforilação/autofosforilação (Marshall *et al.*, 2012).

A fosforilação de ZAR1 em condições de estresse no RE (provocado por tunicamicina), e estresse osmótico (induzido por PEG), sugere a ativação de cascatas de fosforilação e que ZAR1 pode ser uma proteína chave na resposta a estes estresses abióticos. A literatura demonstra exemplos de outras RLKs, que em condições de seca atuam como transdutores de sinal (Ramegowda *et al.*, 2014). A sinalização RLKs desempenham papéis críticos principalmente na regulação do desenvolvimento e na sinalização de resistência a doenças em plantas. Algumas RLK demonstram estarem envolvidas em respostas ao estresse abiótico, incluindo respostas hormonais, sinalização de cálcio, defesa antioxidante e contra estresse abiótico, como estresse salino, por frio, metais tóxicos e incluindo à seca (Tanaka *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2017).

5.3 ZAR1 Fosforila RGS1

As linhas de evidências indicam que ZAR1 é capaz de interagir com outras proteínas e desencadear respostas de nível regulatório. Experimentos demonstraram que ZAR1 interage fisicamente com Calmodulina, sugerindo que ZAR1 funciona como um receptor de membrana que reconhece sinal de cálcio. Além disso, ZAR1 pode interagir com a proteína AGB1, que é componente importante em vias de sinalização de resposta intracelular no controle do crescimento, desenvolvimento, na resposta hormonal e à estresses (Yu *et al.*, 2016).

Em *Arabidopsis*, as proteínas G (heterotriméricas) podem possuir uma subunidade α (AtGPA1), β (AtAGB1) e uma γ (AtAGG1, AtAGG2, AtAGG3) (Gilman, 1987). Yu *et al.* (2016) provou que ZAR1 interage com a subunidade β da proteína G (AGB1) e que essa interação é indispensável no processo de desenvolvimento embrionário. Além disso, a sinalização realizada por proteínas G pode ser modulada pela proteína RGS1 (Regulador da Sinalização da Proteína G1) (Chen *et al.*, 2006). Quando fosforilada, RGS1 pode ser endocitada e se desligar do complexo ocorrendo a ativação da sinalização da proteína G (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2016).

Plantas com a expressão de proteínas G comprometida possuem problemas de desenvolvimento e se tornam mais sensíveis a algumas condições de estresse (Ullah *et al.*, 2001; Ullah *et al.*, 2002; Lease *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2015). Entretanto, o silenciamento gênico da subunidade $G\beta$, em *Arabidopsis*, promove tolerância em condições de restrição de água (Xu *et al.*, 2015).

Também foi comprovado que AGB1 ($G\beta$) são mais tolerantes ao estresse no RE, pois plantas mutantes *agb1* apresentam reperto na morte celular induzida por tunicamicina, comparadas com plantas que controle (Col-0) e mutantes para subunidade α da Proteína G ($G\alpha$) (Wang *et al.*, 2007). Demonstrando que a modulação da proteína G pode conferir tolerância ou sensibilidade ao estresse abiótico.

Predições do gene de RGS1 em *Arabidopsis* de mostram que RGS1 pode ser fosforilada em nove resíduos diferentes e por diversas cinases do tipo receptor (RLKs). Essas modificações pós-traducionais podem ser, o principal fator que confere a discriminação da sinalização da proteína G em plantas (Peng *et al.*, 2018; Tunc-Ozdemir *et al.*, 2017).

Dados comprovam que ZAR1 pode interagir fisicamente com RGS1 (Miguel, 2019). Por todas essas linhas de evidências, um ensaio de fosforilação *in vitro* foi realizado e comprovou que ZAR1 é capaz de fosforilar RGS1, indicando que ZAR1 pode desencadear respostas de nível regulatório envolvendo a regulação de RGS1 sobre a proteína G heterotrimérica.

6. CONCLUSÃO

Os experimentos demonstraram que o nível de expressão de ZAR1 altera o fenótipo de plantas de *A. thaliana*, plantas com a expressão de ZAR1 comprometida são mais sensíveis ao estresse do RE e estresse hídrico, enquanto plantas superexpressão ZAR1 apresentam fenótipo de tolerância quando comparada com plantas controles (Col0).

Ensaio de fosforilação *in vivo* de ZAR1 indicam que essa RLK é fosforilada em condições de estresse no RE e também quando submetida ao estresse osmótico. Essa fosforilação em RLKs pode significar a ativação de uma cascata de sinalização que se inicia com a auto-fosforilação de ZAR1 e a fosforilação de outra proteína, iniciando a resposta induzida por estresse no RE e osmótico que podem convergir sinergicamente.

O experimento de fosforilação *in vitro* demonstrou que ZAR1 é capaz de fosforilar RGS1, o regulador da sinalização de proteína G, uma vez que sua fosforilação o desliga da proteína G, ativando a via de sinalização. Desta maneira, ZAR1 pode atuar como um modulador da via de proteínas G heterotrimericas através da interação/modulação de RGS1. Além de possivelmente está envolvida em processos de aclimação de vegetais frente a condições adversas apresentando um papel-chave na resposta ao estresse abiótico.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, Murilo S. *et al.* A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 20020-20030, 2011.
- ALVIM, Fátima C. *et al.* Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1042-1054, 2001.
- BAILEY, Timothy L., *et al.* "The MEME suite." *Nucleic acids research* 43.W1 (2015): W39-W49.
- BURNETTE, W. Neal W. Western Blotting Transferência eletroforética de proteínas de géis de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida para nitrocelulose não modificada e detecção radiográfica com anticorpo e proteína radioiodada A. **Bioquímica analítica**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.
- CAI, Yao-Min *et al.* Two proteases with caspase-3-like activity, cathepsin B and proteasome, antagonistically control ER-stress-induced programmed cell death in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 218, n. 3, p. 1143-1155, 2018.
- CARVALHO, Humberto H. *et al.* The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. **Plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 654-670, 2014.
- CASCARDO, Júlio César M. *et al.* The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14494-14500, 2000.
- CHEN, Yun *et al.* O regulador das proteínas de sinalização da proteína G envolvidas na sinalização de açúcar e ácido abscísico na germinação de sementes de Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 140, n. 1, p. 302-310, 2006.
- CHO, Y. *et al.* Heterotrimeric G protein subunits differentially respond to endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 10, 2015.
- COOMBES, Peter J.; ARGUE, John R.; KUCZERA, George. Figtree Place: a case study in water sensitive urban development (WSUD). **Urban Water**, v. 1, n. 4, p. 335-343, 2000.
- COSTA, Maximiller D. L. *et al.* A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 20209-20219, 2008.
- COUTINHO, Flaviane S. Silva *et al.* Mecanismo de tolerância à seca de uma soja transgênica que superexpressa a chaperona molecular BiP. **Fisiologia e biologia molecular de plantas**, v. 25, n. 2, p. 457-472, 2019.

DE CAMARGOS, Luiz Fernando *et al.* Proteína rica em asparagina contendo domínio de desenvolvimento e morte celular (DCD / NRP): uma proteína essencial no desenvolvimento das plantas e nas respostas ao estresse. **Fisiologia Vegetal Teórica e Experimental**

FINN, Robert D. *et al.* Servidor da Web HMMER: atualização de 2015. **Pesquisa de ácidos nucleicos. Disponível em:** [http:// www.hmmmer.org](http://www.hmmmer.org). Acesso em 10 de fev. 2020.

FRAGA, Otto T.eixeira *et al.* Um circuito regulador que integra o estresse induzido à senescência natural das folhas. In: **Estrutura das Ciências das Plantas, Anatomia e Morfogênese em Plantas Cultivadas na Vivo e in Vitro** . IntechOpen, 2019.

GARDNER, Brooke M. *et al.* Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 3, p. a013169, 2013.

GILMAN, Alfred G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annual review of biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 615-649, 1987.

HAAS, Ingrid G.; MEO, Tommaso. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 7, p. 2250-2254, 1988.

HATSUGAIN. *et al.* Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. . **Frontiers in plant science**. v. 6, n. 1, p. 234, 2015.

LEASE, Kevin A. *et al.* A mutant Arabidopsis heterotrimeric G-protein β subunit affects leaf, flower, and fruit development. **The Plant Cell**, v. 13, n. 12, p. 2631-2641, 2001.

LUDWIG, Andrea A; Tenhaken, Raimund. Uma nova parede celular localizada com proteína rica em N é fortemente induzida durante a resposta hipersensível em *Glycine max* L. **Revista Europeia de Patologia Vegetal** , v. 107, n. 3, p. 323-336, 2001.

MARSHALL, Alex *et al.* Tackling drought stress: receptor-like kinases present new approaches. **The Plant Cell**, v. 24, n. 6, p. 2262-2278, 2012.

McKAY, D. B. Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 67-80, 1993.

MENDES, Giselle C. *et al.* GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress-and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19627-19632, 2013.

MIGUEL, Larissa P. **O papel molecular do chaperone molecular BiP na resposta a estresse**. 2019. Dissertação, (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa, Minas Gerais.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PARK, Chang-Jin *et al.* A superexpressão do chaperone do retículo endoplasmático BiP3 regula a imunidade inata mediada por XA21 no arroz. **PLoS One**, v. 5, n. 2, 2010.

PARK, Chang-Jin; SEO, Young-Su. Proteínas de choque térmico: uma revisão das chaperonas moleculares para imunidade a plantas. **A revista de fitopatologia**, v. 31, n. 4, p. 323, 2015

PENG, Yuancheng *et al.* BRI1 and BAK1 interact with G proteins and regulate sugar-responsive growth and development in Arabidopsis. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.

PETROV, V. *et al.* ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1, p. 69, 2015.

PINTO, M. C.; LOCATO, V.; DE GARA, L. Redox regulation in plant programmed cell death. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 2, p. 234-244, 2012.

PRICE, Morgan N.; DEHAL, Paramvir S.; ARKIN, Adam P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS one**, v. 5, n. 3, 2010.

RAMEGOWDA, Venkategowda *et al.* Rice GROWTH UNDER DROUGHT KINASE is required for drought tolerance and grain yield of normal and drought stress conditions. **Plant physiology**, v. 166, n. 3, p. 1634-1645, 2014.

REIS, Pedro A. B. *et al.* Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 156, 2016.

REIS, Pedro A. B. *et al.* The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. **Plant physiology**, v. 157, n. 4, p. 1853-1865, 2011.

REIS, Pedro A. B.; FONTES, Elizabeth PB. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 6, p. 628-632, 2012.

REIS; Pedro A. B. **Integration of osmotic- and ER-stress into a cell death response: positive and negative regulators of signaling pathway are conserved in plants.** 2014. Tese, (Doutorado em Bioquímica Agrícola) -Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa, Minas Gerais.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ª Edição Editora. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SILVA, Bárbara V. *et al.* Proteínas cinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química nova**, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

SOUZA, Thiago Freitas. **Identificação e caracterização parcial de proteínas fosfatases envolvidas em vias de sinalização ativadas por injúria mecânica em plantas de *Ricinus communis***. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro.

STAEHELIN, L. Andrew L. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1151-1165, 1997.

TAIZ, Lincoln. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Edição. Editora Artmed, 2017.

TANAKA, Hidenori *et al.* As cinases receptoras induzidas por estresse abiótico controlam negativamente a sinalização ABA em *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 70, n. 4, p. 599-613, 2012.

TOWBIN, H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. **Proceedings of National Academy of Sciences**, V. 76, n.1, p. 4350-4354, 1979.

TOWBIN, H.; Gordon, J. Immunoblotting and dot Immunobinding - current status and Outlook. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 313- 340, 1984.

TUNC-OZDEMIR, Meral *et al.* Predicted functional implications of phosphorylation of regulator of G protein signaling protein in plants. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1456, 2017.

TUNC-OZDEMIR, Meral *et al.* Modulação direta da sinalização heterotrimérica acoplada à proteína G por um complexo receptor cinase. **Jornal de Química Biológica**, v. 291, n. 27, p. 13918-13925, 2016.

TWENEBOAH, Solomon; OH, Sang-Keun. Biological roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in solanaceous crops. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2017.

ULLAH, Hemayet *et al.* Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. **Science**, v. 292, n. 5524, p. 2066-2069, 2001.

ULLAH, Hemayet *et al.* Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. **Plant Physiology**, v. 129, n. 2, p. 897-907, 2002.

VALENTE, Maria A.nete S. *et al.* The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf

senescence in soybean and tobacco. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 2, p. 533-546, 2009.

VITALE, A. Calreticulins are not all the same. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 32, p. 13151-13152, 2009.

VITALE, Alessandro; BOSTON, Rebecca S. Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants. **Traffic**, v. 9, n. 10, p. 1581-1588, 2008.

WALKER, John C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. **Plant molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 1599-1609, 1994

WAN, Shucen; JIANG, Liwen. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p. 753-764, 2016.

WANG, Shiyu *et al.* Heterotrimeric G protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3817-3822, 2007.

XU, Dong-bei *et al.* A G-protein β subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in Arabidopsis. **PLoS One**, v. 10, n. 1, 2015.

YE, Yaoyao. , Ye *et al.* The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. **Plant cell reports**, v. 36, n. 2, p. 235-242, 2017.

YU, Tian-Ying *et al.* The Arabidopsis receptor kinase ZAR1 is required for zygote asymmetric division and its daughter cell fate. **PLoS genetics**, v. 12, n. 3, 2016.

ANEXO 1

Tabela S1: Identificação dos genes mutados após tratamento com EMS por meio de sequenciamento de nova geração.

EMS	GENE	Number of mutations	Position:reference =>Mutant	Length (Protein)
1	AT1G73180.2	1	320:W=>*;	485
2 and 5	AT1G03060.1	1	727:R=>*;	3602
3	AT1G47840.1	1	69:R=>*;	494
3	AT1G53730.1	1	514:W=>*;	720
2	AT3G25020.1	1	433:W=>*;	891
3	AT2G29930.2	1	76:Q=>*;	340
2	AT5G37490.1	1	66:S=>*;	436
4	AT3G03820.1	1	43:Q=>*;	97
4	AT5G64950.1	1	96:R=>*;	392
4	AT5G19270.1	1	154:R=>*;	366
3	AT5G53150.1	1	113:W=>*;	727
7 an 12	AT5G40200.1	1	53:R=>*;	593
3	AT5G67450.1	1	48:Q=>*;	246
9	AT2G44240.1	1	208:W=>*;	403
9	AT3G09470.1	1	386:W=>*;	465
10	AT3G44820.1	1	342:Q=>*;	652
10	AT4G16890.1	1	1034:E=>*;	1302
9	AT1G30510.1	1	266:W=>*;	382
11	AT2G01210.1	1	144:Q=>*;	717
11	AT3G24610.1	1	267:W=>*;	446
12 and 13	AT1G31630.1	1	88:Q=>*;	340
12 and 13	AT3G44630.1	1	455:W=>*;	1215
12	AT1G06510.1	1	14:Q=>*;	278

13	AT5G25250.1	1	31:W=>*;	471
2	AT5G52070.1	1	28:R=>*;	272
15	AT2G37860.1	1	78:Q=>*;	348
15	AT4G09430.1	1	399:W=>*;	1040
15	AT5G55350	1	105:Q=>*;	346
15	AT2G37860.1	1	78:Q=>*;	348
15	AT4G10430.1	1	235:Q=>*;	348

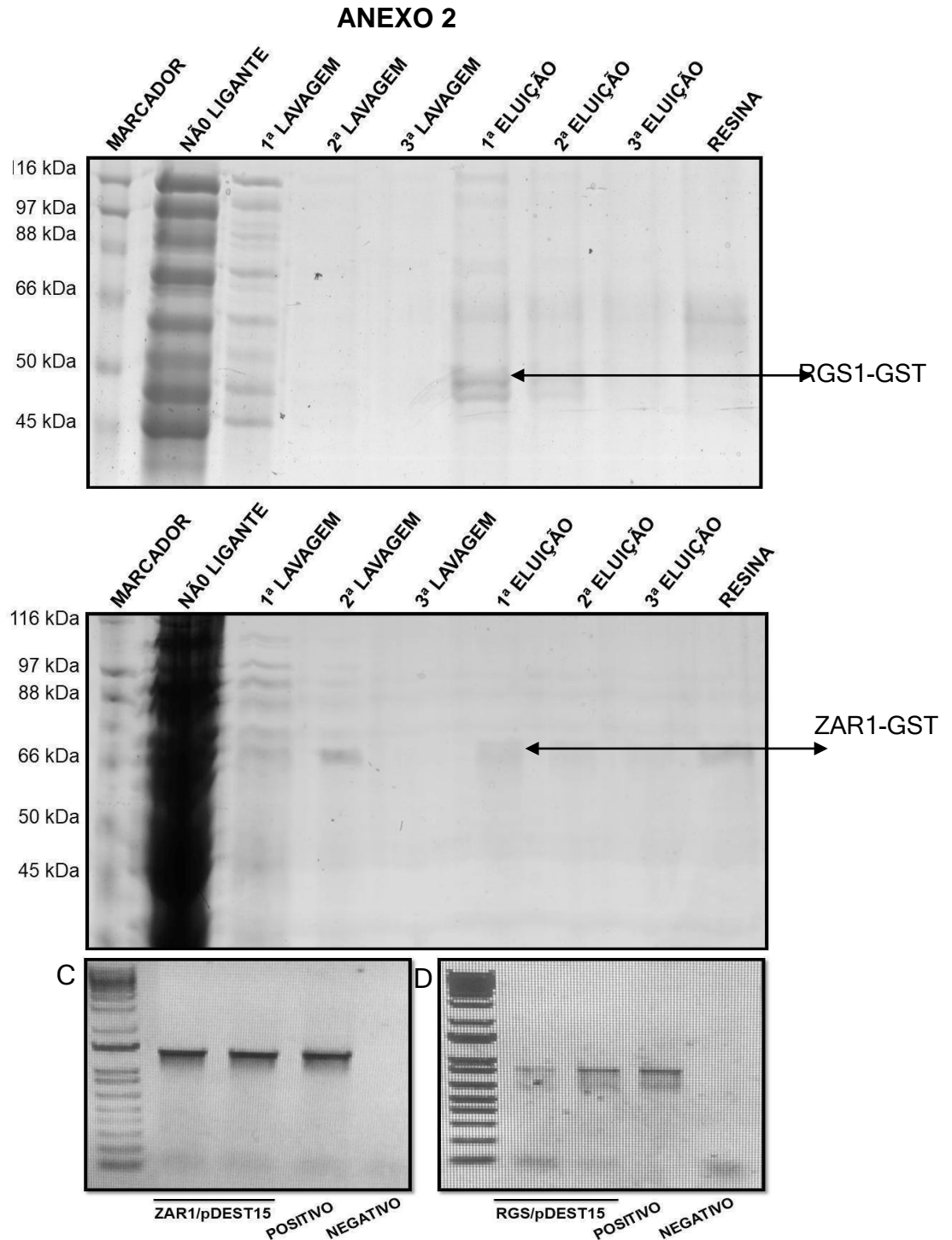


Figura S1: Fração das proteínas no processo de purificação de proteínas expressas heterologicamente em C41 (DE3). Na fração não ligante estão todas as proteínas solúveis extraídas, as lavagens da resina usada na purificação, as três eluições das proteínas purificadas e a alíquota com o que restou de proteínas na resina de glutationa sepharose 4B (A) Proteínas das bactérias transformadas com as construções ZAR1-ct-pDest15 (Tag GST). (B) Proteínas das bactérias transformadas com as construções RGS1-ct-pDEST15 com GST. (C) Gel da PCR de confirmação com os primers ZAR1-ct-Fwd, ZAR1-Rvs para ZAR1-ct (D) PCR os primers pDEST15-FWD e RGS1-RVS para RGS1-ct.