

AMANDA BONOTO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO  
*GmbZIPE2* 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

G635c  
2014  
Gonçalves, Amanda Bonoto, 1988-  
Caracterização funcional do fator de transcrição GmbZIPE2  
de soja (*Glycine max*) / Amanda Bonoto Gonçalves. – Viçosa,  
MG, 2014.  
v, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.48-54.

1. Soja. 2. Soja - Genética - Fatores de Transcrição. 3. Soja  
- Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 4.  
Fitopatologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa em  
Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

AMANDA BONOTO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO  
*GmbZIPE2* 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: 23 de julho de 2014.

---

Juliana Lopes Rangel Fietto

---

Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

---

Luciano Gomes Fietto  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda a iluminação e proteção durante essa jornada.

Aos meus pais Amélia e Antônio, meus maiores incentivadores. Obrigada pelo amor, carinho, compreensão e por todos os esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos Daniel, Lucas, Marco pela amizade, companheirismo e torcida.

Ao meu orientador Luciano Fietto pela orientação, pela oportunidade de fazer parte da sua pesquisa, pela calma e serenidade que ele sempre passa para seus orientados.

A minha cunhada Marina pelo incentivo a entrar no LBM.

Ao Murilo, por ser meu “pai” no laboratório. Obrigada por sua orientação, dedicação, por passar seu amor pela nossa pesquisa para gente, e pela amizade. Sem você eu não conseguiria.

A Silvana pela orientação, amizade e risadas. Pela ajuda na minha introdução no LBM, por sempre me ajudar quando eu preciso e por dividir suas experiências do laboratório comigo.

A todos companheiros do LBM, obrigada pela ajuda e pelos momentos de distração.

Obrigada a Mary, pela a constante ajuda no laboratório.

Ao Dudu, sempre muito solícito, e sempre me ajudando nas “papeladas” da pós.

Aos professores do departamento de Bioquímica, pelos ensinamentos.

As minhas amigas da república Cê Besta (Thalita, Gêssica, Marcela, Júlia, Gabi) pela amizade, ótima convivência e pela paciência.

As amigas Mayara, Cássia, Lídia, Jana, Mayra e aos amigos do Scotch pela torcida, e por sempre estarem dispostos a me escutar e a me animar nos momentos difíceis.

A toda minha família, pelo carinho.

A Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades de ensino e pesquisa oferecidas durante minha vida acadêmica, e por me acolher durante todos esse anos.

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

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVO.....	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 - Clonagem do gene GmbZIPE2 no vetor de expressão em bactérias pDEST17.....	16
4.2 - Transformação da linhagem de expressão <i>E.coli</i> pRARE2 com a construção pDEST17-GmbZIPE2.....	16
4.3 - Indução da expressão da proteína bZIPE2 em transformantes de <i>E.coli</i> pRARE2.....	17
4.4 - Purificação da proteína GmbZIPE2 em condições desnaturantes.....	18
4.5 - Purificação da proteína GmbZIPE2 em condições nativas.....	19
4.6 - Obtenção de anticorpos policlonais contra GmbZIPE2.....	19
4.7- Detecção da presença da proteína GmbZIPE2 em amostras de soja infectadas por <i>P.pachyrhizi</i> .....	19
4.8 - Determinação da capacidade de ligação da proteína GmbZIPE2 a cis- elementos específicos através de Ensaio de Mudança da Mobilidade eletroforética (EMSA).....	20
4.9 - Produção de protoplasto de soja e superexpressão de GmbZIPE2.....	20
4.10 - Extração de RNA e síntese de cDNA.....	21
4.11- PCR em Tempo Real (qRT-PCR) .....	21
4.12 - Técnicas de Biologia Molecular.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 - Obtenção de pRARE2 transformada com o plasmídeo pDEST17- GmbZIPE2.....	24
5.2 - A expressão de GmbZIPE2-His foi induzida e a proteína purificada.....	26
5.3 - Detecção da presença da proteína GmbZIPE2 em amostras de folhas de soja infectadas por <i>P.pachyrhizi</i> .....	29
5.4 - O fator de transcrição GmbZIPE2 se liga ao cis-elemento H-box.....	32
5.5 - Super-expressão de GmbZIPE2 em protoplasto de soja.....	34
5.6 - 5.6 - Análise da expressão dos genes CHS15-12 (Glyma01g43880.1) e CHS15-6(Glyma11g01350.1) em protoplastos de soja super-expressando GmbZIPE2.....	36
5.7 - Análise da expressão do gene PR-1 em protoplastos de soja.....	40
5.8 - Análise da expressão do gene ANK1 em soja.....	42
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS.....	54
pDONR201 (Invitrogen).....	54
pDES17 (Invitrogen).....	55

## RESUMO

GONÇALVES, Amanda Bonoto. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Caracterização funcional do fator de transcrição *GmbZIPE2* de soja (*Glycine max*)**. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Co-orientador: Murilo Siqueira Alves

Na interação planta/patógeno, a modulação da transcrição gênica é fundamental para montar uma resposta de defesa eficaz nas células do hospedeiro. Os fatores de transcrição estão entre os principais alvos em plantas para o aumento da tolerância a estresses, uma vez que estas proteínas controlam a expressão de vários genes ao mesmo tempo. Membros da família de fatores de transcrição bZIP podem atuar na defesa contra patógenos. Apesar da função de bZIPs na defesa contra patógenos ser conhecida, poucos trabalhos caracterizaram bioquimicamente membros dessa família que participam de vias de defesa. O *GmbZIPE2* (Glyma05g30170.1) é um membro do grupo E da família bZIP de soja, que é responsivo à infecção por *Phakopsora pachyrhizi*. Esse trabalho teve como objetivo principal caracterizar funcionalmente o transfator *GmbZIPE2*, mapeando cis-elementos que ele se liga, bem como genes responsivos a *GmbZIPE2*. A proteína *GmbZIPE2* foi capaz de se ligar ao H-box, cis-elemento que é relacionado a patógenos. *GmbZIPE2* induz genes de vias importantes para a defesa da planta, como *CHS15-6* e *PR-1*. *GmbZIPE2* reprime *ANK1*, um regulador negativo de morte celular. Os resultados desse trabalho indicam uma relação do fator de transcrição *GmbZIPE2* na defesa da planta contra o ataque de patógenos. Maiores conhecimentos sobre o *GmbZIPE2* pode contribuir com o conhecimento acerca da resposta da planta a estresse biótico e poderá ser útil para a obtenção de novos alvos para a modificação genética de cultivares.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Amanda Bonoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. Functional characterization of transcription factor *GmbZIPE2 of soybean (Glycine max)*. Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-adviser: Murilo Siqueira Alves.

In a plant/pathogen interaction, modulation of gene transcription is essential to mount an effective defense response in host cells. Transcription factors are among the major targets in plants for increasing stress tolerance, since these proteins control the expression of several genes simultaneously. Members of the bZIP family of transcription factors can act in defense against pathogens. Despite the role in defense against pathogens bZIPs be known, few studies biochemically characterized members of this family that participate in the process of defense. The *GmbZIPE2* (Glyma05g30170.1) is a member of the bZIP E group of soybean, which is responsive to infection by *Phakopsora pachyrhizi*. The objective of this study was functionally characterize the transfactor *GmbZIPE2*, mapping the cis-elements that it binds as well as the responsive genes of *GmbZIPE2*. The *GmbZIPE2* protein was able to bind to the H-box cis-element is related to pathogens. *GmbZIPE2* induces genes important for plant defense pathways, as *CHS15-6* and *PR-1*. *GmbZIPE2* represses *ANK1*, a negative regulator of cell death. The results of this study indicate a relationship of *GmbZIPE2* transcription factor in plant defense against pathogen attack. Improved knowledge of the *GmbZIPE2* can contribute to the knowledge of plant response to biotic stress and may be useful for obtaining new targets for genetic modification of crops.

## 1 - INTRODUÇÃO

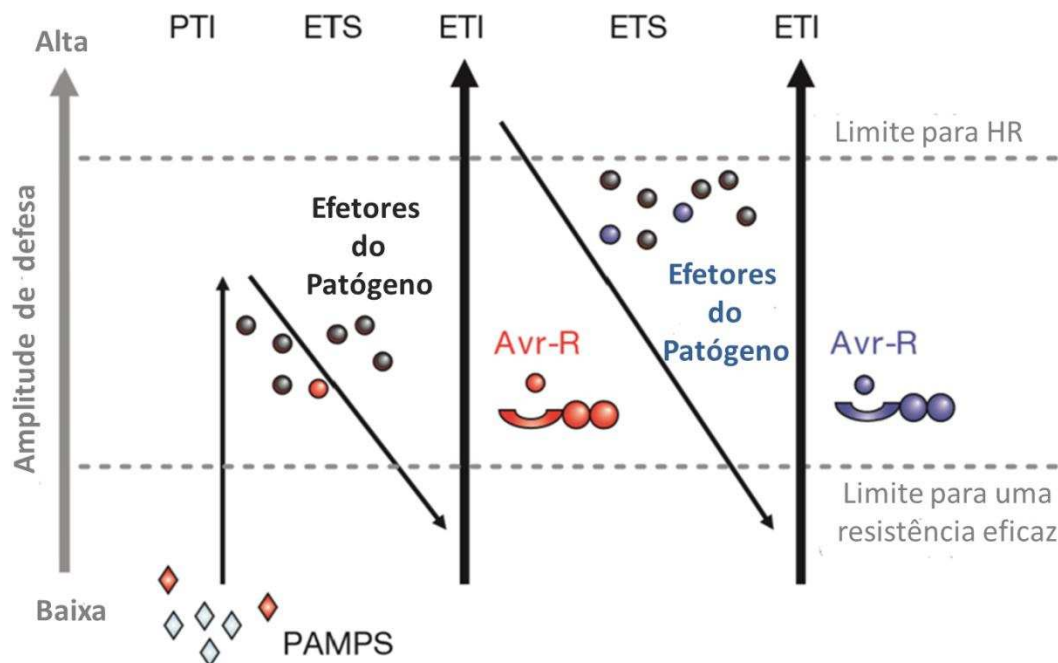
Estresses bióticos em plantas causam grandes perdas na agricultura mundial. Um exemplo é o causado pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, cuja doença em soja é denominada ferrugem asiática, e pode causar perdas de mais de 50% da produção quando as condições ambientais são propícias para o desenvolvimento da doença (Hartman *et al.*, 2005). As plantas não têm células de defesa móveis e não possuem um sistema imunológico somático adaptativo, sendo assim, sua defesa é realizada através do seu sistema de imunidade inata (Jones and Dangly, 2006). O sistema de imunidade inata é acionado inicialmente pela percepção de padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs ou microbial-associated molecular patterns, MAMPs) na superfície da célula da planta. O reconhecimento de PAMPs acontece através de receptores da planta chamados PRRs (pattern-recognition receptors) (Spoel and Dong, 2012). A resposta aos PAMPs é chamada de imunidade desencadeada por PAMP (PAMP-triggered immunity, PTI). Muitos patógenos conseguem contornar essa primeira barreira produzindo efetores que inibem a PTI. Porém as plantas podem reconhecer esses efetores através de receptores adicionais para montar uma segunda fase de defesa chamada imunidade desencadeada por efetores (effector-triggered immunity, ETI) (Boller and He, 2010). Geralmente PTI e ETI geram respostas semelhantes, porém qualitativamente, a ETI mais forte e mais rápida (Dodds and Rathjen, 2010). A ETI leva a uma resposta amplificada, e muitas vezes envolve uma forma de morte celular chamada resposta de hipersensibilidade (HR) no local da infecção, na tentativa de evitar que o patógeno se dissemine para outras células da planta (Jones and Dangly, 2006).

A modulação da transcrição de alguns genes é fundamental para montar uma resposta de defesa eficaz nas células do hospedeiro. A reprogramação transcricional de resposta a patógenos busca favorecer respostas de defesa da planta em detrimento de outros processos celulares (Buscaill and Rivas, 2014). Fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão de um grupo específico de genes através de ligação sequência-específica com o DNA e interações proteína-proteína (Latchman, 2003). Os fatores de transcrição estão entre os principais alvos para o aumento da tolerância a estresses, uma vez que estas proteínas controlam a expressão de vários genes ao mesmo tempo, podendo assim levar uma resposta mais ampla contra um determinado desafio. As famílias de fatores de transcrição são conservadas entre as espécies vegetais, sendo

que vários fatores de transcrição de famílias diferentes estão ligados a respostas a estresses. Entre estas famílias encontram-se os fatores de transcrição com domínio bZIP (Alves *et al.*, 2013a). Membros da família de transfatores bZIP são caracterizados por possuir um domínio básico de zíper de leucina, que é um domínio de ligação ao DNA formado por duas estruturas em forma de alfa hélice (Schütze *et al.*, 2008). De acordo com a similaridade de sequência de aminoácidos, a família bZIP foi subdividida em 10 grupos (A, B, C, D, E, G, H, I, J, S) (Jacob *et al.*, 2002). Membros da família bZIP podem regular vários processos na planta, como maturação de sementes, desenvolvimento de flores, resposta a estresse abióticos e defesa contra patógenos (Jacob *et al.*, 2002). Apesar da função de bZIPs na defesa contra patógenos ser conhecida, poucos trabalhos caracterizaram bioquimicamente membros dessa família que participam de vias de defesa. Uma forma de caracterizar um fator de transcrição é descobrir a quais cis-elementos ele se liga, pois existem motivos que são relacionados à patógenos, como os motivos G-box e H-box, que podem estar incorporados em promotores de genes importantes para a defesa da planta. O gene *CHS15*, por exemplo, é um gene relacionado à defesa por fazer parte de vias que produzem fitoalexinas e flavonoides, e possui em seu promotor os cis-elementos G-box e H-box (Hahlbrock *et al.*, 1989). GmbZIPE2 (Glyma05g30170.1) é um membro do grupo E da família bZIP de soja, que é responsivo à infecção por *P. pachyrhizi* (Alves, 2013), porém os genes que este bZIP controla ou os elementos aos quais ele se liga ainda não são conhecidos. Assim esse trabalho teve como objetivo principal caracterizar funcionalmente o transfator GmbZIPE2, mapeando os cis-elementos que ele se liga, bem como genes que ele controla.

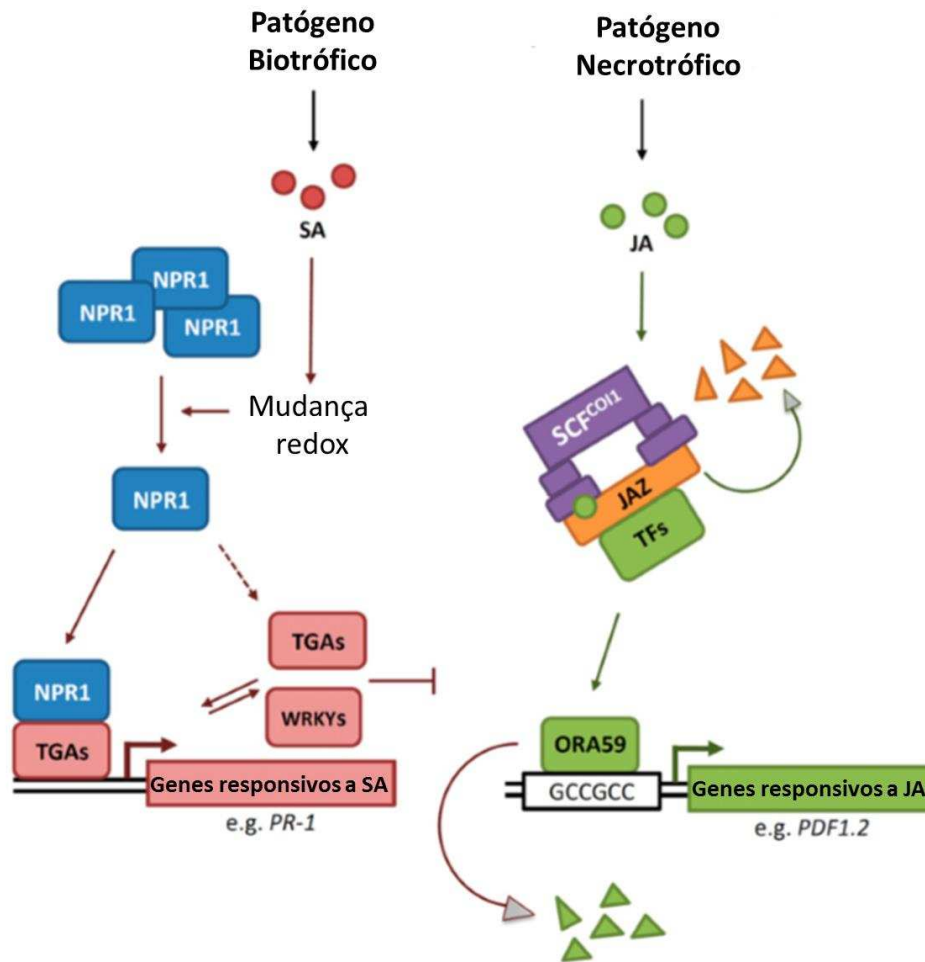
## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

As plantas não têm células de defesa móveis e não possuem um sistema imunológico somático adaptativo. A defesa de plantas está associada com a imunidade inata de cada célula e em sinais sistêmicos originados de infecções locais (Jones and Dangly, 2006). O sistema de imunidade inata de plantas é acionado inicialmente pela percepção de padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs ou microbial-associated molecular patterns, MAMPs) através de receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors, PRR) na superfície da célula (Figura 1). A resposta aos PAMPs é chamada de imunidade desencadeada por PAMP (PAMP-triggered immunity, PTI). Alguns patógenos então implantam efetores na planta que podem interferir com a PTI resultando em uma susceptibilidade desencadeada por efector (effector-triggered susceptibility, ETS). Muitos patógenos conseguem contornar essa primeira barreira da planta produzindo efetores que inibem a PTI. Porém as plantas podem reconhecer esses efetores através de receptores adicionais, geralmente por receptores NB-LRR, caracterizados por um domínio de ligação a nucleotídeo e um domínio rico em leucina, para montar uma segunda fase de defesa chamada imunidade desencadeada por efetores (effector-triggered immunity, ETI) (Boller and He, 2010). O reconhecimento dos efetores pode ser direto através do reconhecimento de um efector pelo NB-LRR, mas também pode ser indireto. ETI é uma resposta acelerada e amplificada da PTI, resultando em resistência à doença e, geralmente, uma resposta de hipersensibilidade (HR) e morte celular no local da infecção. Os patógenos evoluíram de maneira a evitar a ETI, diversificando o gene efector, ou através da aquisição de efetores adicionais que suprimem a ETI. As plantas, por outro lado podem evoluir e adquirir novos genes R (genes de resistência, que coficam receptores que reconhecem efetores) para que a ETI possa ser acionada novamente. (Jones and Dangly, 2006).



**Figura 1: Modelo ilustrativo do sistema imune da planta:** Inicialmente as plantas detectam, através dos PRRs, os PAMPs ou MAMPs (losangos em vermelho) para desencadear a imunidade desencadeada por PAMP (PTI). Em seguida, alguns patógenos conseguem suprimir a PTI, seja por implantação de efetores na planta ou de outra forma a permitir a nutrição e dispersão do patógeno, resultando em susceptibilidade desencadeada por efector (ETS). Na fase seguinte um efector (indicado por círculos em vermelho) é reconhecido por uma proteína NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Na fase final, alguns patógenos ganham novos efetores (em azul) que permitem ao patógeno suprimir a ETI (Jones and Dangly, 2006).

As respostas das plantas à infecção envolvem a despolarização da membrana plasmática, a modificação da atividade de canais iônicos, a produção de compostos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (ROS), fosforilação reversível de proteínas através da ativação de cascatas de proteínas homólogas à quinase ativadas por mitógenos (MAPK) ou por proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), modulação da transcrição de genes e deposição de compostos como a lignina gerando calose na parede celular vegetal (Meng and Zhang, 2013). Os hormônios vegetais, incluindo jasmonato (JA), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), são moléculas de sinalização importantes para uma resposta eficiente a estímulos bióticos. Normalmente, a sinalização por SA está relacionada com a resistência a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, já vias relacionadas com ET e JA ativam a resistência contra patógenos necrotróficos (Figura 2) (Pieterse *et al.*, 2012).



**Figura 2: Modelo da ativação das vias de SA e JA a partir da interação planta/patógeno:** A infecção por um agente patogénico biotrófico resulta na acumulação de SA e monomerização de NPR1 através de mudanças redox na célula mediada por SA. NPR1 monomérico é então translocado para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição TGA, levando à ativação de genes responsivos a SA. Uma infecção por um agente patogénico necrotrofico, resulta na acumulação de JA. A ligação do JA no complexo de ubiquitina-ligase SCFCO1-E3 conduz à degradação de proteínas repressores da transcrição JAZ através do proteassoma, o que resulta na libertação de ativadores transcricionais. Em seguida esses fatores de transcrição irão se ligar a promotores de genes responsivos a JA, ativando assim esses genes. Setas sólidas e linhas de inibição indicam estabelecimento de atividades ou acúmulo de compostos; setas tracejadas representam conexões hipotéticas. As linhas vermelhas indicam as atividades mediadas pela via SA; linhas verdes indicam atividades mediadas pela via JA (Van der Does *et al.*, 2013 adaptado).

A modulação da transcrição de genes é fundamental para montar uma resposta de defesa eficaz nas células do hospedeiro. A reprogramação transcricional da célula vegetal ocorre de modo a favorecer a defesa da planta em relação a outros processos celulares, como crescimento e desenvolvimento. Este processo envolve os fatores de transcrição que modulam a expressão de um grande número de genes (Buscaill and Rivas, 2014).

Os fatores de transcrição regulam a expressão de genes através de ligação sequência-específica com o DNA e interações proteína-proteína. Esses fatores interagem com a maquinaria geral de transcrição, com proteínas de remodelamento de cromatina e/ou com outros fatores de transcrição atuando como ativadores ou repressores da expressão gênica (Latchman, 2003).

Fatores de transcrição são classificados em famílias de acordo com os motivos conservados que codificam para domínios de ligação ao DNA. A grande maioria dos fatores de transcrição contém domínios característicos de ligação ao DNA, de oligomerização, de regulação da transcrição e de localização nuclear (Liu *et al.*, 2001). Aproximadamente 7% do genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica fatores de transcrição (Udvardi *et al.*, 2007) e dentro dessa porcentagem foram identificadas cerca de 1500 prováveis fatores de transcrição pertencentes a aproximadamente 30 famílias. Aproximadamente metade dessas famílias foram consideradas específicas de plantas (Yamasaki *et al.*, 2013). Algumas família de fatores de transcrição já foram descritas por estarem relacionadas com a defesa: MYB, AP2/ERF, MYC, WRKY e bZIP (Xu *et al.*, 1998; Memelink, 2009; Canonne *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2011) estão relacionadas com ataque de patógenos. Apesar do grande número de representantes da família bZIP, alguns poucos membros foram descritos como participantes de vias de sinalização em resposta à patógenos (Droöge-Laser *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 2012; Kuhlmann *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2008).

A família de transfatores bZIP possui como característica principal a presença de um domínio básico de zipper de leucina (Basic Leucine zipper). O domínio bZIP é formado por duas estruturas em forma de alfa hélice: a primeira é constituída de uma região básica de aproximadamente 16 resíduos de aminoácidos contendo um sinal de localização nuclear seguido de um motivo N-x7-R/K. A segunda região é formada por alguns resíduos de leucina espaçados regularmente em intervalos de seis aminoácidos, posicionados exatamente 9 aminoácidos antes do C-terminal, criando uma hélice anfipática. Para a ligação ao DNA, duas subunidades se ligam através de interações hidrofóbicas de suas hélices formando homo ou hetero-dímeros dando origem ao zipper de leucina. Alguns representantes da família bZIP possuem isoleucinas, valinas, fenilalaninas ou metioninas no lugar das leucinas (Schütze *et al.*, 2008).

O genoma de *A. thaliana* apresenta 116 genes que codificam fatores bZIP, enquanto que no genoma da soja há 176 genes desta família, podendo estes números variarem de acordo com a metodologia utilizada para seleção das sequências (Wang *et al.*, 2010). Destes 176 prováveis genes bZIP em soja, Liao e colaboradores (2008) avaliaram a expressão de 131 em resposta a estresses abióticos, desidratação, frio, NaCl e ao hormônio ABA (ácido abscísico). Os autores relataram que 49 genes foram responsivos a, pelo menos, um dos tratamentos realizados.

Os bZIPs de *A. thaliana* foram subdivididos em dez grupos (A, B, C, D, E, G, H, I, S) de acordo com a similaridade de sequência e motivos conservados (Jackoby *et al.* 2002); posteriormente os bZIPs de soja foram subdivididos nestes mesmos 10 grupos (Liao *et al.*, 2008). Abaixo segue uma descrição breve sobre cada grupo:

*Grupo A* - as informações sugerem que este grupo possui papel na sinalização em resposta ao ácido abscísico (ABA) e a estresses em geral (Jackoby *et al.*, 2002).

*Grupo B* – alguns de seus membros foram confirmados como genes que codificam proteínas associadas à membrana do retículo endoplasmático (ER) (Liu *et al.*, 2007).

*Grupo C* - Segundo Jackoby *et al.*, (2002), proteínas deste grupo possuem um zíper de leucina extenso. Os potenciais sítios alvo para a modificação de proteínas, tais como sítios de fosforilação que regulam a ligação ao DNA e a translocação nuclear, são conservados neste grupo. Em algumas monocotiledôneas esses genes regulam a expressão de proteínas das sementes e podem estar envolvidos também, na defesa contra patógenos.

*Grupo D* - Os genes do grupo D participam de dois processos: defesa contra patógenos e desenvolvimento da planta (Jackoby *et al.*, 2002). O envolvimento destes genes nestes mecanismos está interligado aos fatores de transcrição TGA da família bZIP em tabaco e *A. thaliana*.

*Grupo E* - Jackoby *et al.*, (2002) não encontraram função ligada aos membros desse grupo. Eles são muito similares aos membros do grupo I no motivo zíper, mas não possuem a lisina na posição -10 e por isso foram classificadas em um grupo diferente.

*Grupo G* – são proteínas chamadas *G-box binding factor* (GFB) em *Arabidopsis* e estão ligadas à regulação de promotores que respondem a luz. (Jackoby *et al.*, 2002).

*Grupo H* - somente um de seus membros foi estudado e possui papel na fotomorfogênese (Jackoby *et al.*, 2002).

*Grupo I* - segundo Jackoby *et al.*, (2002), os membros do grupo I têm um resíduo de lisina característico no domínio básico que substitui a arginina altamente conservada (N-x7-R para N-x7-K, onde x representa um aminoácido qualquer). Essa mudança de aminoácido pode determinar a especificidade da região de ligação desses bZIPs, porque correlaciona com uma alta afinidade a regiões não palindrômicas (Fukazawa *et al.*, 2000). Ainda segundo Jackoby *et al.*, (2002), estudos com o grupo I indicam que eles podem ter um papel no desenvolvimento vascular.

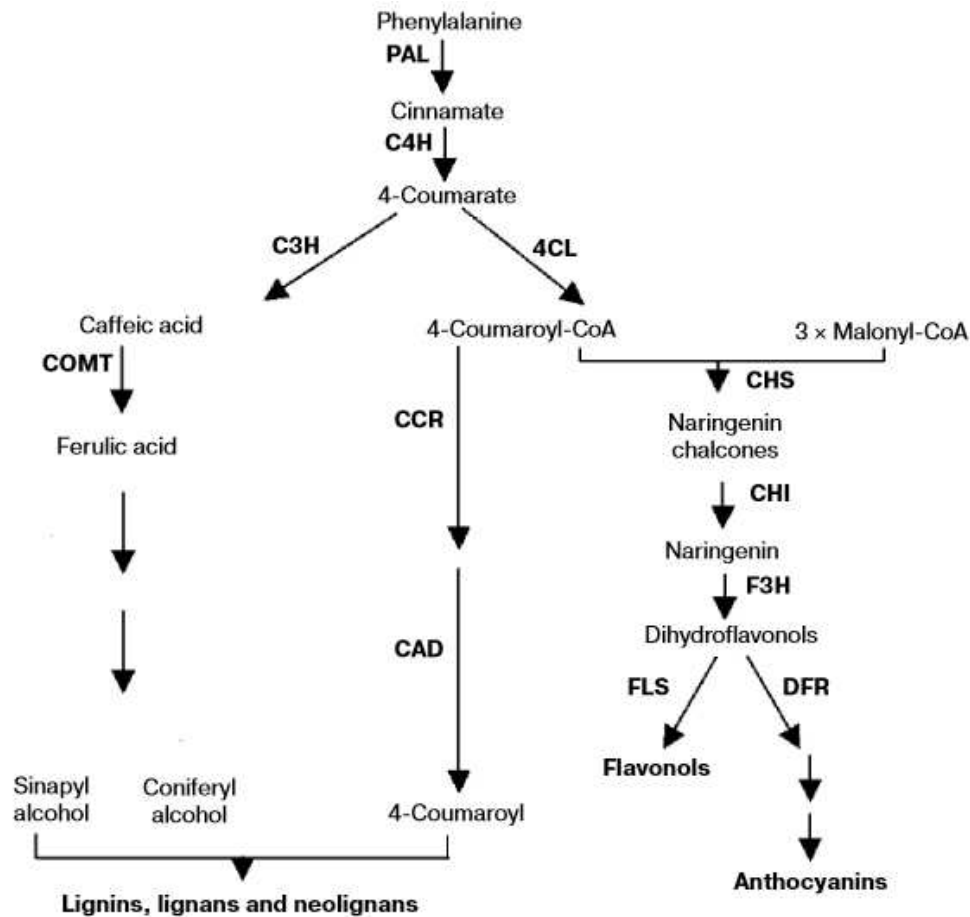
*Grupo S* - o grupo S é o maior grupo em *Arabidopsis*, mas somente um membro foi melhor estudado sendo sua transcrição induzida pela luz (Rook *et al.*, 1998).

Apesar de existirem poucos estudos de caracterização dos cis-elementos de ligação dos bZIPs ao DNA, existe uma hipótese de que muitos deles provavelmente reconhecem cis-elementos similares, já que os membros do mesmo grupo compartilham uma similaridade da região básica de ligação ao DNA (Jacob *et al.*, 2002).

Dentro da família bZIP existe um sub-grupo denominado TGA (proteínas de ligação ao cis-elemento TGACGTCA) (Singh *et al.*, 2002). Os TGAs atuam como reguladores da sinalização de SA e estão relacionados a resposta a estresses bióticos. Os membros da família TGA interagem com uma proteína com repetições de anquirina (ankyrin repeat protein, non-expresser of Pathogen Related (PR) genes, NPR1), que é um componente chave da via de defesa sinalizada por SA (Figura 2) (Pieterse *et al.*, 2012). Sob condições normais, a maior parte do NPR1 é retido no citoplasma como um oligômero através de ligações dissulfuro intermoleculares. Após o ataque de patógenos, SA é sintetizado e induz a mudanças no estado redox celular pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Resende *et al.*, 2003). ROS, em seguida, promove a monomerização de NPR1 através da atividade dos tiorredoxinas H3 e H5 (TRX-H3/H5). Nas células induzidas por SA, a proteína NPR1 agora monomérica transloca-se

para o núcleo através de proteínas do poro nuclear, e a NPR1 monomérica interage com membros da família TGA e se ligam a promotores de genes responsivos a SA (figura 2) (Pieterse *et al.*, 2012).

Um dos primeiros bZIPs estudados em soja em resposta a estresses bióticos foi o transfator G/HBF-1. Sabe-se que após a invasão do patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, o reconhecimento de elicitores induz a fosforilação de G/HBF1, que então é relocado para o núcleo, onde regula a expressão de genes da via de biossíntese de fenilpropanóides (Dröge-Laser et al, 1997). O fator de transcrição G/HBF-1 se liga aos cis elementos relacionados à elicitores de patógenos, chamados motivos G-box e H-box. Os cis elementos G-box (CACGTG) e H-box (CCTACC), são encontrados em promotores de genes que codificam enzimas de vias biossintéticas de fenilpropanóides como a fenilalanina amônia-liase (pal) e a 4-cumarato: CoA-ligase, que catalisam respectivamente a primeira e a terceira etapa, da via central de biossíntese de fenilpropanóides (Figura 3) (Lois et al., 1989; Ohl et al., 1990).



**Figura 3: Diagrama das principais etapas da via de biossíntese de fenilpropanóides em plantas.** Abreviações: PAL, liase amônio fenilalanina; 4CL, 4-cumarato-CoA-ligase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; CHS, chalcona sintase; CHI, chalcone isopolimerase; F3H, flavonone 3-hidroxilase; FLS, Flavonol sintase; DFR, diidroflavonol redutase; C3H, coumaroyl-quinato/shikimate 3-hidroxilase; COMT, ácido caféico: ácido 5-hidroxiferulico O-metiltransferase; CCR, cinamoil-CoA redutase; CAD, cinamil álcool desidrogenase. (Du *et al*, 2008 adaptado)

Fenilpropanóides originados de vegetais são compostos químicos derivados da fenilalanina que compreendem um grupo estruturalmente diverso de metabólitos secundários desempenhando um papel vital na interação das plantas com o ambiente. A diversidade estrutural dos fenilpropanóides é devida à ação de enzimas e complexos enzimáticos que realizam reações de condensação regio-específica, ciclização, aromatização, hidroxilação, glicosilação, acilação, prenilação, sulfatação e metilação (Noel, *et al* 2005). A enzima chave na biossíntese de fenilpropanóide é a chalcona sintase (Figura 3).

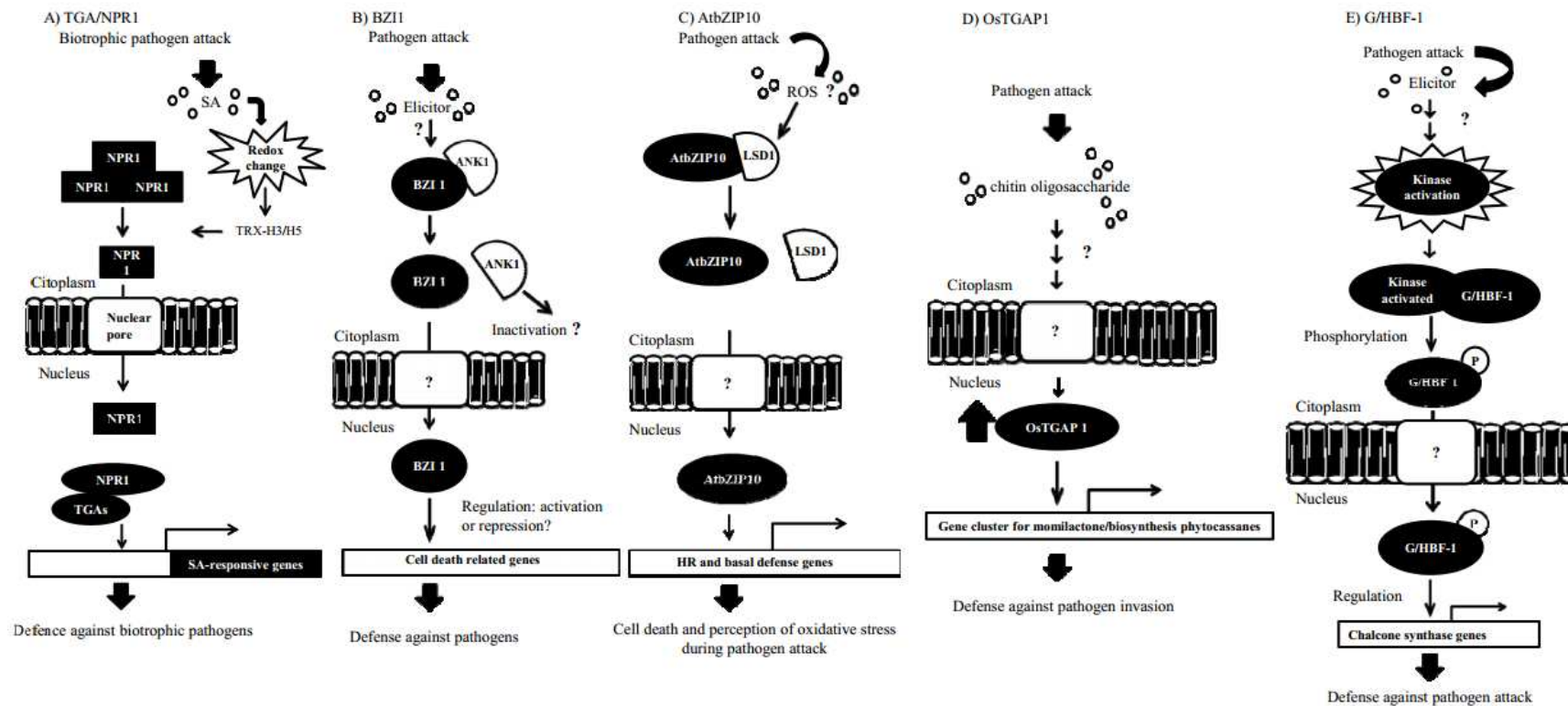
A Chalcona sintase (CHS) é uma policetídeo sintase (polyketide synthases, PKS) do tipo III específica de plantas que catalisa a condensação descarboxilativa sequencial da *p*-coumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA produzindo um novo anel aromático, a naringenina chalcona, um intermediário chave na biossíntese dos flavonóides (Figura 3). A diversidade funcional das chalcona sintases deriva da afinidade para com as moléculas de partida, do número de condensações de malonil-CoA e dos mecanismos de reações de ciclização (Abe and Morita, 2010). O primeiro gene CHS foi descrito na salsa (*Petroselinum hortense*) em 1983, e desde então mais de 900 genes PKS tipo III estão depositados em bases de dados (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.gov/>), e mais de 20 genes CHS da superfamília PKS tipo III funcionalmente diferentes de plantas e bactérias foram clonados e caracterizados (Abe and Morita, 2010). A CHS também está relacionada com outros fenômenos além da defesa, podendo ser induzida pelo hormônio etileno (Ecker *et al*, 1987), e pela luz (Matin, 1993).

Já foi demonstrado que o gene CHS15 de soja possui em seu promotor os cis elementos G-box e H-box. Experimentos que levam a indução da via de biossíntese de fenilpropanóides mostraram que a proteína G/HBF-1 é rapidamente fosforilada (quase exclusivamente em resíduos de serina) e que tanto os níveis de transcritos quanto de proteínas G/HBF-1 não aumentam durante a indução da síntese de fenilpropanóides. A fosforilação de G/HBF-1 *in vitro* aumenta a ligação ao promotor *chs15*, o que sugere que esse transfator está envolvido em uma via de sinalização para ativação de respostas de defesa da planta através da indução da síntese de fenilpropanóides (Figura 4) (Dröge-Laser *et al*, 1997).

Outro bZIP já caracterizado relacionado com estresse biótico é o BZI-1, um bZIP de tabaco. Este bZIP contém um domínio de ligação ao DNA e um domínio D1 que parece ser crucial para a sinalização de auxina e/ou a defesa contra agentes patogênicos (Kuhlmann *et al*, 2003). Estudos demonstraram que uma proteína com repetições de anquirina (ANK1), uma proteína semelhante a NPR1, interage com BZI-1 (Figura 4). A caracterização molecular e funcional de ANK1 demonstrou que esta proteína não tem a capacidade de se ligar ao DNA nem de modular a transcrição de genes. Além disso, ANK1 localiza-se preferencialmente no citosol, e sua transcrição é regulada negativamente sob ataque de patógenos. Estas características levaram à conclusão de que ANK1 está envolvida na modulação da sinalização de auxina e defesa

contra patógenos de um modo que é dependente da sua interação com um bZIP (Kuhlmann *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2013).

Além dos transfatores TGAs, BZI-1 e do G/HBF-1 outros bZIPs participam da resposta de plantas a patógenos, como OsTGAP1 em arroz e AtbZIP10 de *Arabidopsis*. O OsTGAP1 tem sua expressão induzida por tratamento com oligossacarídeos de quitina (Okada *et al.*, 2009). OsTGAP1 é um regulador crucial que controla a expressão de genes envolvidos na biossíntese de diterpenos como parte da resposta de defesa da planta. (Okada *et al.*, 2009) (Figura 4). Foi demonstrado que AtbZIP10 é um regulador positivo da resposta de hipersensibilidade (HR) induzida por um agente patogênico. Demonstrou-se que *in vivo* AtbZIP10 interage com a proteína LSD1 (lesions simulating disease resistance 1). O ataque de patógenos ativa uma via de sinalização mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na dissociação do complexo AtbZIP10/LSD1. AtbZIP10 é então translocado para o núcleo para ativar a transcrição de genes e relacionados com a defesa. (Kaminaka *et al.*, 2006) (Figura 4).



**Figura 4: Representação esquemática dos mecanismos moleculares desencadeados durante respostas de defesa à patógeno que envolvem bZIPs de diferentes organismos vegetais.** **A.** O ataque de um patógeno biotrófico desencadeia uma via de sinalização mediada por SA, que altera o estado redox da célula, resultando na dissociação da proteína NPR1. O monômero é translocado para o núcleo e ativa a expressão de genes que respondem a SA pela interação NPR1/TGA; **B.** O reconhecimento de elicitores após ataque patogênico promove a dissociação do complexo BZI1/ANK1, um evento que permite a entrada do monômero BZI1 para o núcleo, favorecendo a regulação da transcrição de genes relacionados com morte celular; **C.** O ataque de patógenos ativa uma via de sinalização mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na dissociação do complexo AtbZIP10/LSD1. AtbZIP10 é então translocado para o núcleo para ativar a transcrição de genes HR e genes relacionados com a defesa basal; **D.** A presença de oligossacarídeos de quitina induz a expressão do gene da biossíntese de diterpenos através da ativação da proteína OsTGAP1; **E.** Após a invasão do patógeno, o reconhecimento de elicitores induz a fosforilação de G/HBF1, que é então translocado para o núcleo, onde regula a expressão de genes da biossíntese fenilpropanóides, como chalcona sintase. Os pontos de interrogação (?) representam processos ou componentes ainda não elucidados (Alves *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa identificou o fator de transcrição Glyma05g30170.1 da família bZIP, ([www.phytozome.net/soybean.php](http://www.phytozome.net/soybean.php)), que foi posteriormente denominado GmbZIPE2. A proteína GmbZIPE2 apresenta similaridade de sequência com o transfator TabZIP1 de trigo (Zhang *et al.*, 2009; Soares, 2010), o qual foi demonstrado ser responsivo a infecções por fungos de ferrugem (Zhang *et al.*, 2009). Como alguns bZIPS já foram relacionados com a via de biossíntese de fenilpropanóides (Heinekamp *et al.*, 2002; Dröge-Laser *et al.*, 1997) e como a resposta à ferrugem é uma estratégia da planta ainda pouco conhecida, investigar o papel do GmbZIPE2 na resposta a ferrugem e no controle da via de biossíntese de fenilpropanóides pode ser uma abordagem interessante. O GmbZIPE2 é classificado como membro do grupo E de bZIPs, um dos grupos com menos informações na literatura. Este membro da família bZIP é responsivo a infecção por *P. pachyrizi*, apresentando expressão inibida durante a infecção, bem como é induzido por hormônios de defesa como Ácido Salicílico e Jasmonato (Alves, 2013). Estes dados corroboraram para a proposta do estudo aprofundado do papel bioquímico deste transfator durante a ativação de vias moleculares de resposta a estresses bióticos em plantas.

### **3 - OBJETIVO**

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente o fator de transcrição GmbZIPE2.

#### **3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.1.1 Expressar o fator GmbZIPE2 em sistema bacteriano;

3.1.2 Purificar a proteína recombinante 6xHis-GmbZIPE2 em condições nativas e desnaturantes;

3.1.3 Produzir anticorpo policlonal anti-GmbZIPE2

3.1.4 Verificar se o anticorpo policlonal anti-GmbZIPE2 é capaz de reconhecer proteínas extraídas de folhas de plantas de soja.

3.1.5 Determinar a capacidade de ligação da proteína GmbZIPE2 aos cis-elementos H-box e G-Box através de Ensaio de Mudança da Mobilidade Eletroforética (EMSA);

3.1.6 Produzir protoplastos de soja super-expressando GmbZIPE2

3.1.7 Realizar PCR em tempo real para determinação de dados de expressão relativa entre GmbZIPE2 e genes que codificam enzimas que participam da via de biossíntese de fenilpropanóides

3.1.8 Realizar PCR em tempo real para determinação de dados de expressão relativa entre GmbZIPE2 e os genes PR-1 e ANK1.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Clonagem do gene *GmbZIPE2* no vetor de expressão em bactérias *pDEST17*

Utilizando o banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean.php>) foi identificada a sequência de DNA do fator *GmbZIPE2* (Glyma05g30170.1). Após a identificação da sequência alvo a região codificadora da *GmbZIPE2* foi amplificada com oligonucleotídeos específicos Glyma05g30170.1 likeFw e Glyma05g30170.1 likeRv, (Tabela 1) e inseridos por recombinação no vetor de entrada GATEWAY pDONR201, utilizando-se a enzima BP clonase. Após a obtenção da construção pDONR201-bZIPE2, o bZIPE2 contido nos clones foram transferidos para o vetor GATEWAY de expressão em bactérias, pDEST17, por recombinação, utilizando-se a enzima LR clonase. A bactéria *E. coli* linhagem DH5 $\alpha$  foi transformada de acordo com Sambrook et al., 1989. Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo Ampicilina 50 $\mu$ g/mL e confirmados através de PCR de utilizando os primers Glyma05g30170.1 likeFw e Glyma05g30170.1 likeRv (Tabela 1).

**Tabela 1: oligonucleotídeos utilizados as para PCRs descritas no itens 1 e 2.**

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
Glyma05g30170.1 likeFw	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCAAATTCAAAGGGCTC CTTCTAAATTCTGAGAGCAGGGT
Glyma05g30170.1 likeRv	AGAAAGCTGGGTCGCGCCGCAAGCTTCTAAATTCTGAGAGCAGGGT

\*A região sombreada de azul corresponde a região do primer complementar ao respectivo gene bZIP.

### 4.2 - Transformação da linhagem de expressão *E.coli* pRARE2 com a construção pDEST17-*GmbZIPE2*

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o plasmídeo pDEST17-*GmbZIPE2* foram submetidas a extração de DNA plasmidial, de acordo com Sambrook et al.,1989. Células de *E.coli* da cepa BL21(DE3)pRARE2 foram inoculadas em meio seletivo contendo cloranfenicol (34 $\mu$ g/mL) e incubadas a 37°C, a 180 rpm por 12 horas. Após centrifugação (5000 rpm por 2 minutos), as células foram ressuspensas em 1,0 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) e concentradas para 150 $\mu$ L. Este volume foi dividido em duas alíquotas de 75 $\mu$ L, às quais foram adicionados 3 $\mu$ L de DNA plasmidial em cada. A

amostra foi incubada no gelo por 20 minutos, e para a ocorrência do choque térmico, a amostra foi transferida rapidamente para um banho-maria a 42°C por 45 segundos, e em seguida, novamente incubada no gelo por dois minutos. Ao *ependorff* foi adicionado 800µL de meio LB, e este incubado a 37°C por uma hora com agitação. As células foram concentradas para 50µL, plaqueadas em meio LB contendo Ampicilina 50µg/mL e incubadas a 37°C. A transformação foi confirmada através de PCR de colônia, utilizando como amostras as colônias que foram capazes de crescer no meio seletivo, e como primers utilizou-se oligonucleotídeos específicos para GmbZIPE2 e um oligonucleotídeo para anelamento no vetor pDEST17 (Tabela 1). Como controle negativo do PCR, utiliza-se água em vez de DNA. Os fragmentos amplificados foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% p/v, utilizando-se 80V, sendo o gel corado com brometo de etídio, visualizado e registrado utilizando-se fotodocumentador (Loccus Biotecnologia) de acordo com Sambrook *et al* (1989).

#### **4.3- Indução da expressão da proteína GmbZIPE2 em transformantes de *E.coli* pRARE2**

Colônias de *E.coli* da linhagem BL21(DE3)pRARE2 transformadas com pDEST17-bZIPE2 confirmadas como positivas foram inoculadas em meio LB contendo Ampicilina (50µg/mL) e Cloranfenicol (34µg/mL), e uma colônia de pRARE2 não transformada foi inoculada em LB contendo Cloranfenicol (34µg/mL). Depois de atingida uma D.O 600nm de 0,6 foi adicionado IPTG (Isopropil-β-D-galactopiranosídeo) na concentração final de 0,4mM e a cultura foi incubada por 4 horas nas temperaturas de 20°C e 37°C. Também foram incubadas culturas de pRARE2 transformadas com pDEST17-bZIPE2 separadamente, as quais o IPTG não foi adicionado. Para a comparação da indução da expressão, 1,0 mL de cada cultura foi centrifugada (10000xg, por 1 minuto a 4 °C) e, após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em tampão PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 9,1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM, pH 7,4). Adicionou-se posteriormente 100µL de tampão de amostra (Tris HCl 0,125M, SDS 4% v/v, glicerol 20% v/v, β-mercaptoetanol 10% p/v, Azul de bromofenol 0,004% p/v) e as amostras foram sonicadas e aquecidas a 70°C. As frações totais das proteínas das culturas transformadas e não transformadas foram estocadas a -20° C. Para verificar a fração onde se encontrava a proteína de interesse, foram extraídas separadamente as frações solúveis e insolúveis de 4mL das culturas do item anterior. As culturas foram centrifugadas (6500xg, por 15 minutos, a 4 °C) e os

precipitados então ressuspensos em 5mL de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8,0 e EDTA 2mM). Adicionou-se lisozima (1mg/mL) e Triton X- 100 0,1% v/v e as células foram incubadas a 30°C por 15 minutos. As amostras foram transferidas para o gelo e posteriormente sonicadas e centrifugadas a 12000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel - aproximadamente 500µL) foi transferido para novos tubos, enquanto a fração insolúvel (precipitado) foi ressuspensa em 100µL de tampão contendo SDS 2,3% p/v. Os extratos solúveis e insolúveis foram estocados a -20 °C.

#### **4.4 - Purificação da proteína GmbZIPE2 em condições desnaturantes**

Para a purificação das proteínas, as bactérias transformadas foram inoculadas em 500 mL de meio LB, e submetidas à indução (como descrito no item 4.3) por 12 horas, a 180 rpm, à 20°C. As células induzidas por IPTG foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm; descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensa em 5mL de tampão de lise desnaturante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, Tris 10mM, Uréia 10M), acrescido de lisozima (1mg/mL), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 0,8mM e Triton X-100 a 0,1% v/v. A mistura foi mantida por 30 minutos no gelo. As células foram rompidas mecanicamente por sonicação até a amostra ficar homogênea e em seguida centrifugadas por 20 minutos, a 14000 xg, a 4°C. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e a ele foi adicionado 500µL da resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) previamente equilibrada com o tampão de lise desnaturante. A amostra ficou sob agitação a 4°C por 15 horas e posteriormente centrifugada a 1600xg por 2 minutos. A resina foi lavada com 10mL de tampão de lavagem desnaturante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, Tris 10mM, Uréia 10M, Imidazol 20mM) e centrifugada a 1600 g por 2 minutos. Esse passo foi realizado três vezes, e todas as lavagens foram reservadas para análise em SDS-PAGE. Após as lavagens, adicionou-se à resina 500µL de tampão de eluição desnaturante (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, Tris 10mM, Uréia 10M, Imidazol 250mM) e a mistura foi incubada sob agitação a 4°C por 16 horas. Posteriormente a amostra foi eluída três vezes, em intervalos de uma hora. O eluato foi centrifugado a 1600 xg por 2 minutos e todos os sobrenadantes foram reservados. A pureza das lavagens e das eluições foram analisadas por SDS- PAGE 12% corado com coomassie blue.

#### **4.5 - Purificação da proteína GmbZIPE2 em condições nativas**

A purificação em condições nativas foi feita de modo similar à purificação desnaturante, mudando-se apenas os tampões. Tampão de lise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM, pH 8), Tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 20mM, pH 8), Tampão de eluição (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 250mM, pH 8)

#### **4.6 - Obtenção de anticorpos policlonais contra GmbZIPE2**

A proteína bZIPE2 purificada foi utilizada para a produção de anti-soro policlonal utilizando-se um coelho da raça Nova Zelândia. Após a coleta de sangue para a obtenção do soro pré-imune, foi realizada a primeira imunização. A segunda e a terceira imunizações ocorreram, respectivamente, 20 e 35 dias após a primeira imunização. Nas três imunizações foram utilizadas aproximadamente 200µg da proteína GmbZIPE2 purificada. Na primeira imunização foi acrescido o adjuvante completo de Freund, na segunda e terceira imunizações utilizou-se o adjuvante incompleto de Freund. As aplicações das injeções foram intramusculares e realizadas nas patas traseiras do animal. Foram realizadas três coletas de sangue 7, 14 e 21 dias após a terceira imunização. O sangue coletado foi incubado a 37°C por uma hora e posteriormente por 15 horas a 4°C. O anti-soro foi obtido após a centrifugação do sobrenadante por 10 minutos à 10000 xg, e este foi aliquoteado e estocado a -80°C.

#### **4.7- Detecção da presença da proteína GmbZIPE2 em amostras de soja infectadas por *P. pachyrhizi***

Para a investigação de qual diluição do anti-soro seria utilizada foram realizados testes através de Western blotting utilizando como amostra as proteínas purificadas, e como anticorpo primário as diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000 dos antisoros. Após a identificação da melhor diluição a ser utilizada, foi realizado um Western blotting usando como amostra extratos protéicos de soja infectada por *P. pachyrhizi* (60µg/µl) em diferentes tempos de inoculação e como anticorpo primário o anticorpo policlonal anti-GmbZIPE2 produzido. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG conjugado

com a enzima fosfatase alcalina. Os extratos de soja infectada por *P. pachyrhizi* foram cedidos gentilmente pelo professor Everaldo Gonçalves de Barros.

#### **4.8 - Determinação da capacidade de ligação da proteína GmbZIPE2 a cis-elementos específicos através de Ensaio de Mudança da Mobilidade Eletroforética (EMSA)**

Fragmentos de DNA genômico foram amplificados utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a amplificação do G-box (CACGTG) e H-box (CCTACC) (Dröse-Laser *et al*, 1997), que então foram biotinilados utilizando o kit 3'OH de marcação de biotina (Pierce). Para a realização dos ensaios de mudança da mobilidade eletroforética, foi utilizado o kit EMSA LightShift quimioluminescente (Pierce), de acordo com os protocolos do fabricante. Cada reação de ligação de 20  $\mu$ L continham 20mM de tampão HEPES pH 7,9, 100mM KCl, 5% (v/v) glicerol, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0,1% (v/v) Tween 20, 25 ng/mL de poli-dI:dC, 20 fmol de sonda marcada com biotina, e 2 $\mu$ g de GmbZIPE2. DNA da sonda não marcada com biotina foi utilizado como competidor específico, e 1 $\mu$ L de anticorpo anti-His-GmbZIPE2 foi adicionado depois da incubação para identificação do complexo proteína-DNA. As reações de ligação foram incubadas à temperatura ambiente por 20 min. Um gel de poliacrilamida nativo 6% (37,5:1) em 0,5mM de Tris borato-EDTA contendo 3% de glicerol foi pré-corrido por 1h a 100V em 0,5mM de Tris borato-EDTA (tampão TBE), e 5 $\mu$ L de tampão de carregamento foi adicionado a reação de ligação, onde então os 25 $\mu$ L foram separados por eletroforese em gel a 80V a 90min. O gel foi então transferido para uma membrana de nylon positivamente carregada (Amersham Biosciences) por 1h a 320mA, submetido a cross-link por UV a 120mJ/cm<sup>2</sup> por 1min, e visualizado por quimioluminescência em filmes de raio-x.

#### **4.9 - Produção de protoplasto de soja e superexpressão de GmbZIPE2**

Folhas de soja em estágio de crescimento V3 a V6 foram desinfetadas através de borrifação utilizando álcool 70% seguido de água destilada, água sanitária 0,1% e água destilada novamente. Em seguida as folhas foram cortadas em pequenos pedaços (aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) e foram agrupadas em placas de petri de 140 $\times$ 15 mm, onde 15 mL da solução enzimática filtrada com filtro de 0,22  $\mu$ m (Celulase 2%, Pectoliase

0,1%, Manitol 0,4M, MES pH 5,8, 5mM) foi adicionada em cada placa. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas no shaker a 30°C, 60 rpm por 4 a 5 horas. Após esse período as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Manitol 0,4mM, Hepes-KOH 5mM, pH 5,5) e a solução filtrada em uma peneira de 65 µm. O filtrado foi dividido em tubos falcons de 15 mL e centrifugado a 700xg, 25°C por 3 minutos e o pellet foi lavado duas vezes com tampão de eletroporação (Hepes-KOH 25mM, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, Manitol 0,6mM, pH 7,2 ajustado com KOH). A solução foi concentrada nas lavagens para o volume usado na eletroporação (aproximadamente 0,5mL por amostra) e deixada no gelo por 30 à 60 minutos. Após esse período as células foram eletroporadas (400µL de solução de protoplasto, 400 µL contendo 10 µg de DNA(YFP-bZIPE2), 40 µg de ssDNA diluídos em tampão de eletroporação) na condição de 25µF de capacitância e 2500V. As células foram mantidas por 15 minutos no gelo e em seguida adicionadas a 8mL de solução MS soja e Manitol estéril e vertidas em placas de petri estéreis. As células foram induzidas por 36 horas em um ambiente úmido a aproximadamente 21°C, e ao fim da indução, as células foram centrifugadas a 700 xg por 10 minutos e os protoplastos coletados.

#### **4.10 - Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com três unidade de DNase livre de RNase (Invitrogen). Após a extração e purificação, o RNA foi quantificado (Thermo Fisher Scientific EVO 60) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

#### **4.11- PCR em Tempo Real (qRT-PCR)**

Os testes, validações e procedimento de PCR em Tempo Real foram conduzidos seguindo manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da

expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct:  $2^{-\Delta Ct}$  e  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o *primer* específico para a actina de soja (Tabela 2), que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

**Tabela 2 .- Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão por real-time-PCR**

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Alvo
GmbZIPE2 Fw	CAACCACAGACACAGCCACAA	Glyma05g30170.1
GmbZIPE2 Rv	GCGAACTGAGATTCGAGGTCTCT	Glyma05g30170.1
GmPAL1Fw	CAACAGCCAGATCCATTGCA	Glyma02g47940
GmPAL1Rv	ATCTGTGGACCAAGCCACTGA	Glyma02g47940
GmO-MT Fw	GGACCGGCTTCTCAGGTTATT	Glyma07g05480
GmO-MT Rv	TTTGGCCATGTTGGAGATCTT	Glyma07g05480
GmANK1 Fw	TCCTTGAGGCTGGAGCAAA	Glyma04g12950.2
GmANK1 Rv	TCTGCCATAACCAGCTGCATA	Glyma04g12950.2
GmChs15 – 6 Fw	CAGGCACAAAGGGCAGAAG	Glyma11g01350.1
GmChs15- 6 Rv	GTGCTCTGATCAACACAGTTTGGT	Glyma11g01350.1
GmChs15 – 12 Fw	TGTCAAGTGCTTGTGTTCTTTTCA	Glyma01g43880.1
GmChs15 – 12 Rv	TTCACCTGTGGTTTTATGTCCATT	Glyma01g43880.1
GmPR-1 Fw	GGAATCACAACCTTTACACAGGAATACT	Glyma15g06790
GmPR-1 Rv	GGAAGCAAATTTCTGGAGTCTACAA	Glyma15g06790
Actina Fw	GAGACATCCGAGACCAGCTC	Glyma08g19420
Actina Rv	AATGCCTGATGCTTCCATTC	Glyma08g19420

#### **4.12 - Técnicas de Biologia Molecular**

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não estão descritas, como preparo de géis de agarose e plasmídeos, transformação de bactérias, digestão de DNA por enzimas de restrição, preparo de tampões e soluções estoques foram conduzidas de acordo com Sambrook *et al* (1989).

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

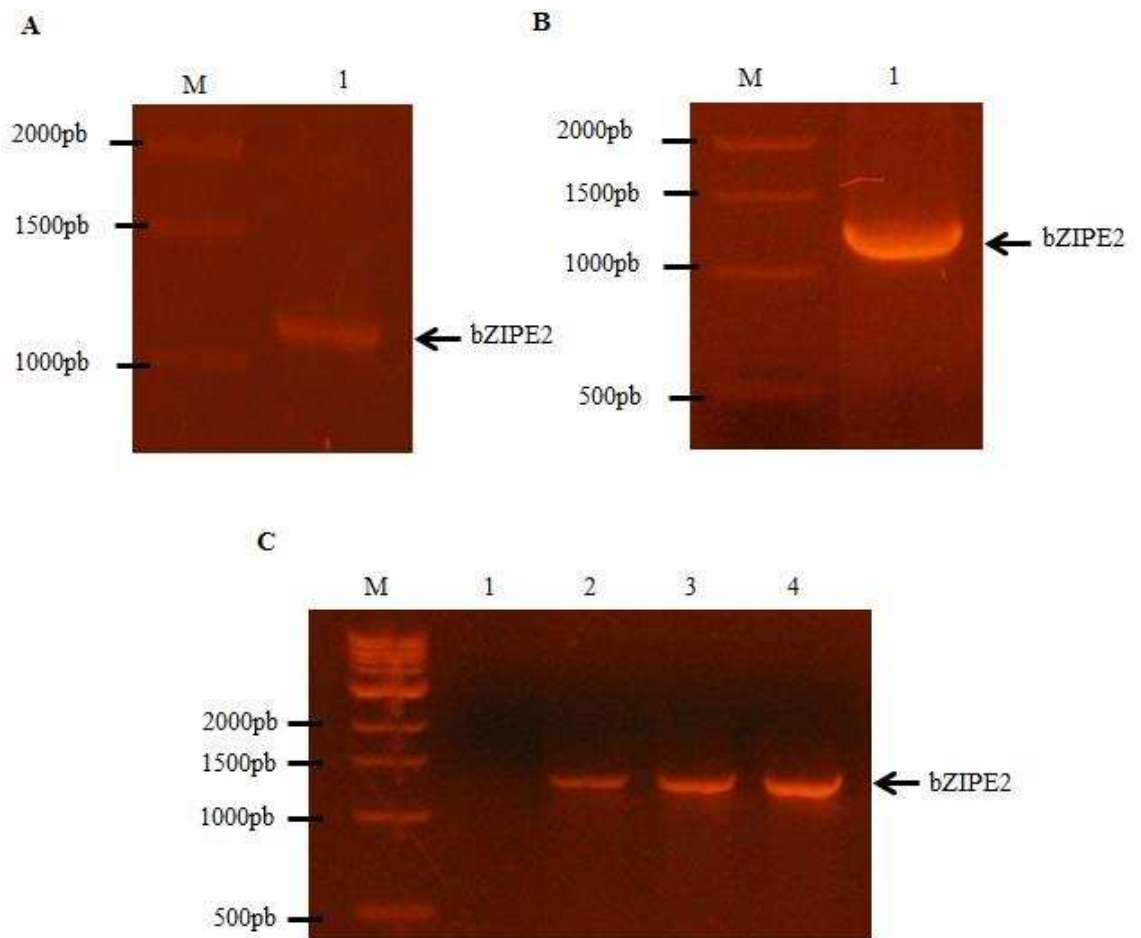
### 5.1 - Obtenção de pRARE2 transformada com o plasmídeo pDEST17-GmbZIPE2

Para a obtenção da proteína purificada GmbZIPE2, foi necessário primeiramente a obtenção de uma linhagem de bactéria expressando heterologicamente a proteína GmbZIPE2. Para isso inicialmente foi realizada a clonagem no vetor de entrada pDONR201 (Anexo), seguida da clonagem no vetor de expressão pDEST17 (Anexo), e finalmente a realização da transformação de *E.coli* BL21(DE3)pRARE2 com o plasmídeo pDEST17 contendo o gene *GmbZIPE2*.

A confirmação da clonagem no vetor de entrada pDONR201, no vetor de expressão pDEST17 e a confirmação da transformação da linhagem BL21(DE3)pRARE2 com o plasmídeo, foram realizadas por PCR (utilizando os primers Glyma05g30170.1like Fw e Glyma05g30170.1like Rv, Tabela 1), e os resultados das ampliações das construções foram aplicados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio.

As ampliações apresentadas na figura 5 correspondem às reações de PCR das construções de DNA extraídas dos clones transformantes. Na letra A, o vetor pDONR201-bZIPE2, na letra B o vetor pDEST17-bZIPE2. Na letra C da figura 5 estão apresentadas as reações de PCR de colônia da construção pDEST17-bZIPE2 em *E. coli* pRARE2, sendo que em três colônias (canaletas 2, 3 e 4) foi confirmada a presença do plasmídeo pDest17-bZIPE2.

Nas letras A, B e C da figura 5 pode-se observar a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1100 pares de bases, um tamanho condizente com o valor estimado da sequência de cDNA do *GmbZIPE2* (Glyma05g30170.1), que é de 1128 pares de bases.



**Figura 5: Gel de agarose para visualização dos produtos das PCRs de confirmação das clonagens do bZIPE2.** **A.** Clonagem no vetor pDONR201. **M:** 1 kb DNA Ladder (Biolabs); **1:** Banda de amplificação de bZIPE na construção pDONR201-bZIPE2. **B.** Clonagem no vetor pDEST17. **M:** 1 kb DNA Ladder (Biolabs); **1:** Banda de amplificação de bZIPE2 na construção pDEST17-bZIPE2 em DH5 $\alpha$ . **C.** Construção pDEST17-bZIPE2 em *E. coli* BL21(DE3) pRARE2. **M:** 1kb DNA Ladder BioLabs; **1:** Controle negativo, água aplicada no lugar de DNA; **2 a 4:** Colônias de pRARE2 transformadas com o pDEST17-bZIPE2.

## 5.2 – Expressão e purificação de GmbZIPE2-His

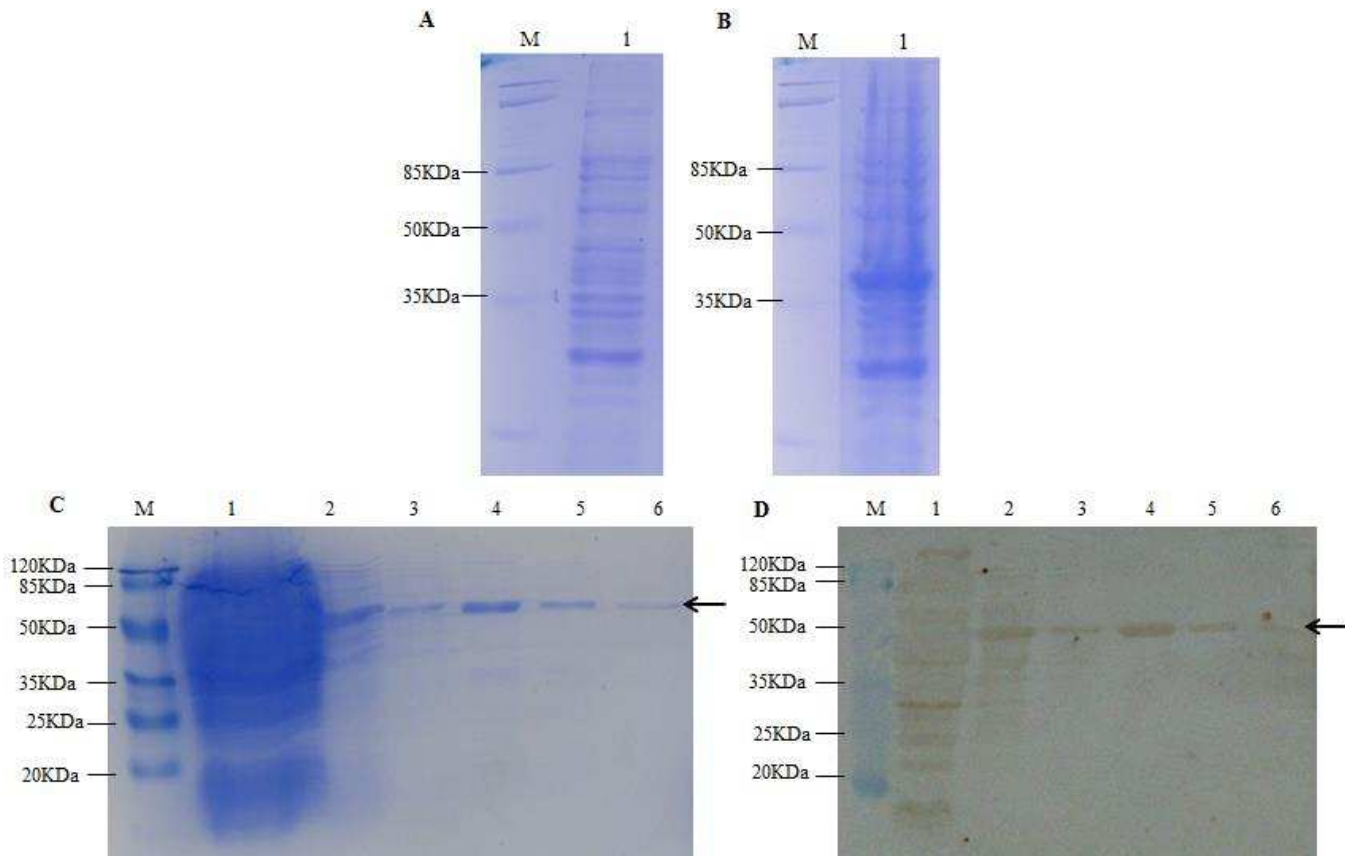
Para a purificação eficiente de uma proteína, inicialmente deve-se testar os seus parâmetros de indução. Após a indução, um método eficiente de purificação deve ser empregado. No caso da proteína GmbZIPE2 o método de purificação utilizado baseia-se em cromatografia de afinidade pela cauda de Histidina a qual a proteína foi fusionada (através da clonagem no plasmídeo pDEST17). Para o desligamento da proteína da coluna de purificação utilizou-se imidazol, um composto com estrutura análoga ao radical do aminoácido Histidina, que compete com 6xHis-bZIPE2 pela ligação na resina. A confirmação da purificação de GmbZIPE2 foi realizada através de eletroforese em SDS-PAGE e Western Blotting, utilizando com anticorpo primário anti-His.

Após a colônia 3 de 6xHis-bZIPE2 ser induzida deu-se início a purificação de bZIPE2. Após as purificações, as frações não ligantes, as lavagens e eluições foram analisadas por SDS-PAGE (figura 6C) e quantificadas pelo método de Bradford.

Foi possível confirmar a indução da expressão da proteína GmbZIPE2 após 12 horas da adição de IPTG a 20°C (figura 6A e 6B) e também verificar que esta se encontra na fração solúvel. Utilizou-se como tempo padrão para a purificação 12 horas de indução a 20°C. Verificou-se que a proteína é mais induzida a 37°C, porém houve uma dificuldade de purificação nesta condição, supostamente devido a uma maior instabilidade das proteínas nessa temperatura, como pôde ser verificado por um perfil de fragmentação das proteínas (dados não mostrados), sendo então que para um melhor desempenho de purificação escolheu-se a temperatura de 20°C para indução da expressão da proteína heteróloga GmbZIPE2.

O tamanho estimado a partir da sequência de GmbZIPE2 é de 42,18kDa. Porém alguns fatores alteram o tamanho da proteína final originada de uma clonagem com o pDEST17. Entre a região do plasmídeo que contém o sítio de iniciação (ATG) até o início do sítio o gene de interesse proteína é inserido, existem aproximadamente 66 pares de bases que codificam aminoácidos que são adicionados à proteína final, resultando em um acréscimo de aproximadamente 2,8 kDa ao tamanho final de GmbZIPE2. Então, na verdade a proteína recombinante bZIPE2 tem o tamanho de aproximadamente 45 kDa, que está condizente com o tamanho visto nas figuras 6C e 6D.

A purificação se mostrou eficiente, apresentando a proteína alvo purificada nas eluições. A primeira eluição bZIPE2 (Canaleta 4 da figura 6C, com uma concentração de aproximadamente 0,440 mg/mL) foi utilizada para a imunização dos coelhos.



**Figura 6: Indução da expressão e purificação de GnbZIPE2.** **A.** SDS-page das amostras no tempo zero da indução. **M:** Prestained protein marker Fermentas **1:**Fração de proteínas totais extraídas de pRARE2 contendo o plasmídeo pDEST17-GmbZIPE2. **B.** SDS-page das amostras após 4 horas de indução. **M:** Prestained protein marker Fermentas **1:**Fração de proteínas totais extraídas de pRARE2 contendo o plasmídeo pDEST17-GmbZIPE2. **C.** SDS-page das frações da purificação de bZIPE2 **M:** Marcador pré corado Fermentas; **1:** Fração não ligada; **2:** Primeira lavagem; **3:** Segunda lavagem; **4:** Primeira eluição; **5:** Segunda eluição; **6:** Terceira eluição **D.** Confirmação da purificação do bZIPE por Western blotting. **M:** Marcador pré corado Fermentas. **1:** Fração não ligante; **2:** Primeira lavagem; **3:** Segunda lavagem; **4:** Primeira eluição; **5:** Segunda eluição; **6:** Terceira eluição. **Seta:** Proteína bZIPE2

### 5.3 - Detecção da presença da proteína GmbZIPE2 em amostras de folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi*

Para provar que o anticorpo policlonal anti-GmbZIPE2 produzido é capaz de reconhecer a proteína GmbZIPE2 na planta, o ensaio de western blotting foi realizado utilizando como amostras extratos protéicos extraídos de folha de soja infectada por *P. pachyrhizi*.

Para a obtenção de um western blotting eficiente foi realizado um teste de diluição do anticorpo anti-GmbZIPE2. A diluição 1:500 se mostrou mais eficiente na detecção da proteína GmbZIPE2 por imunoblotting (resultados não mostrados), portanto foi utilizada esta relação para os ensaios de especificidade do anti-soro.

Na figura 7A está representado o SDS-PAGE referente aos extratos protéicos de soja resistente a *P. pachyrhizi* e na 7B está representado o SDS-PAGE referente aos extratos proteicos de soja susceptível (Embrapa 48) a *P. pachyrhizi*. A confirmação pelo western blotting de que o anticorpo anti-GmbZIPE2 reconhece a proteína GmbZIPE2 nos extratos protéicos de soja infectada por *P.pachyrhizi* está apresentando na Figura 7B e 7D. Foram utilizadas amostras de plantas de soja resistentes e susceptíveis a *P. pachyrhizi* em diferentes tempos após a infecção. A banda referente ao GmbZIPE2 é a banda localizada um pouco a cima do marcador de 40KDa, condizente com o tamanho estimado da proteína GmbZIPE2 nativa, que é de aproximadamente 42,18kDa.

Comparando o tempo zero de inoculação no western blotting realizado com os extratos protéicos de soja resistente (Figura 7B) com o de soja susceptível (Figura 7D), percebe-se claramente uma maior quantidade de GmbZIPE2 nas plantas resistentes, indicando que expressão do gene *GmbZIPE2* é maior em plantas resistentes a *P. pachyrhizi*.

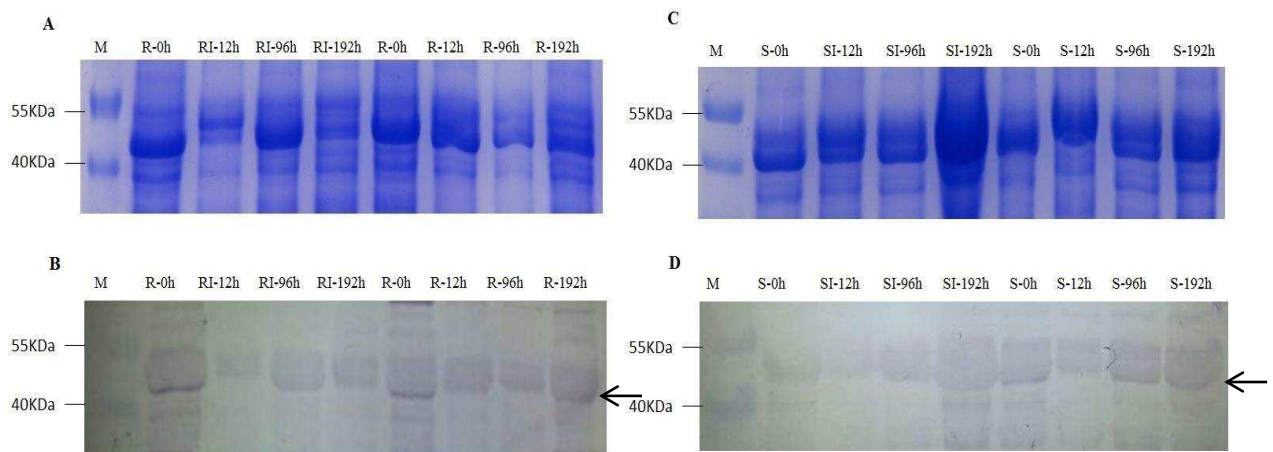
Observa-se um padrão de diminuição da quantidade de GmbZIPE2 para o tempo de 12H após a inoculação, em plantas resistentes e susceptíveis, condizente com a penetração do fungo *P.pachyrhizi* em células epidermais da folha (que ocorre dentro de 24 horas após inoculação), o que mostra um possível mecanismo de repressão da expressão da proteína pelo fungo durante o curso da infecção (Vittal *et al.*, 2013). Esse resultado condiz com estudos feitos por Alves 2013, que identificou por qRT-PCR que o gene *GmbZIPE2* é reprimido durante a infecção em plantas susceptíveis e resistentes.

Nas plantas resistentes a banda referente a proteína GmbZIPE2 está bem forte no tempo zero de inoculação, praticamente não aparece em extratos protéicos de plantas

inoculadas com o fungo *P. pachyrhizi* (Figura 7B). Nas plantas susceptíveis inoculadas e mock, a intensidade da banda referente a GmbZIPE2 é praticamente a mesma em todos os tempos de infecção (Figura 7D).

O desaparecimento da banda de GmbZIPE2 nas plantas resistentes inoculadas indica que o fungo consegue diminuir drasticamente a expressão do gene *GmbZIPE2*, estando de acordo com dados de Alves (2013) que afirmam que a expressão de *GmbZIPE2* é reprimida em plantas infectadas por *P. pachyrhizi*.

Nos extratos de soja susceptível a quantidade de GmbZIPE2 é pequena, e parece se manter constante ao longo da infecção, exceto no tempo de 12 horas, em que o fungo penetra na planta diminuindo ainda mais a expressão de *GmbZIPE2*. Em plantas susceptíveis os patógenos causam danos muito mais severos comparado a plantas resistentes. O fato de plantas susceptíveis terem baixa concentração de GmbZIPE2 sugere que esse fator de transcrição desempenha um papel na defesa da planta.



**Figura 7: Reconhecimento da proteína GmbZIPE2 em amostras de soja infectadas por *P. pachyrhizi*.** **A:** SDS-page com amostras derivadas de plantas de soja resistentes a *P. pachyrhizi* **B:** Western blotting SDS-page com amostras derivadas de plantas de soja resistentes a *P. pachyrhizi*. **M:** Marcador de proteínas pré-corado Page Ruler; R-0h: Planta resistente no tempo zero de inoculação; RI-12h: Planta resistente inoculada 12 horas após inoculação; RI-96h: Planta resistente inoculada 96 horas após inoculação; RI-192h: Planta resistente inoculada 192 horas após inoculação; R-12h: Planta resistente mock inoculada 12 horas após a inoculação; R-96h: Planta resistente mock inoculada 96 horas após a inoculação; R-192h: Planta resistente mock inoculada 192 horas após a inoculação. **C:** SDS-page com amostras derivadas de plantas de soja resistentes a *P. pachyrhizi* **D:** Western blotting SDS-page com amostras derivadas de plantas de soja susceptíveis a *P. pachyrhizi*. **M:** Marcador de proteínas pré-corado Page Ruler; S-0h: Planta susceptível no tempo zero de inoculação; SI-12h: Planta susceptível inoculada 12 horas após inoculação; SI-96h: Planta susceptível 96 horas após inoculação; SI-192h: Planta susceptível inoculada 192 horas após inoculação; S-12h: Planta susceptível mock inoculada 12 horas após a inoculação; S-96h: Planta susceptível mock inoculada 96 horas após a inoculação; S-192h: Planta susceptível mock inoculada 192 horas após a inoculação. **Seta:** Proteína bZIPE2

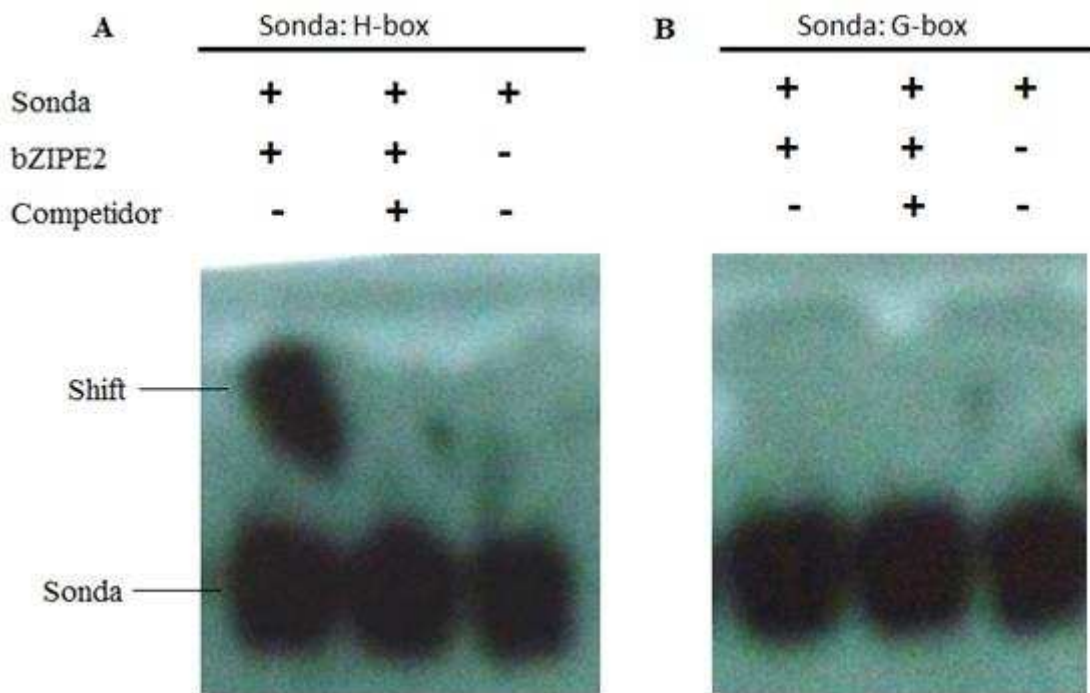
#### 5.4 - O fator de transcrição GmbZIPE2 se liga ao cis-elemento H-box

Dröge-Laser e colaboradores (1997) provaram que o fator de transcrição bZIP denominado G/HBF1 se liga aos cis-elementos H-box e G-box, presentes no promotor do gene que codifica chalcona sintase CHS15. Essa abordagem nos pareceu interessante, nos levando a realizar um experimento similar, utilizando como sonda do H-box a sequência AGACTCACCCTACCCTACTTCCTATCC e do G-box a sequência GCTTTGGT GTTGCCACGTGAATACT. As regiões sublinhadas são as sequências consenso desses cis-elementos.

A formação do complexo bZIPE2/sonda marcada, pode ser observado na figura 8A quando se utiliza a sonda H-box biotinizada. Com a adição de uma quantidade excessiva da sonda correspondente não marcada (cerca de 4000 vezes a mais), a formação do complexo foi impedida.

O H-box é um cis-elemento relacionado com a defesa da planta contra patógenos por estar relacionado com o controle da via de biossíntese de fenilpropanóides. Esse cis-elemento é necessário para a ativação do promotor do gene *CHS15* (Loake *et al*, 1992). O H-box parece ser essencial para a ligação de um fator de transcrição com um promotor relacionado a defesa contra patógenos. Quando o promotor de *chs15* foi mutado na porção do H-box (CCTACC para CCatCC ou AATAAA), prejudicou a ligação do fator de transcrição G/HBF1 a esse promotor determinando assim o cis-elemento CCTACC como o sítio de ligação de G/HBF1 (Dröge-Laser *et al*, 1997).

Quando se utiliza a sonda G-box o complexo proteína-DNA não foi observado (Figura 8B). Já foi relatada na literatura que em alguns casos o fator de transcrição pode se ligar mais fracamente ao G-box. Dröge-Laser e colaboradores (1997) demonstrou através do ensaio de mudança eletroforética que fator de transcrição G/HBF1 foi capaz de se ligar às sondas H-box e G-box, porém a ligação é mais fraca para o G-box.

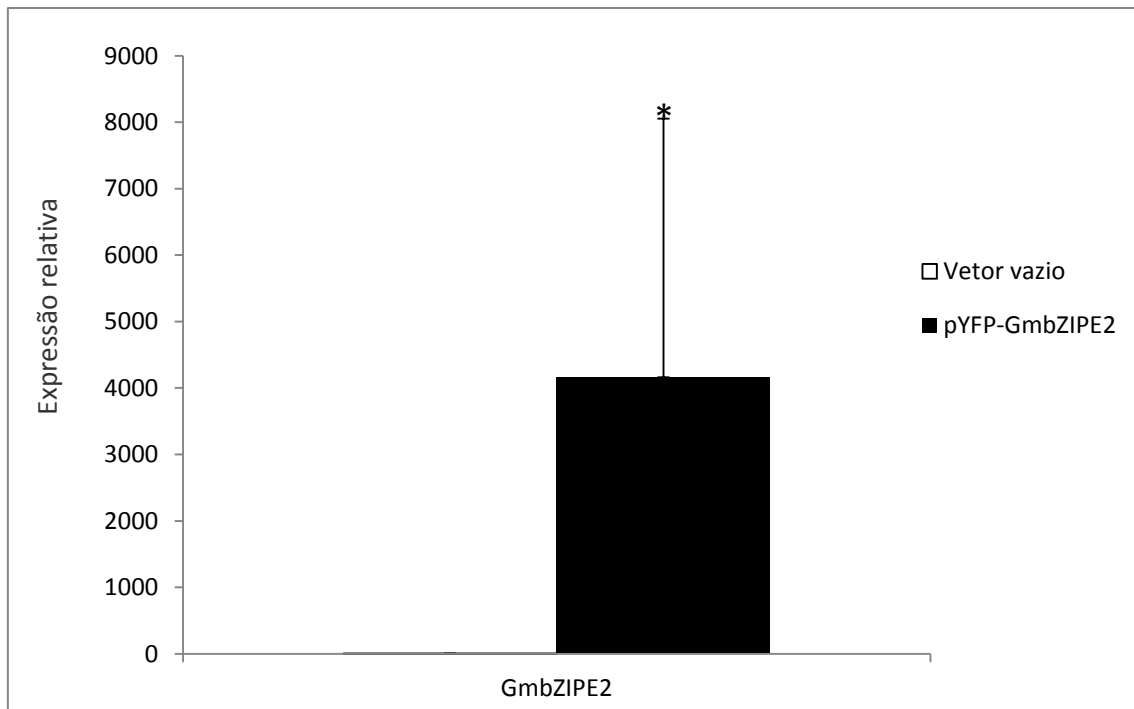


**Figura 8: Ensaio de mobilidade eletroforética de ligação do bZIE2 com os cis-elementos H-box e G-box.** A proteína recombinante GmbZIPE2 foi misturado com as sondas marcadas com biotina e os complexos DNA-proteína foram separados em géis de poliácridamida nativo. **A.** a sonda é a fita-dupla de DNA com a sequência do H-box, o competidor é a sonda H-box não marcada; **B.** A sonda é a fita-dupla de DNA com a sequência do G-box, o competidor é a sonda G-box não marcada.

## 5.5 - Super-expressão de GmbZIPE2 em protoplasto de soja

A super-expressão de GmbZIP2 em protoplastos derivados de folha de soja é uma ferramenta importante no estudo da funcionalidade dessa proteína. Análises da expressão de genes importantes para a defesa da planta nessa condição de super-expressão de GmbZIPE2 geram valiosas informações sobre a função dessa proteína em vias de defesa da planta.

Protoplastos derivados da folha de soja foram eficientemente eletroporados, possuindo assim, o plasmídeo pYFP-GmbZIPE2. Como controle, protoplastos foram eletroporados com o plasmídeo vazio. Após 48 horas de indução, os protoplastos foram capazes de super-expressar o gene *GmbZIPE* (figura 9). A expressão de GmbZIPE2 nesses protoplastos foi de aproximadamente 4000x maior que no controle (figura 9). A viabilidade dos protoplastos foi confirmada em microscópio de luz.

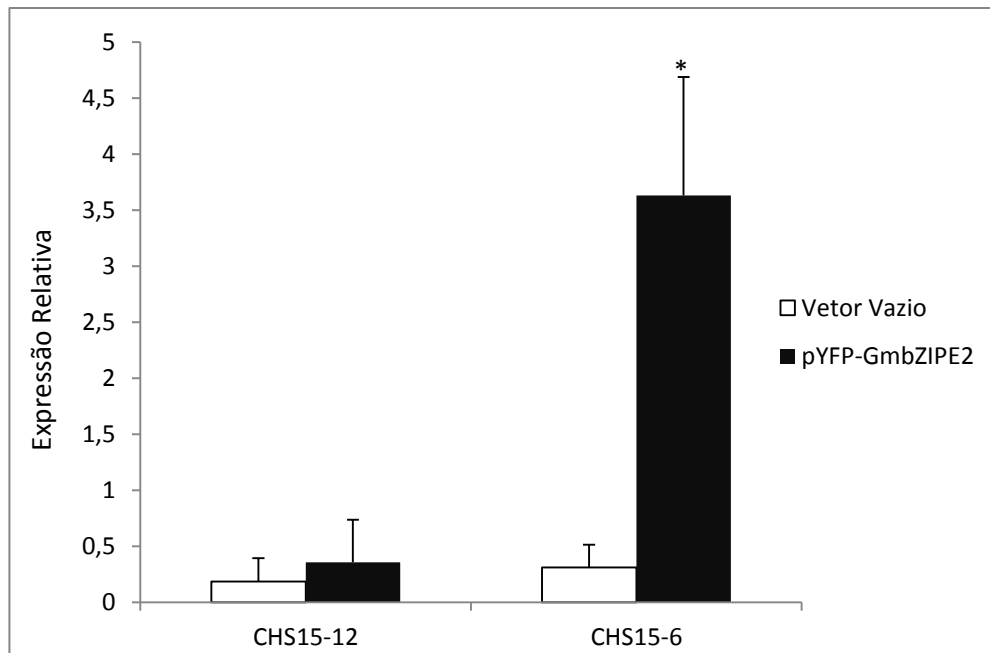


**Figura 9: Análise da expressão relativa de *GmbZIPE2*.** O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno o gene da Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 6 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão). As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do tratamento controle ao nível de 95% de significância pelo Teste t de Student.

## **5.6 - Análise da expressão dos genes *CHS15-12* (Glyma01g43880.1) e *CHS15-6* (Glyma11g01350.1) em protoplastos de soja super-expressando *GmbZIPE2***

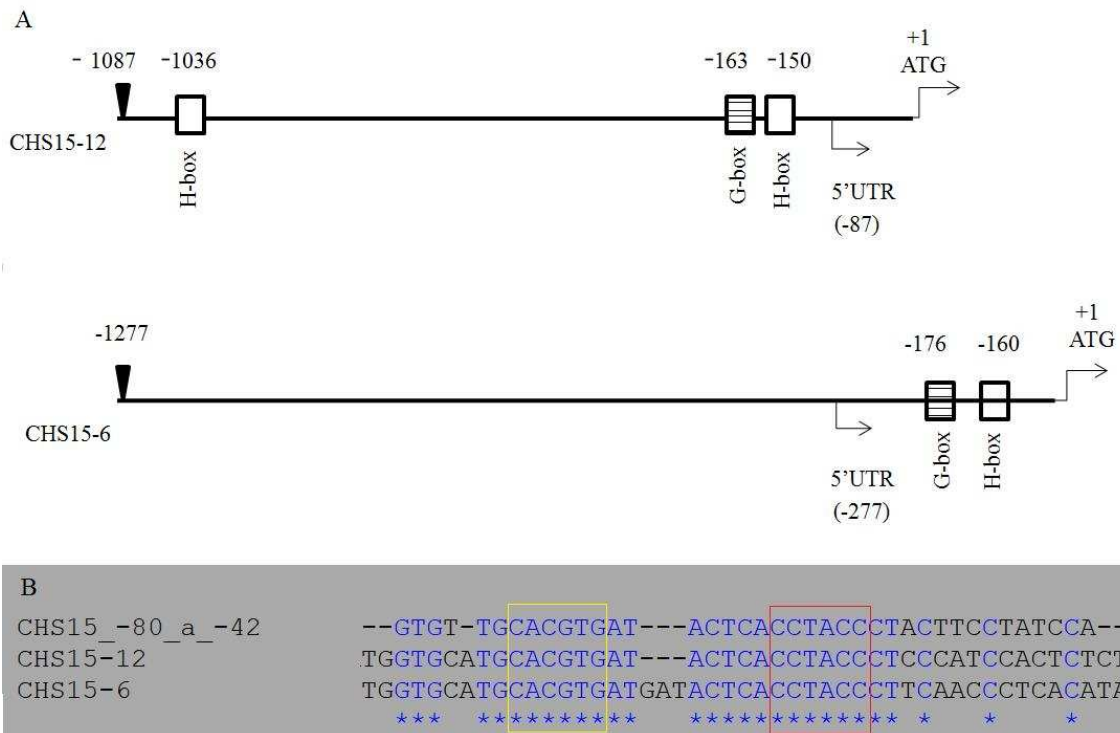
A via de biossíntese de fenilpropanóides é uma das principais vias de defesa de plantas contra o ataque de patógenos. A enzima chalcona sintase é uma enzima chave da via, que contém os cis-elementos H-box e G-box em seu promotor. Já sabemos que o *GmbZIPE2* é capaz de se ligar ao H-box, e além disso estudos realizados por Alves, 2013b mostraram que o gene *GmbZIPE2* é responsivo ao patógeno *P. pachyrhizi*, fazendo a via de biossíntese de fenilpropanóides um alvo dos nossos estudos.

Foi realizado um ensaio de qRT-PCR para determinar se os genes *CHS15-12* e *CHS15-6* são diferentemente expressos em células super-expressando *GmbZIPE2*. Somente *CHS15-6* foi induzido nessa situação (Figura 10).



**Figura 10: Análise da expressão dos genes *CHS15-12* e *CHS15-6* em protoplastos de soja super-expressando ou não o gene *GmbZIPE2*.** O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta C_t}$ , utilizando como controle endógeno o gene da Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 6 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão). As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do tratamento controle ao nível de 5% de significância pelo Teste t de Student.

A explicação da indução do *CHS15-6* pode estar na presença/ausência de cis-elementos em seu promotor. Uma comparação da região promotora de *CHS15-12* e *CHS15-6* está mostrada na figura 11.



**Figura 11: Análise comparativa dos cis-elementos que compõe a região promotora de *CHS15*: A.** Análise comparativa dos cis-elementos que compõe a região promotora de *CHS15-12* e *CHS15-6*. A região analisada foram as primeiras 1000 pb do promotor de cada gene. O retângulo aberto representa o H-box, o retângulo rachurado representa o G-box. A região seguida da seta abaixo da linha é a provável região 5'UTR e a região seguida da seta acima da linha é onde ocorre o início da tradução. **B.** Alinhamento da região de ligação do G/HBF-1 no promotor de *CHS15* (região -80 a -42) (Dröse-Laser *et al*, 1997) com a região em que se encontra o G-box e H-box dos genes *CHS15-12* e *CHS15-6*. Retângulo amarelo está evidenciando o G-box e o retângulo vermelho está evidenciando o H-box.

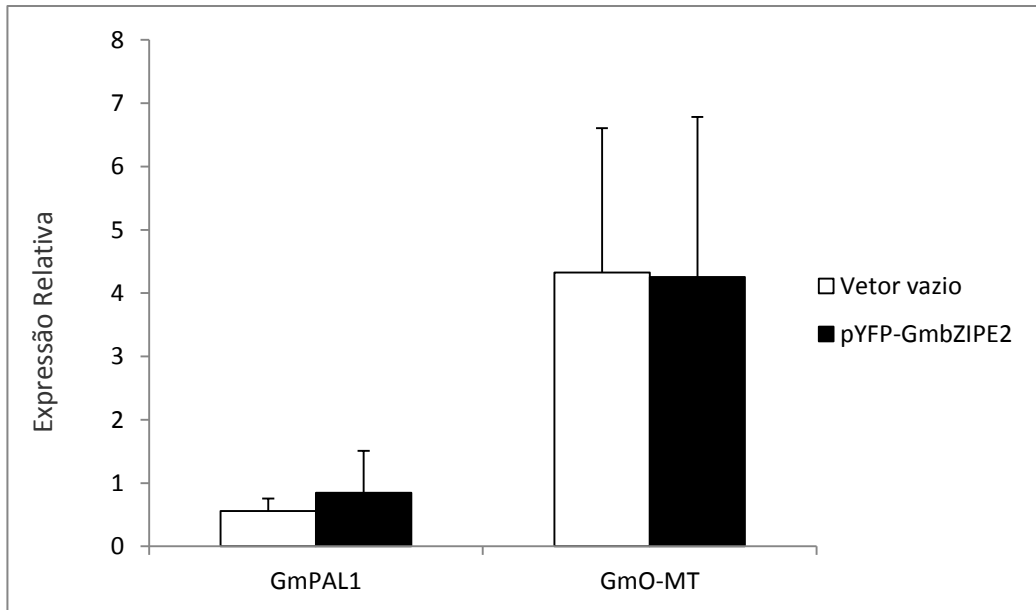
Surpreendentemente o *CHS15-6* (induzido) não possui nem H-box e nem G-box na sua área dita promotora, já o *CHS15-12* (não induzido) possui esses dois cis-elementos em seu promotor. Uma análise de 3000pb da região promotora do *CHS15-6* foi realizada, e ainda sim não há a presença de H-box e G-box.

Apesar de não possuir H-box e G-box em seu promotor, o *CHS15-6* possui esses dois cis-elementos na sua região 5'UTR. Apesar de na maioria das vezes não ser considerada como parte do promotor, a região 5'UTR já foi descrita como possível região de ligação para fatores de transcrição (Kurdrid *et al*, 2012). Uma hipótese interessante é que os fatores de transcrição responsivos a patógenos se ligam na região 5'UTR do gene *CHS15-6*. Para aumentar a credibilidade dessa hipótese, percebe-se que a região que Dröse-Laser *et al*, 1997 identificou como a região de ligação de G/HBF-1 no gene *chs15* é muito semelhante a região 5'UTR do gene *CHS15-6* (Figura 11B). A região em que o G/HBF-1 se liga é um G-box seguido da sequência ATACTCA e

finalizando com um H-box. Já a sequência encontrada na 5'UTR do *CHS15-6* é um G-box seguido da sequência ATG ATACTCA finalizando com um H-box (figura 11B). Porém o promotor de *CHS15-12* (não induzido) possui a região entre o G-box e H-box idêntica a essa porção do promotor do gene *CHS15* estudado por Dröse-Laser e colaboradores, 1997. Este *CHS15* da literatura é um gene de feijão, já os *CHS15-6* e *12* são genes de soja. Uma possível explicação para a não indução do *CHS15-12* e a indução de *CHS15-6* é que a porção GAT existente entre os cis-elementos G-box e H-box seja imprescindível pra ligação do GmbZIPE2 no promotor do gene *CHS15* em soja.

A indução de um gene da chalcona sintase em células super-expressando GmbZIPE2 é um indício de uma possível atuação desse transfator em uma via de defesa da planta contra patógenos. A chalcona sintase é a enzima chave da biossíntese de fenilpropanóides, uma das principais vias de defesa da planta, pois produz metabólitos secundários que auxiliam na defesa da planta contra patógenos.

A expressão de genes que codificam outras enzimas da via de biossíntese de fenilpropanóides também foi analisada por qRT-PCR. Os genes *PAL-1* e *O-MT* (ou *COMT*) codificam enzimas que também participam da via de biossíntese de fenilpropanóides (Figura 3). Os promotores desses dois genes contém o cis-elemento H.box. Porém esses genes não foram diferentemente expressos em células super-expressando GmbZIPE2, como pode ser observado na figura 12.



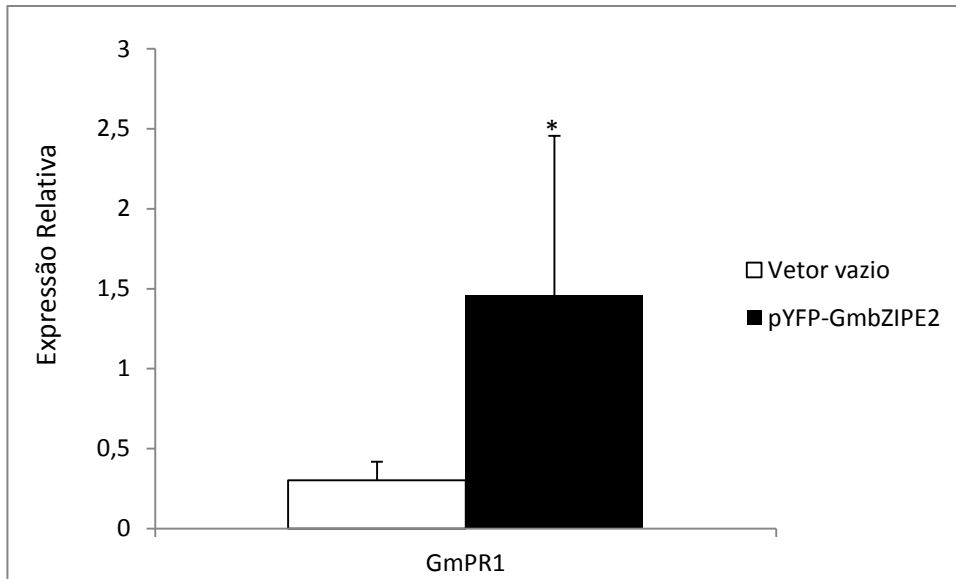
**Figura 12: Análise da expressão dos genes *PAL1* e *O-MT* em protoplastos de soja super-expressando ou não o GmbZIPE2.** O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , utilizando como controle endógeno o gene da Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 6 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão).

## 5.7 - Análise da expressão do gene PR-1 em protoplastos de soja

Os genes PRs (pathogen related proteins) são ativados na planta através do ataque de determinados tipos de patógenos. As proteínas PRs se acumulam nos tecidos infectados e circundantes e também em tecidos não infectados, sendo então, relacionadas com a HR e SAR (systemic acquired resistance) (Kombrink and Smomssich, 1997; van Loon *et al*, 1999). Além disso, já foi demonstrado que a via do SA (relacionada com a HR) é frequentemente ativada em resposta a interação da planta com fungos patogênicos biotróficos e a sua ativação conduz à expressão de genes PR (Mur *et al*, 2005). Vários membros da família PR mostraram ter atividade antifúngica em ensaios *in vitro* (Kombrink and Smomssich 1997).

O gene utilizado para nossos experimentos foi o *PR-1* (pathogen related-1). O gene *PR-1* não contém no seu promotor os cis-elementos H-box e G-box, indicando que a proteína GmbZIPE2 não deve interagir fisicamente com o promotor do gene *PR-1*. No promotor de *PR-1* existe o sítio de ligação de TGAs, que são fatores de transcrição da família bZIP, que atuam como reguladores da sinalização de SA e estão relacionados a resposta a estresses bióticos (Pieterse *et al*, 2012).

O ensaio de qRT-PCR foi utilizado para determinar se o gene *PR-1* que codifica uma proteína PR é diferentemente expresso em células de protoplasto de soja super-expressando GmbZIPE2. O resultado é que PR-1 é induzido nessas células. O resultado obtido sugere que a super-expressão de GmbZIPE2 ativa uma das principais vias de defesa da planta contra patógenos, a via do SA.



**Figura 13: Análise da expressão do gene *PR-1* em protoplastos de soja super-expressando GmbZIPE2.** O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , utilizando como controle endógeno o gene da Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 6 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão). As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do tratamento controle ao nível de 5% de significância pelo Teste t de Student.

## 5.8 - Análise da expressão do gene ANK1 em soja

Estudos já demonstraram que a proteína ANK1, uma proteína semelhante a NPR1, interage com um bZIP chamado BZI-1 (Figura 4B). A caracterização molecular e funcional de ANK1 mostra que esta proteína não tem a capacidade de se ligar ao DNA nem de modular a transcrição do gene *BZII* (Kuhlmann *et al*, 2003). Além disso, ANK1 localiza-se preferencialmente no citosol, e sua transcrição é regulada negativamente sob ataque de patógenos. ANK1 também está envolvida na modulação da sinalização de auxina e defesa contra agentes patogênicos de um modo que é dependente da sua interação com BZI1 (Kuhlmann *et al*, 2003; Alves *et al*, 2013a).

Ensaio de qRT-PCR foi utilizado para determinar se o gene *ANK1* é diferentemente expresso em células de protoplasto de soja super-expressando GmbZIPE2, e se *ANK1* é diferentemente expresso em plantas de soja resistentes e susceptíveis ao fungo *P. pachyrhizi*.

Os resultados demonstram que ANK1 é reprimida em células de protoplasto de soja super-expressando GmbZIPE2 (Figura 14A), além disso, *ANK1* foi reprimida no início da infecção, tanto em plantas de soja resistentes quanto nas susceptíveis ao fungo *P. pachyrhizi* (Figura 14B).

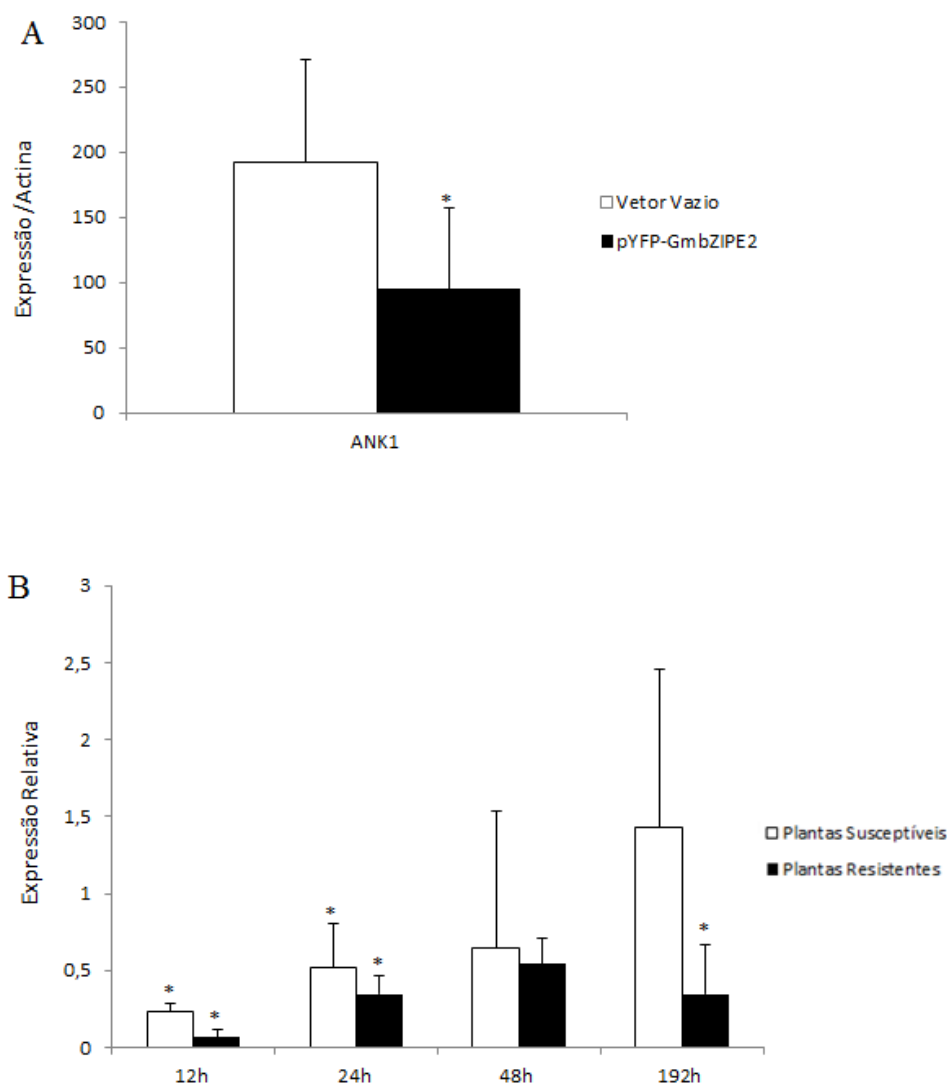
A expressão de ANK1 foi diminuída em células super-expressando GmbZIPE2, presumi-se que as duas proteínas estão relacionadas em algum processo. As hipóteses de como essa relação entre GmbZIPE2 e ANK1 acontece estão propostas abaixo.

GmbZIPE2 pode ter a capacidade de se ligar ao promotor do gene *ANK1* e modular sua transcrição, ou pode existir uma interação física entre GmbZIPE2 e ANK1 e ainda, GmbZIPE2 pode atuar como um regulador da interação ANK1/BZI1. A primeira hipótese seria a menos provável, já que o promotor do gene *ANK1* não possui o cis-elemento H-box, sendo então pouco provável que GmbZIPE2 regule diretamente a sua transcrição. A hipótese da interação é provável levando em consideração que uma interação bZIP/ANK1 já foi descrita. O fator de transcrição BZI1 interage com ANK1 em plantas, até que a interação da planta com um patógeno leva a dissociação do complexo BZI1/ANK1, um evento que permite a entrada de BZI1 para o núcleo, favorecendo a regulação da transcrição de genes relacionados com morte celular (Kuhlmann *et al*, 2003). A proteína BZI1 é um bZIP de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Em soja, uma interação com ANK1 resultando na regulação da transcrição de genes

relacionados com morte celular, ou um processo similar, pode ser realizado por *bZiPE2*. Para a determinação da existência da interação entre *GmbZiPE2* e *ANK1* é necessário a realização de outros experimentos. A hipótese mais provável é que *GmbZiPE2* pode também estar desempenhando um papel regulador, já que na interação de *ANK1* com *BZI1*, a atividade de *BZI1* é regulada negativamente. *GmbZiPE2* reprimiria a expressão de *ANK1*, para que mais proteínas *BZI1* de soja fiquem livres para chegar ao núcleo e desempenhar sua função, que é a indução de genes relacionados com a morte celular.

*ANK1* foi reprimida no início da infecção, tanto em plantas de soja resistentes quanto nas susceptíveis ao fungo *P. pachyrhizi*. A interação *ANK1*/*BZI1* impediria com que *BZI1* desempenhe seu papel no núcleo que é induzir genes de morte celular. Então, como *ANK1* é reprimida na situação de infecção, uma maior quantidade de *BZI1* é capaz de induzir genes de morte celular, e conseqüentemente de HR, formando então uma resposta amplificada contra o fungo.

Além disso, plantas susceptíveis tem uma expressão maior de *ANK1* comparada a expressão em plantas resistentes. Como plantas resistentes a *P. pachyrhizi* tem maior expressão de *GmbZiPE2* e menor de *ANK1*, e plantas susceptíveis tem menor expressão de *GmbZiPE2* e maior de *ANK1*, a hipótese se que o *GmbZiPE2* é um regulador negativo da interação *ANK1*/*BZI1* se torna ainda mais interessante. Plantas resistentes ao fungo conseguiriam então ter uma reação amplificada de morte celular para barrar a infecção.

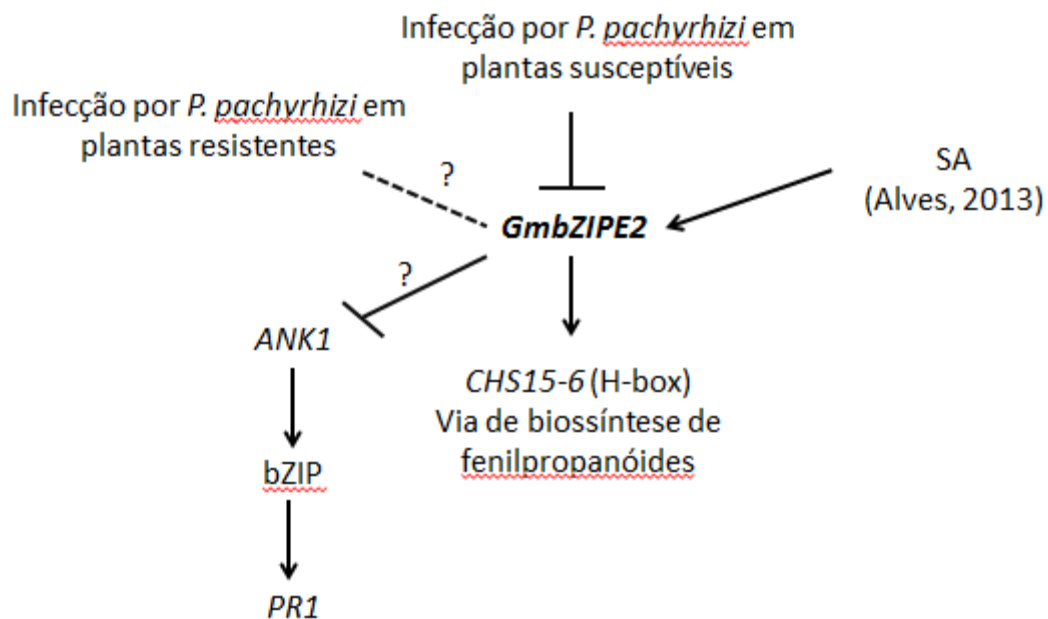


**Figura 14: Análise da expressão de ANK1 em soja.** **A.** Análise da expressão de ANK1 em protoplasto de soja super-expressando GmbZIPE2. O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta Ct}$ , utilizando como controle endógeno o gene da Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 6 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão). As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do tratamento controle ao nível de 5% de significância pelo Teste t de Student. **B.** Análise da expressão de ANK1 em plantas susceptíveis e resistentes (linhagens de soja EMBRAPA48 e PI561356, respectivamente) a *P.pachyrhizi*. O valor de expressão foi calculado usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando como controle endógeno o gene da Actina, e falsa inoculação (MOCK) como tratamento controle, para cada tempo de infecção. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um  $n = 3$  réplicas biológicas). As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do tratamento controle ao nível de 5% de significância pelo Teste t.

## 6 - CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho indicam uma relação do fator de transcrição GmbZIPE2 na defesa da planta contra o ataque de patógenos. A concentração do fator de transcrição GmbZIPE2 é menor em extratos protéicos de soja susceptível a *P. pachyrhizi* comparado a extratos de soja resistente. O tempo de 12 horas após a inoculação (tempo para penetração do fungo *P. pachyrhizi* em células epidermais da folha) tem uma concentração mais baixa comparada a outros tempos de infecção, mostrando um possível mecanismo de repressão da expressão da proteína pelo fungo durante o curso da infecção. O fator de transcrição GmbZIPE2 é capaz de se ligar ao cis-elemento H-box, já tido como responsivo a patógenos. A super-expressão de *GmbZIPE2* induz o gene *CHS15-6* que codifica a enzima chalcona sintase, enzima chave da via de biossíntese de fenilpropanóides, umas das principais vias de defesa da planta. A super-expressão de *GmbZIPE2* também induz *PR-1*, um gene que codifica uma proteína PR que está diretamente envolvida em uma via de defesa importante da planta, a via do SA. A super-expressão de *GmbZIPE2* reprime *ANK1*, indicando um possível papel regulador do *GmbZIPE2* na interação ANK1/BZI-1. Em plantas de soja resistentes e susceptíveis ao fungo *P. pachyrhizi*, *ANK1* foi reprimida no início da infecção, resultado condizente com a necessidade da planta de ativar mecanismos de defesa para tentar barrar a infecção pelo fungo, como o mecanismo de morte celular controlado negativamente pela ANK1.

Os resultados desse trabalho demonstram um papel do GmbZIPE2 na defesa da planta, porém mais estudos são necessários para a elucidação do mecanismo utilizado por esse bZIP. Mais dados sobre GmbZIPE2 aumentará o conhecimento acerca da resposta da planta a estresse biótico e poderá ser útil para a obtenção de novos alvos para a modificação genética de cultivares, visando melhorias na produtividade de culturas agrícolas.



**Figura 15: Esquema representativo da conclusão do trabalho.** Setas representam indução; linha tracejada representa possível indução; linha cortada representa inibição; interrogações representam passos ainda não confirmados.

## 7 - REFERÊNCIAS

Abe, I., Morita, H. 2010. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*, 27, 809–838.

Alves, M.S. 2013. Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja. Tese (Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG.

Alves, M.S.; Dadalto, S.P.; Gonçalves, A.B.; De Souza, G.B.; Barros, V.A.; Fietto, L.G. 2013. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *Int J. Mol. Sci.* 14,7814-7828.

Boller T. and He, S. Y. 2009. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogen. *Science*. 8; 324(5928): 742–744.

Buscaill, P., Rivas, S. 2014. Transcriptional control of plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 20:35–46.

Canonne, J.; Marino, D.; Jauneau, A.; Pouzet, C.; Brière, 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.

Dodds, P. N. and Rathjen, J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*. 11, 539-548.

Droöge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W. P., Halkier, B. A., Loake, G. J., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. 1997. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The EMBO Journal*, v.16, n.4, p.726-738.

Du, H., Zhang, L.L., Tang, Z., Yang, W., Wu, Y., Huang, Y., Tang, Y. 2009. Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. Russian in Biokhimiya, Vol. 74, No. 1, pp. 5-16.

Kombrink, E., Somssich, I.E. 1997. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. The Mycota, 5, 107–128.

Ecker, J.R. and Davis, R.W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene (stress responses/plant hormone/wounding/RNA blot analysis). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 5202-5206.

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

Hahlbrock, K and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. 40:347-69.

Hartman, G.L., Miles, M.R., Frederick, R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. Plant Dis 89:664–666.

Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A., Dröge-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*. Mol Genet Genomics, 267: 16–26.

Jackoby, M., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Parcy, T.K.F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. Trends in Plant Science Vol 7, N 03.

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., 3rd, Merkle, T., Schäfer, E., Harter, K., Dangl, J.L. 2006. bZIP10-LSD1 antagonism

modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO J.* 25, 4400–4411.

Kurdrid, P., Phuengcharoen, P., Yutthanasirikul, R., Roytrakul, S., Paemanee, A., Cheevadhanarak, S., Hongsthong, A. 2012. Identification of regulatory regions and regulatory protein complexes of the *Spirulina desD* gene under temperature stress conditions: Role of thioredoxin as an inactivator of a transcriptional repressor GntR under low-temperature stress. *Biochem. Cell Biol.* 90: 621–635.

Kuhlmann, M.; Horvay, K.; Stathmann, A.; Heinekamp, T.; Fischer, U.; Böttner, S.; Dröge-Laser, W. 2003. The alpha-helical D1 domain of the bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1, and is essential for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *J. Biol. Chem.* 278, 8786–8794.

Lai, Z., Li, Y., Wang, F., Cheng, Y., Fan, B., Yu, J.Q., and Chen, Z. 2011. Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *Plant Cell.* 23, 3824–3841.

Latchman, D. S. 2003. Eucaryotic transcription factors, edn4. San Diego: Academic Press.

Liao, Y., Zou, H., Wei, W., Hao, Y., Tian, A., Huang, J., Liu, Y., Zhang, J., Chen, S. 2008. Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta.* 228:225-240

Liu, J.X., Srivastana, R., Che, P., Howell, S.H. 2007. An endoplasmic reticulum stress responses in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell* 19, 4111-4119

Liu L., White, M. J., Macrae, T. H. 2001. Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, v.262, i.2, p.247–257.

- Loake, G. J., Faktor, O., Lamb, C. J., Dixon, R. A. 1992. Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, pp. 9230-9234.
- Lois, R.; Dietrich, A.; Hahlbrock, K.; Schulz, W. 1989. A phenylalanine regulatory ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light-responsive cis-acting elements. *EMBO J.* 8, 1641–1648
- Martin, C.R. 1993. Structure, function and regulation of the chalcone synthase. *Int. Rev. Cytol.* 147, 233–284.
- Memelink, J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry.* 70, 1560-1570.
- Meng X and Zhang, S. 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol*, 51, pp. 245–266.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., Wasternack, C. 2006. The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiology*, Vol. 140, pp. 249–262
- Noel, J. P., Austin, M. B., Bomati, E.K. 2005. Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:249–253.
- Ohl, S., Hedrick, S.A., Chory, J. and Lamb, C.J. 1990. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2, 837–848.
- Okada, A.; Okada, K.; Miyamoto, K.; Koga, J.; Shibuya, N.; Nojiri, H.; Yamane, H. 2009. OsTGAP1, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice. *J. Biol. Chem.* 284, 26510–26518.

Pieterse, C.M.J.; van der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; van Wees, S.C.M. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521.

Resende, M.L.V.; Salgado, S.M.L.; Chaves, Z.M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatol. Bras.* 28, 123–130.

Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P., Smeekeens, S. 1998. Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* 15, 253-263.

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

Schütze, K., Harter, K., Chaban, C. 2008. Post-translational regulation of plant bZIP factors. *TRENDS in Plant Science* Vol 13, N 05.

Singh, K. B., Foley, R. C., Oñate-sánchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Plant Biology*, 5:430, p.430-436 .

Soares, Z.G. 2010. Desenvolvimento de ferramentas para elaboração de um banco de dados e análise da expressão de fatores de transcrição de soja (*Glycine max*) responsivos à ferrugem asiática. 48p. Dissertação (Biotecnologia)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

Spoel, S. H. and Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol*, 12(2):89-100.

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

Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Körbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J. 2013. Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCOII-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59CWOA. *The Plant Cell*, Vol. 25: 744–761.

Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.; 55: 85-9.

Vittal, R., Paul, C., Hill, C.B., Hartman, G.L. 2014. Characterization and Quantification of Fungal Colonization of *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean Genotypes. *Phytopathology*.;104(1):86-94.

Wang, Z., Libault, M., Joshi, T., Valliyodan, B., Nguyen, H. T., XU, D., Stacey, G., Cheng, J. 2010. SoyDB: a knowledge database of soybean transcription factors. *Plant Biology*, 10:14.

Xu, P.; Narasimhan, M.L.; Samson, T.; Coca, M.A.; Huh, G.; Zhou, J.; Martin, G.B.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. 1998. A Nitrilase-Like Protein Interacts with GCC Box DNA-Binding Proteins Involved in Ethylene and Defense Responses *Plant Physiol.* 118: 867–874

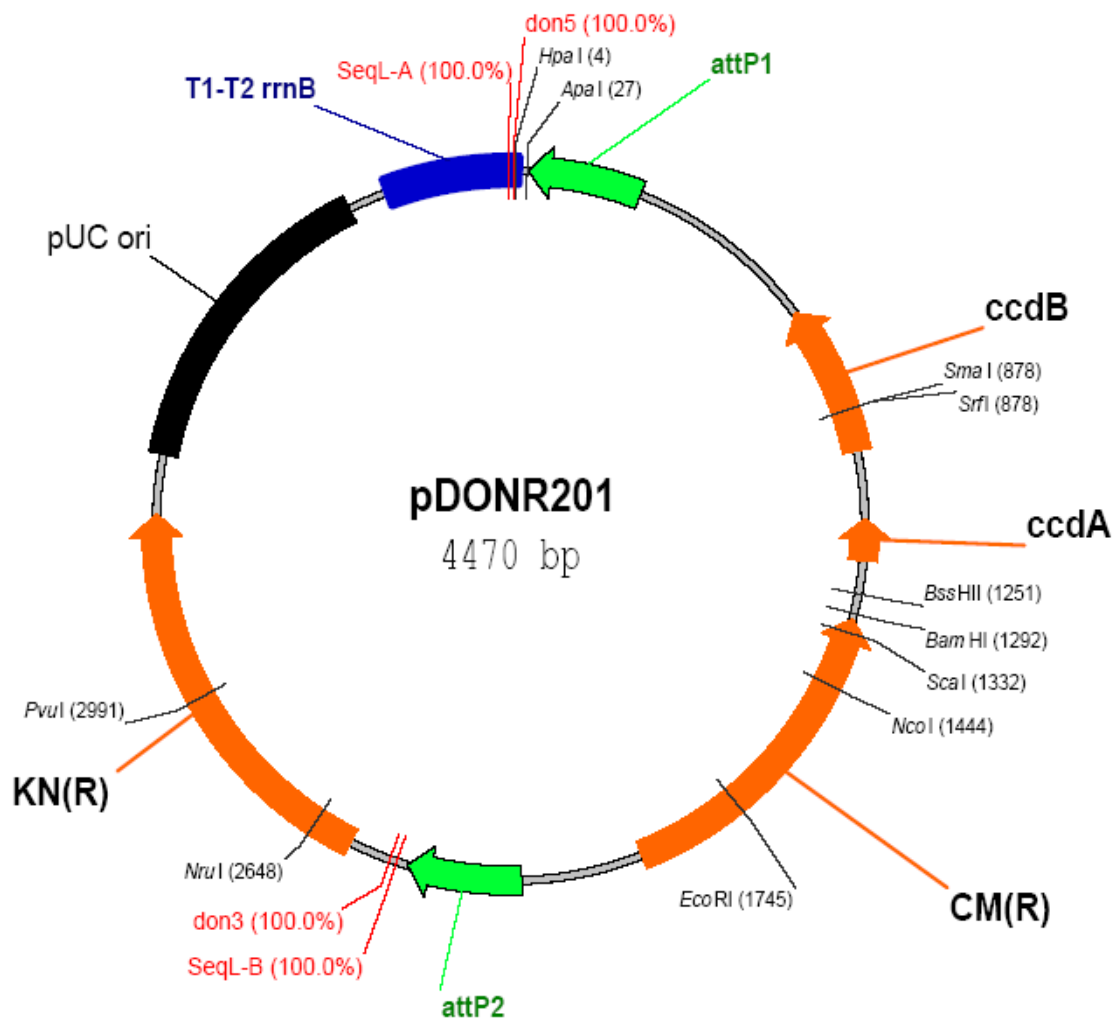
Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yokoyama, S. 2013. DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends in Plant Science*, Vol. 18, No.5

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

Zhang, Y., Zhang G., Dong Y., Guo J., Huang L., Kang Z. 2009. Cloning and Characterization of a MBF1 Transcriptional Coactivator Factor in Wheat Induced by Stripe Rust Pathogen. *ACTA Agronomica Sinica*, v.35:1, p.11-17.

## 8. ANEXO

### 8.1 - pDONR201 (Invitrogen)



## 8.2 - pDEST17 (Invitrogen)

