

MURILO SIQUEIRA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE FATORES DE
TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICO E
ABIÓTICO EM SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

A474c
2013

Alves, Murilo Siqueira, 1985-

Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja / Murilo Siqueira Alves. – Viçosa, MG, 2013.

x, 136f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Biologia molecular. 2. Plantas - Efeito do stress. 3. Regulação da expressão gênica. 4. Soja. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 572.8

MURILO SIQUEIRA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE FATORES DE
TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICO E
ABIÓTICO EM SOJA**

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

APROVADA: 2 de setembro de 2013.

Gustavo Costa Bressan

Ieso de Miranda Castro

Luis Cláudio Vieira da Cunha

Claudine Márcia Carvalho
(Coorientadora)

Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

Ao meu amado pai Odilon Soares Alves, luz e exemplo para minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente e acima de tudo a Deus, por todas as bênçãos oferecidas durante o caminho que percorri em minha vida.

À minha querida mãe Sônia, que não só se fez mãe, mas também pai, por todo o carinho, força, dedicação, lições e amor que fizeram de mim o que sou hoje.

Às minhas amadas irmãs, Ju e Lol, que além de serem as melhores irmãs do mundo, só por existirem já me fazem um irmão feliz. Amo vocês!

Às minhas sobrinhas e anjinhos queridos, Maria Eduarda, Ana Júlia e Antonella, fonte de alegria e de saudade que sempre me motivavam e me traziam de volta para casa.

Ao meu cunhado Antônio, pela força, pelo exemplo de pai e pelas dicas preciosas de downloads que me ajudaram nos momentos de descontração.

Aos meus avós, Juju e Anselmo, pelo meu pai, e por terem me dado à felicidade de ter o prazer da sua convivência. Esta vitória também é por vocês!

Aos meus queridos padrinhos, tio Zezé e tia Sandra, por sempre me apoiarem, e mesmo na distância serem os melhores padrinhos que um afilhado poderia merecer.

Aos meus tios, primos, e parentes da minha querida família, que sempre me incentivaram e me deram força para seguir com os meus estudos!

Aos meus grandes e eternos amigos Pedro e Saulo, que seja na distância ou na proximidade, sempre me apoiaram, incentivaram, escutaram, e foram as melhores companhias dentro e fora da universidade.

À minha namorada, Cátia, por ter sido uma verdadeira companheira em muitos momentos, simples ou complicados, durante o doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas valiosas oportunidades de ensino, pesquisa e “extensão” oferecidas durante minha vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), em especial Juliana Ramos, Gustavo Bressan, João Paulo, Juliana Fietto e Humberto Ramos, e aos funcionários do DBB pela boa convivência e ensinamentos.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, pela excelente orientação, pela confiança no meu trabalho, pelas oportunidades oferecidas durante minha graduação e pós-graduação, pelas ajudas valiosas durante a realização dos experimentos, e principalmente por se mostrar mais que um orientador, mas também um verdadeiro amigo.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes (DBB), pelas oportunidades oferecidas e pela co-orientação do meu trabalho.

Aos amigos de longa data e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP), Pedro, João Paulo, Jerusa, Pato, Giselle, Cris, Lucas, Wellington, Humberto, Maiana, Fábria, Kênia, Elisa, Danizinha, Fabiana, Fahime, Kelly, Paola, Lucas Bueno, Guilherme, Darlene, e muitos mais, pela agradável convivência e ótimo ambiente de trabalho que tive durante o tempo que trabalhei com vocês, além das ajudas valiosas nos experimentos. Não teria aprendido nada se não fosse por vocês!

Aos amigos mais brocas do mundo e colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM), Tevez, Silvana, Raphael, Mary, Ananda, Amanda, Vanessa, Gilza, Mônica, Dani Mendes, Edgard, Glauco, Gabi, Luiza, Fernanda, Dani Arruda, Ancély, Marina, Héllida, Priscila, Mariana, Zamira, Patrícia, e muitos outros brocas, por fazerem do LBM o melhor laboratório para se trabalhar ou falar bobagens ou praticar bullying! O doutorado se tornou ainda mais prazeroso e menos longo ao lado de vocês!

Aos amigos da eterna República Gentileza, Baiano, Vítor, Mauro, Ernane, Cleuber, Kaique, Vinícios, Samuel, Johari, e visitantes ilústres, como os grandes Gustavo, Carioca, Leite entre outros, pela convivência “harmoniosa”, pela amizade, pela companhia memorável nas inúmeras festas de Viçosa (em especial Baiano, Mauro, Vítor, Kaique e Gustavo) e pelos momentos de felicidade compartilhados ao longo de todos estes anos de UFV.

A todos que de alguma forma contribuíram para meu engrandecimento profissional e pessoal. A todos que eu não possa não ter citado, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA <i>EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15</i> COMO UM NOVO FATOR DE TRANSCRIÇÃO QUE INTEGRA VIAS DE SINALIZAÇÃO DE RESPOSTA A ESTRESSES EM SOJA.....	
1. Revisão de Literatura.....	2
2. Material e Métodos.....	8
2.1- Construções repórteres do promotor de GmNRP-B	8
2.2- Clonagem de GmERD15, AtERD15, AT4G14270 e quimeras dos respectivos genes em vetores de expressão.....	8
2.3- Ensaio de mono-híbrido e de transativação em leveduras.....	13
2.4- Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA).....	13
2.5 - Células de soja em suspensão e tratamentos, e expressão em tecidos de soja.....	14
2.6- Extração de RNA e síntese de cDNA.....	15
2.7 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	15
2.8 - Expressão transiente em protoplastos de soja.....	16
2.9- Transformação transiente de plantas de tabaco e localização subcelular	17
2.10-Expressão de proteínas His ₆ -tagged e purificação	18
2.11- Análises por imunoblotting.....	18
2.12- Ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP).....	19
2.13-Clonagem de fragmentos amplificados do ChIP, seqüenciamento e análises de bioinformática.....	19
2.14-Ensaio de medida de atividade da enzima β -glucuronidase (GUS).....	20
2.15-Análises <i>in silico</i> de seqüências de ERD15.....	20
2.16- Microscopia de Força Atômica.....	20
2.17-Técnicas de Biologia Molecular.....	20

3. Resultados e Discussão.....	22
3.1-Um homólogo de ERD15 de soja é induzido por tunicamicina e PEG	22
3.2-GmERD15 liga-se especificamente ao promotor de NRP-B in vitro e que exibe atividade de transativação em leveduras.....	26
3.3- GmERD15 é expresso constitutivamente em raiz e apresenta localização nuclear confirmada em células epidermais de folhas de tabaco, ligando-se e ativando o promotor de GmNRP-B in vivo	35
3.4- GmERD15 liga-se especificamente a uma sequência palindrômica de 12 bp no promotor de GmNRP-B.	46
3.5- Duas proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i> apresentam similaridade de sequencia com GmERD15.....	53
3.6- O motivo ssDNA-binding transcriptional regulator de GmERD15 é um possível domínio de transativação funcional em GmERD15	59
3.7- GmERD15 liga-se a outras regiões no genoma da soja	63
4- Conclusão	70
5- Referências bibliográficas.....	73
CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO <i>GmbZIP62</i> , <i>GmbZIP105</i> , <i>GmbZIPE1</i> e <i>GmbZIPE2</i> RESPONSIVOS À INFECÇÃO POR <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , AGENTE CAUSADOR DA FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA	
1. Revisão de literatura.....	81
2–Material e métodos.....	85
2.1 - Análise filogenética da família de proteínas bZIPs de soja	85
2.2 - Clonagem dos genes <i>GmbZIP62</i> , <i>GmbZIP105</i> , <i>GmbZIPE1</i> e <i>GmbZIPE2</i> em vetores de expressão	86
2.3- Ensaio de transativação e dimerização	89
2.4– Perfil de expressão dos genes bZIPs em tecidos de soja e em resposta a fitohormônios	89
2.5 - Experimentos de infecção	90
2.6 - Extração de RNA e síntese de cDNA para qRT-PCR	90

2.7 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR) e análises estatísticas.....	91
2.8 - Transformação transiente de plantas de tabaco e localização subcelular	94
3. Resultados	95
3.1. Análise filogenética das proteínas bZIPs de soja e seleção das proteínas GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 para estudos funcionais.	95
3.2. Localização subcelular das proteínas bZIPs de soja.....	99
3.3. Atividade de transativação dos fatores GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2.....	101
3.4. Análise de dimerização entre as proteínas GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2.....	104
3.5. Perfil transcricional dos genes <i>bZIPs</i> em tecidos de soja	107
3.6. Indução de genes <i>bZIPs</i> por fitohormônios.....	109
3.7. Perfil de expressão dos genes <i>bZIPs</i> em plantas de soja suscetíveis e resistentes durante o curso da infecção pelo fungo <i>P. pachyrhizi</i>	112
4. Discussão.....	116
5. Conclusão.....	125
6. Referências	127

RESUMO

ALVES, Murilo Siqueira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2013. **Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Claudine Márcia Carvalho e Juliana Lopes Rangel Fietto.

As respostas a estresses ambientais em plantas culminam em uma drástica reprogramação da expressão gênica favorecendo respostas moleculares a estresses em detrimento das funções celulares normais. Fatores de transcrição são reguladores fundamentais da expressão gênica a nível transcricional, e o controle de suas atividade altera o transcriptoma da planta, determinando mudanças metabólicas e fenotípicas em resposta ao estresse. Análises funcionais de fatores de transcrição são, portanto, muito importantes para a elucidação do papel destes reguladores transcricionais em diferentes cascatas de sinalização. Neste estudo, nós descrevemos a caracterização funcional de fatores de transcrição nas respostas moleculares durante estresses ambientais, tais como estresses no retículo e estresse osmótico, e durante ataque de patógenos. No primeiro capítulo, nós descrevemos um novo fator de transcrição, GmERD15 (*Glycine max* Early Responsive to Dehydration 15), o qual é induzido por estresse no retículo e osmótico para ativar a expressão de genes *NRP* (Asparagine-rich protein). No segundo capítulo, descrevemos a identificação de quatro fatores bZIP de soja, *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2*, responsivos à infecção por *Phakopsora pachyrhizi*, agente causador da ferrugem asiática. O conhecimento das funções destes fatores de transcrição em cascatas de sinalização de respostas a estresses é crucial para a manipulação da tolerância a estresses em cultivares de importância agrônômica, e conseqüentemente determinará o desenvolvimento de variedades de cultivares geneticamente manipulada com melhorada tolerância a estresses.

ABSTRACT

ALVES, Murilo Siqueira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2013. **Biochemical and functional characterization of transcription factors involved in response to biotic and abiotic stresses in soybean.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Claudine Márcia Carvalho and Juliana Lopes Rangel Fietto.

Responses to environmental stress in plants lead to a dramatic reprogramming of gene expression favoring stress responses at the expense of normal cellular functions. Transcription factors are master regulators of gene expression at the transcriptional level and control the activity of these factors alters the transcriptome of the plant, which leads to metabolic and phenotypic changes in response to stress. Functional analysis of transcription factors is very important to elucidate the role of these transcriptional regulators in different signaling cascades. In this study, we describe the functional characterization of important transcription factors in the molecular responses during environmental stresses, such as reticulum and osmotic stress, and during pathogen attack. Here, in the first chapter, we describe a novel transcription factor, GmERD15 (*Glycine max* Early Responsive to Dehydration 15), which is induced by ER stress and osmotic stress to activate the expression of *NRP* (Asparagine-rich protein) genes. In the second chapter, we describe the identification of four bZIP genes in soybean, *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2*, responsive to *Phakopsora pachyrhizi*, the Asian Soybean Rust causing agent. The understanding of these transcription factors functions in these response signaling cascades is crucial to the management of stress tolerance in crops, and will eventually lead to the development of genetically manipulated crop varieties with improved stress tolerance.

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15* COMO UM NOVO FATOR DE TRANSCRIÇÃO QUE INTEGRA VIAS DE SINALIZAÇÃO DE RESPOSTA A ESTRESSES EM SOJA

1. Revisão de Literatura

O retículo endoplasmático é uma organela chave na síntese de proteínas da via secretória, contendo uma maquinaria específica para a produção e encaminhamento destas proteínas para diversas organelas e compartimentos celulares. O rompimento do equilíbrio entre a atividade secretora da célula e da capacidade de transformação e de dobramento no retículo promove uma condição de estresse nesta organela. Esta condição de estresse gera um acúmulo de proteínas não dobradas ou desenoveladas que desencadeia a ativação de uma via de sinalização denominada UPR (Unfolded Protein Response) (Chawla e Niwa, 2005).

Em leveduras, este processo resulta no aumento da expressão de mais de 300 genes onde principalmente compreendem chaperones residentes do RE (como BiP, calreticulinas e calnexinas), reguladores do metabolismo de fosfolipídios e proteínas envolvidas na degradação de proteínas mal-enoveladas. O único sensor da via conhecido é IRE1, uma proteína quinase/endoribonuclease receptora transmembrana. IRE 1 reconhece a necessidade de enovelamento no RE através de seu domínio luminal (Chawla e Niwa, 2005). Prioritária para a ativação da via UPR, IRE1 é mantida em uma conformação monomérica através da ligação com BiP em seu domínio luminal durante condições normais do RE. Níveis crescentes de proteínas mal-enoveladas causam dissociação de BiP, determinando a oligomerização de IRE1 e ativação de sua atividade cinase. A proteína ativada então possui a função 5' de endoribonuclease, responsável pela clivagem de um íntron único do mRNA de HAC1 (o mRNA de XBP1 em mamíferos). A proteína codificada por este mRNA que sofreu clivagem codifica então um potente fator transcricional específico para a ativação de genes importantes da via UPR (Chawla e Niwa, 2005).

Além de IRE1, em mamíferos ocorrem mais duas proteínas sensores para a via UPR, a quinase transmembrana PERK e o fator de transcrição transmembrana ATF6, ambos residentes no RE. Ambas as proteínas são ativadas de forma similar a IRE1 devido a dissociação de BiP ligada a seus domínios luminais do RE. No caso de PERK, a sua ativação promove a

fosforilação de seu substrato, o fator de iniciação da tradução eIF2, e no caso de ATF6, a liberação de BiP promove a translocação de ATF6 para o Golgi onde um novo fator de transcrição é liberado da membrana por proteólise e translocado para o núcleo (Chawla e Niwa 2005).

Componentes da via UPR em plantas incluem homólogos de Ire1p e os fatores de transcrição AtbZIP28 e AtbZIP60. Após a ativação, estes receptores agem em conjunto para atenuar transitoriamente a síntese protéica, ativar a capacidade de dobramento do retículo e a degradação de proteínas mal formadas (Chawla e Niwa 2005).

O retículo endoplasmático também tem sido alvo de estudos nestes últimos anos também devido a sua capacidade de acomodar vias alternativas e adaptativas (Liu e Howell, 2010). Por exemplo, a comunicação cruzada entre a via de sinalização de bZIP60 ou bZIP28, os dois fatores de transcrição chave para a ativação da via de resposta a proteínas mal-dobradas do retículo endoplasmático (UPR) em plantas, e vias de sinalização em resposta a estresse por calor, salinidade ou patógenos também foram identificadas. Mutantes defectivos em AtbZIP28 apresentaram um fenótipo de sensibilidade a altas temperaturas. (Gao et al., 2008). Este resultado sugere que AtbZIP28 contribui para a tolerância ao calor. Em plantas, as respostas a estresse térmico são controladas por fatores de transcrição clássicos que são conservados entre todos os eucariotos. Além destes fatores de transcrição, AtbZIP28 é também regulado positivamente sob condições de estresse térmico, e seu domínio de fator transcricional é liberado por um sistema RIP like da membrana do retículo endoplasmático em resposta ao calor. Como resultado, expressões de genes, tal como BiP2, que é ativado pelo domínio bZIP de AtbZIP28 são regulados positivamente sob condições de estresse térmico (Gao et al., 2008).

Lee *et al.*, (2006) também mostraram que a superexpressão de CabZIP1 em *Arabidopsis thaliana* confere resistência a estresses abióticos como salinidade, seca e estresse osmótico. Além disto, plantas de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam AtbZIP60 são também mais tolerantes a estresse salino (Fujita et al.,2007). Estes achados sugerem que a UPR desempenha um

papel importante numa maior tolerância a estresse salino em plantas. Liu et al.,(2007a) descreve um candidato para esta nova via de comunicação cruzada, mostrando que o fator de transcrição AtbZIP17 reside no retículo e é processado por S1P sob alto estresse salino, liberando o fator de transcrição ativo da mesma maneira como ocorre com AtbZIP28. Entretanto, a forma ativa de AtbZIP17 regula a transcrição de genes relacionados a estresse salino, tais como ATHB-7. Interessantemente, AtbZIP28 não é processado sob estresse salino (Liu et al.,2007b). Estes dados confirmam uma íntima relação entre o estresse no Retículo e ativação de diferentes vias de sinalização.

Com relação a estresses bióticos, evidências recentes (Tateda et al.,2008) mostraram que plantas de *N. benthamiana* silenciadas para a expressão de NbbZIP60, foram mais suscetíveis a infecção com *Pseudomonas cichorii*. Além disso, foi mostrado também por este mesmo grupo que espermina, uma poliamina envolvida na resposta hipersensível (HR) em tabaco (Takahashi et al.,2004), produziu um aumento nos níveis de mRNA de NbbZIP60. Lee et al.,(2006) mostrou que o fator de transcrição bZIP de pimenta denominado CabZIP1 foi induzido durante o ataque de *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* ou *Pseudomonas fluorescens*. Interessantemente, CabZIP1 compartilha um alto grau de homologia com AtbZIP60, apesar de não ter sido comprovada sua provável ativação da expressão durante estresse no retículo.

Uma interessante via de sinalização em plantas é a via que integra as respostas do estresse no retículo ao estresse osmótico e é mediada por proteínas ricas em asparagina que transmite um sinal de morte celular (Costa et al,2008). Esta via integrativa foi identificada por estudos de perfil transcricional, que revelaram a existência de uma pequena sobreposição do transcriptoma durante estresses no retículo e osmótico induzidos em plântulas de soja (Irsigler et al., 2007).

No trabalho de Irsigler e colaboradores (2007) foi identificado um conjunto de 10 genes em soja que possuíam sua expressão aumentada pelos dois tipos de estresses. Neste grupo estavam contidos dois genes que codificavam proteínas ricas em asparagina (NRP) que continham um domínio

C-terminal de desenvolvimento e morte celular (DCD). Uma análise posterior realizada por qRT-PCR demonstrou a expressão sinérgica destes genes quando tratados com PEG, um indutor de estresse osmótico, e AZC, um indutor de estresse no retículo (Irsigler et al., 2007). Estudos posteriores mostraram que estes genes respondiam a um novo ramo de sinalização que integra as respostas aos estresses no RE e osmótico (Costa et al., 2008).

Os genes que codificam N-rich proteins, estão associados com a resposta a patógenos e a morte celular programada em plantas (PCD) (Delessert et al., 2005; Tenhaken et al., 2005; Costa et al., 2008).

Visando identificar fatores reguladores da transcrição dos genes que codificam as N-Rich proteins em soja, foi realizado um ensaio de mono-híbrido em leveduras utilizando um fragmento de 1000 bp da região promotora do gene GmNRP-B (NP_001236375.1) como isca, onde foi identificada uma proteína que apresenta similaridade com a proteína ERD15 de Arabidopsis (AAM10198.1), a qual foi denominada GmERD15 (Alves 2010). O gene ERD15 foi primeiramente descrito em Arabidopsis (Kiyosue et al., 1994c), como sendo membro de um conjunto de genes induzidos precocemente por desidratação. Alguns dos genes ERD (ERD1 a 16) estão sendo estudados e os resultados têm demonstrado ser um grupo bastante heterogêneo. ERD1 codifica uma protease ATP-dependente do cloroplasto (Soitamo et al. 2008), ERD2 codifica uma HSP70 (Kiyosue et al. 1994a), ERD3 e 7 não possuem função conhecida, ERD4 codifica uma proteína de membrana, ERD5 e ERD6 codificam respectivamente uma proteína prolina desidrogenase mitocondrial e um transportador de carboidratos (Nakashima et al. 1998; Kiyosue et al. 1998). ERD8 codifica uma hsp81 (Kiyosue et al. 1994a), ERD9, 11 e 13 pertencem a família da glutathione-s-transferase (Kiyosue et al. 1993) , ERD10 e 14 pertencem a família das proteínas LEA (Kiyosue et al. 1994b), e ERD15 é classificada como uma proteína hidrofílica (Kiyosue et al. 1994c), que apresenta um domínio PAM2 de interação com proteínas de ligação a cauda poli A (PABP) (Kariola et al., 2006), sem uma função biológica conhecida, e ERD16 uma proteína de extensão de ubiquitinação (Kiyosue et al. 1994a).

ERD15 de *Arabidopsis* constitui uma proteína pequena, com aproximadamente 163 resíduos de aminoácidos, onde 49 resíduos são carregados, sendo uma proteína hidrofílica, ácida, e sem função ainda descrita (Kiyosue et al., 1994; Kariola et al., 2006). Posteriormente, foi verificado que ERD15 pertence a uma família de proteínas que possui um motivo PAM2 bem conservado, que permite a interação com a porção carboxi-terminal de proteínas ligantes a cauda poli(A) (PABP; Albrecht and Lengauer, 2004), interação esta que foi demonstrada em ensaios de duplo-híbrido de leveduras por Wang e Grumet (2004). Trabalhos mais recentes sobre ERD15 mostraram que a alteração da modulação da expressão desta proteína em *Arabidopsis* alterou a resposta da planta ao fito hormônio ABA (Kariola et al., 2006). Plantas superexpressando ERD15 mostraram uma menor sensibilidade a ABA, enquanto que plantas que possuíam ERD15 endógena silenciada por RNAi tiveram uma hipersensibilidade a este hormônio. A modulação da expressão de ERD15 mostrou que não apenas ERD15 afeta a tolerância a estresses abióticos, mediada por ABA, como também foi demonstrado que plantas de *Arabidopsis* superexpressando esta proteína, tiveram uma maior resistência ao patógeno *E. carotovora* (Kariola et al., 2006). Os autores concluíram primeiramente que ERD15 faz uma conexão das respostas a estresse abiótico com as respostas a estresse biótico, com base no aumento da resistência a patógenos em plantas superexpressando ERD15. Posteriormente demonstraram que ABA participa e interfere nas vias de resposta a outros hormônios, como SA e JA, com base em experimentos mostrando que mutantes de *Arabidopsis* deficientes de proteínas relacionadas ao metabolismo de ABA, *abi1-1* e *abi2-1*, apresentavam uma maior expressão de genes marcadores de resposta a patógeno, como PR1, assim como plantas que superexpressavam ERD15 (Kariola et al., 2006).

O gene GmERD15 foi isolado pela capacidade da proteína codificada por ele de associar de forma estável com o promotor de NRP-B em leveduras através do sistema do mono-híbrido (Alves, 2010). Foi constatado também que GmERD15 possui atividade de transativação em leveduras. Além disto, a análise da sequência de aminoácidos mostrou a presença de um motivo de

fator transcricional na porção carboxi-terminal, e a expressão transiente de *GmERD15* em protoplastos de soja levou a um aumento da expressão de *GmNRP-B*. Quimeras de *GmERD15* com a proteína YFP expressas transientemente em folhas de tabaco localizam-se no citosol e no núcleo. Coletivamente, estes resultados indicam que *GmERD15* atua no controle da expressão do gene *GmNRP-B* revelando uma nova família de transfatores, que atuam no controle da expressão de genes em plantas.

Como esta função ainda não foi descrita para esta família de proteínas, e dando continuidade ao trabalho inicial de identificação de *GmERD15*, este trabalho apresenta como objetivo principal a caracterização bioquímica e funcional da proteína *GmERD15* como um fator de transcrição que controla a expressão de genes relacionados a via integrativa de resposta aos estresses no retículo e osmótico em soja.

2. Material e Métodos

2.1- Construções repórteres do promotor de GmNRP-B:

Para construir uma fusão transcricional do promotor de GmNRP-B com o gene que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS), uma sequência de 1000 pares de bases (bp) da região promotora foi liberada de pUFV1457 (TOPO pCR4-PNRP-B1000bp) com EcoRI e Sall e clonada nos mesmos sítios do vetor pCAMBIA1381z para obtermos -1000pNRP-B::GUS, sendo a construção confirmada com oligonucleotídeos específicos explicitados na Tabela 1. Uma deleção interna no promotor de GmNRP-B foi obtida por liberação de um fragmento de 263bp por digestão por XbaI de -1000pNRP-B::GUS (Posições de corte em -666 e -403) e circularizando *in vitro* para gerar $\Delta(-666/-403)$ pNRP-B::GUS.

Da mesma forma, para construir uma fusão transcricional do promotor de GmNRP-B com o gene que codifica a enzima β -galactosidase (LACZ), uma sequência de 1000 pares de bases (bp) da região promotora foi liberada de pUFV1457 (TOPO pCR4-PNRP-B1000bp) com EcoRI e Sall e clonada nos mesmos sítios do vetor pLACzi para obtermos -1000pNRP-B::LACZ. Uma deleção interna no promotor de GmNRP-B foi obtida por liberação de um fragmento de 263bp por digestão por XbaI de -1000pNRP-B::LACZ (Posições de corte em -666 e -403) e circularizando *in vitro* para gerar $\Delta(-666/-403)$ pNRP-B::LACZ.

Um fragmento de 50bp do promotor de GmNRP-B (-550/-500) foi clonado com os sítios de EcoRI e Sall no vetor pLACzi para obtermos -50pNRP-B::LACZ.

2.2- Clonagem de GmERD15, AtERD15, AT4G14270 e quimeras dos respectivos genes em vetores de expressão

Para clonar a sequência completa do cDNA de GmERD15 em vetor de expressão de bactérias pDEST17, foi utilizado o clone pUFV1358.1 (pDONR201-GmERD15) e deste o cDNA foi transferido por recombinação para

o vetor pDEST17, resultando na construção pHis-GmERD15 (pUFV1380), para expressão em bactérias.

Para clonar a sequência completa do cDNA de AtERD15 e AT4G14270 em vetores de expressão de leveduras pDEST32 e pDEST22, estes foram amplificados com oligonucleotídeos específicos, mostrados na Tabela 1 (Fw AtERD15 e Rv AtERD15; Fw AT4G14270 e Rv AT4G14270), e os produtos resultantes verificados em gel de agarose 1%, purificados utilizando-se o kit GelExtraction Kit, da Qiagen, e inseridos por recombinação no vetor de entrada pDONR201, utilizando-se a enzima BP clonase (Invitrogen). Os clones obtidos, pDONR201-AtERD15 e pDONR201-AT4G14270, contêm códon de terminação e foram utilizados para transferência dos respectivos cDNAs para os vetores pDEST32 e pDEST22, por recombinação pela enzima LR clonase (Invitrogen), resultando nos clones pBD-AtERD15 (pDEST32-AtERD15), pAD-AtERD15 (pDEST22-AtERD15), pBD- AT4G14270 (pDEST32- AT4G14270), e pAD- AT4G14270 (pDEST22- AT4G14270).

Quimeras dos cDNAs de GmERD15 (QGmERD15) e ERD15 (QAtERD15) foram construídas pela empresa Genscript (<http://www.genscript.com/>) e clonadas no vetor pUC57 com as extremidades attb1 e attb2 para clonagem no vetor de entrada gateway pDONR201 (Invitrogen) por recombinação pela enzima BP clonase, gerando os clones pDONR201- QGmERD15 e pDONR201- QAtERD15. Estes clones foram utilizados para transferência dos respectivos cDNAs para o vetor pDEST22 e pDEST17, por recombinação pela enzima LR clonase (Invitrogen), resultando nos clones pAD- QGmERD15 (pDEST22- QGmERD15), pHis- QGmERD15 (pDEST17- QGmERD15), pAD- QAtERD15 (pDEST22- QAtERD15) e pHis- QAtERD15 (pDEST17- QAtERD15).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de genes e fragmentos de promotores em diferentes vetores.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-)	Vetor de Destino
Fw-GmERD 15 like	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAAGTCATTTCTGC	pDONR201
GmERD 15 likeSt-Rv	AGAAAGCTGGGTCCTACCTGGGCTGGTGAATAGC	pDONR201
Fw AT4G14270	AAAAAGCAGGCTATGACGGCGACGATAGATCG	pDONR201
Rv AT4G14270	AGAAAGCTGGGTTCCACCGTGGCTGATAGATAT	pDONR201
Fw AtERD15	AAAAAGCAGGCTATGGCGATGGTATCAGGAAG	pDONR201
Rv AtERD15	AGAAAGCTGGGTTCCAGCGAGGCTGGTGGATGT	pDONR201
Fw-PNRP-B1000	GAATTCTTAATTGTCTGGTTAATATC	pCR4
Fw-PNRP-B700	GAATTCTGCACACACTCACTGCCTCC	pCR4
PNRP-B-Sall-Rv	GTCGACGTAGCTTAGTGTTTT	pCR4

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

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-3')	Gene alvo
GmERD 15 like Fw	CCCTGGTTCCGCGACTACT	GmERD15 (AK245837)
GmERD 15 like Rv	GGTCAAAGTCGAAGTCGAAAGC	
NRP-B Fw	CAAGGCTGCTGGCGACAAGATA	NRP-B (ACU18902)
NRP-B Rv	CGTGGAGGCAGACCGAAGAG	
BiPD Fw	CTTGAAGAAGTTTCGTGGTAAACTA	BiPD (AAK21920)
BiPD Rv	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	
Helicase Fw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	RNA Helicase (AI736067)
Helicase Rv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	

2.3- Ensaio de mono-híbrido e de transativação em leveduras

As linhagens repórteres de leveduras foram construídas pela co-transformação da linhagem W303 (*MATa/MAT α leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi⁺]*) com as construções $\Delta(-666/-403)$ pNRP-B::LACZ ou 50pNRP-B::LACZ, juntamente com pUFV1425 (pDEST22-GmERD15) ou pAD-QGmERD15 ou pAD-QAtERD15, a 1 μ g cada, usando protocolo com acetato de lítio (Kim et al., 1997), resultando nas leveduras modificadas W303 $\Delta(-666/-403)$ pNRP-B::LACZ/AD-GmERD15, 50pNRP-B::LACZ/AD-GmERD15, 50pNRP-B::LACZ/AD-QGmERD15 e 50pNRP-B::LACZ/AD-QAtERD15. Da mesma forma, o clone pUFV1325, pHIS2.1-PNRP-B 1000bp e pLACzi-PNRP-B 1000 bp em W303 (W303 PNRP-B 1000/LACZ/HIS3) foi utilizado para co-transformação com pAD-ERD15 ou pAD-AT4G14270, resultando nas leveduras modificadas W303 PNRP-B 1000/LACZ/HIS3-AD-ERD15 e W303 PNRP-B 1000/LACZ/HIS3-AD-AT4G14270. As linhagens modificadas foram crescidas por 2 dias e utilizadas para medida da atividade de β -galactosidase, como descrito por Amberg et al (2005), ou por membrana de nylon, como descrito pelo manual do kit da Clontech.

Linhagens de levedura AH109 (*MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ*) transformadas com pUFV1379 (pDEST32-GmERD15) ou pBD-ERD15 ou pBD-AT4G14270, foram plaqueadas em meio SD (Synthetic dropout) na ausência de histidina, suplementado com 10mM de 3-aminotriazole, e permitidas crescerem por 3 dias a 28°C. As linhagens modificadas foram utilizadas para medida da atividade de β -galactosidase em membrana de nylon, como descrito pelo kit da Clontech.

2.4- Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)

Um fragmento de 187 bp da sequência 5' que flanqueia *GmNRP-B* foi amplificado de DNA genômico usando oligonucleotídeos específicos (gaattc-

TTATCTAGCATCAGTGCTTG e gtcgacCCAAAACGCGTACACGTGAA) e então biotilado usando kit de marcação de biotina na extremidade 3' OH (Pierce). Da mesma forma, fragmentos de 50 e 60 bp da mesma região foram marcados (-550/-500;-500/-450;-450/390; e -390/-330) bem como uma sequência de 12 bp (⁻⁵¹¹AGCATCAGTGCT⁻⁵⁰⁰) e de 25 bp (⁴²⁴ACGATTCTATCAGCTTCTAGAACGT⁻³⁹⁹), com o mesmo kit. Finalmente, um fragmento de 464 bp e 536bp da sequência 5' que flanqueiam um gene *GmCDC2* foram obtidos pela amplificação a partir de DNA genômico de um fragmento de 1000bp que flanqueia o mesmo gene usando os oligonucleotídeos específicos (gaattcGGAGGCCAGAAAACCCGTC e gtcgacCACATTTTTCATCTTTTCAT), com posterior clivagem deste fragmento com EcoRI, sendo que então estes fragmentos foram marcados com biotina na posição 3'OH pelo kit de marcação anteriormente citado.

Os ensaios de mudança de mobilidade eletroforética foram realizados usando o kit LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce), de acordo com os protocolos do fabricante. Cada reação de ligação de 20 µL continham 20mM de tampão HEPES pH 7,9, 100mM KCl, 5% (v/v) glicerol, 1mm MgCl₂, 1mM DTT, 0,1% (v/v) Tween 20, 25 ng/mL de poli-dI:dC, 20 fmol de sonda marcada com biotina, e 2µg de His-GmERD15. DNA da sonda não marcada com biotina foi utilizado como competidor específico, e 1µL de anticorpo anti-His-GmERD15 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-corrído por 1h a 100V em 0,5mM de Tris borato-EDTA (tampão TBE), e 5µL de tampão de carregamento foi adicionado a reação de ligação, onde então os 25µL 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/cm² por 1min, e visualizado por quimioluminescência em filmes de raio-x.

2.5 - Células de soja em suspensão e tratamentos, e expressão em tecidos de soja

Cultura de células de soja em suspensão anteriormente preparadas (Cascardo *et al.*, 2001) foram cultivadas em 40 mL de meio MS Soja (Finer & Nagasawa, 1988) mantendo-se o procedimento de subcultivos sucessivos semanais, repicando-se 10 mL de cada cultivo de células para um meio novo. Os tratamentos foram realizados em culturas de células cinco dias após repicagem.

As células foram tratadas com 5 µg/mL de tunicamicina ou 10% (p/v) de polietilenoglicol (PEG) 8000 por 30, 60, 90 e 120 minutos. O material vegetal foi coletado após os tratamentos e filtrado por vácuo, lavado com água destilada, e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado em freezer a -80 °C até o processamento das amostras.

A expressão do gene *GmERD15* foi analisada em diferentes tecidos de soja (*Glycine max*), variedade CAC-1, e em diferentes estádios de desenvolvimento, através da reação de polimerização em cadeia em tempo real (*Real-Time PCR*). O RNA foi extraído a partir de folha, caule e raiz, da planta na fase vegetativa, além de plântula intacta. Foram também utilizadas sementes, utilizando massa fresca segundo Lanna et al (2002) no primeiro estágio, correspondente à semente com até 75 mg, e semente madura, superior a 450 mg.

2.6- 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.

2.7 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

O procedimento de PCR em Tempo Real, bem como testes, validações e experimentos 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 RNA helicase de soja (Tabela 2), que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

2.8 - Expressão transiente em protoplastos de soja

Protoplastos foram preparados em ambiente estéril a partir de células de soja como descrito recentemente (Costa *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2009). Cinco dias após a repicagem, as células foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem (manitol 0,6 M; MES 20mM; pH 5,5), centrifugadas a 500 rpm por 2 minutos, ressuspensas em igual volume de solução enzimática [celulase 0,5% (p/v), macerozima R-10 0,5% (p/v), pectoliase Y23 0,1% (p/v), manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5] e incubadas por 3 horas sob agitação de 40 rpm. A digestão foi acompanhada a cada 30 minutos por microscopia. Em seguida, os protoplastos foram filtrados em peneira de 65 μ m e coletados por centrifugação a 500 rpm por 2 minutos, sendo lavados 2 vezes com tampão de lavagem. Os protoplastos foram então novamente coletados por centrifugação por 2 minutos a 500 rpm, ressuspensos em 2 mL de tampão de lavagem e transferidos para um outro tubo contendo tampão gradiente [sacarose 20% (p/v), manitol 0,6M, MES 20 mM, pH 5,5]. O material foi centrifugado por 5 minutos a 500 rpm, sendo coletada a banda na interface, que corresponde aos protoplastos viáveis. Estes foram lavados 2 vezes com tampão de eletroporação (Hepes-KOH 25mM pH 7,2, KCl 10 mM, MgCl₂ 15 mM, manitol 0,6M) e ressuspensos em 2 mL do mesmo tampão. Os protoplastos foram contados em microscópio usando uma câmara de Neubauer.

Os ensaios de expressão transiente foram conduzidos por meio de eletroporação de 2×10^5 – 5×10^6 protoplastos com 10 µg de DNA (cassete de expressão) e 30 µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), em um volume final de 0.8 mL, a 25 µF de capacitância e 250 volts (Gene Pulser – BIORAD). Os protoplastos recém eletroporados foram mantidos no gelo por 15 minutos e transferidos para 8 mL de meio MS Soja +0,6 M de manitol pH 5,5. Para a expressão transiente, os protoplastos foram incubados por 36 horas no escuro. Após esse período, as amostras foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração de RNA ou proteína.

2.9- Transformação transiente de plantas de tabaco e localização subcelular

A transformação transiente de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. havana) foi realizada como descrito anteriormente, por meio de agroinoculação (Carvalho *et al.*, 2008). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os vetores de interesse foram crescidas em 5 mL de meio Rhizo, com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 5000 RPM por 5 min. O pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetosiringona 10 µM) e ressuscitado em 1 mL do mesmo tampão. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas com *A. tumefaciens* em uma D.O. de 0,2, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da epiderme inferior. A expressão das proteínas foi confirmada por microscopia confocal, três dias após a agroinoculação.

Para a expressão transiente da proteína GmERD15 fusionada a YFP, folhas de tabaco foram agroinoculadas com a construção pYFP-GmERD15 (pUFV1470). Como controle de localização nuclear, foi utilizada a construção pGFP-NSP, que contém o gene de GFP fusionado em frame após o último códon do cDNA de NSP (Geminiviral Nuclear Shuttle Protein), para agroinoculação. Três dias após a inoculação, as folhas transformadas foram observadas no microscópio LSM 510 META invertido (ZEISS), utilizando a objetiva de imersão de óleo de 40x1,4 e o laser de argônio. A análise foi

realizada nas folhas, com explantes montados em água utilizando-se lâminas e lamínulas de vidro. Para a obtenção de imagens de expressão, YFP foi excitada a 514 nm, e sua emissão coletada a 535-590 nm. A fenda do microscópio foi fixada, fornecendo uma faixa óptica de 1,5 a 2,0 μm . As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser ” (ZEISS) e do programa Adobe Photoshop.

2.10-Expressão de proteínas His₆-tagged e purificação

Para expressar GmERD15 e as quimeras de GmERD15 e AtERD15 em bactéria, linhagens de E.coli BL21-*pLys* foram transformadas com os clones pHis-GmERD15 (pUFV1380), pHis-QGmERD15 e pHis-QAtERD15. Depois da indução com 2mM de Isopropil β -D-thiogalactopiranosídeo, cada cultura foi incubada por um período adicional de 6h. Proteínas totais foram extraídas sob ambas condições não-desnaturantes e desnaturantes, e His-GmERD15, His-QGmERD15 e His-QAtERD15 foram purificadas por cromatografia por resina de agarose níquel-ácido nitrilotriacético de afinidade e eluídas sob condições nativas de acordo com o protocolo QIAexpressionist (Qiagen). His-GmERD15 purificada foi utilizada como antígeno para produção do anticorpo em coelhos, por Dadalto (2010), os quais foram imunizados através injeções subcutâneas durante intervalos de 2 semanas três vezes, segundo Delú-Filho et al (2000).

2.11- Análises por imunoblotting

Proteínas nucleares de folhas de tabaco agroinoculadas com a construção pYFP-GmERD15 foram extraídas de acordo com protocolo descrito por Freitas et al (2007). Um Gel SDS-PAGE foi feito, e as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose por eletroblotting. Análises de imunoblotting foram feitas utilizando anticorpos policlonais anti-His-GmERD15 na diluição 1:1000 e um anticorpo IgG conjugado com fosfatase alcalina de coelho (SIGMA), na diluição 1:10000. A atividade de fosfatase alcalina foi verificada utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (SIGMA) e *p*-nitro blue tetrazolium (SIGMA).

2.12- Ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)

O ensaio de ChIP foi feito utilizando um kit de imunoprecipitação de cromatina (Imprint ChIP kit; SIGMA), de acordo com as instruções do fabricante. De forma sucinta, protoplastos derivados de células de soja em suspensão foram tratados com tunicamicina por 30 minutos, as proteínas ligadas ao DNA foram cross-linked com formaldeído 1%, e as células foram subsequentemente ressuspensas em tampão de lise, seguida de sonicação. Os extratos protéicos foram incubados com anticorpo contra GmERD15, RNA polimerase II de humanos, ou IgG normal de camundongo. Imunocomplexos foram extensivamente lavados, e o DNA foi recuperado utilizando uma coluna cromatográfica e eluído em 50 µL de 10mM Tris-HCl, pH 8,5. O DNA foi utilizado como template para amplificação por PCR com conjuntos de primers correspondendo ao fragmento de 187 bp do promotor de *GmNRP-B* identificado no ensaio EMSA. Como controle negativo, PCR foram feitos com conjuntos de primers para um fragmento de 1000bp do promotor de *GmNAC6*.

2.13-Clonagem de fragmentos amplificados do ChIP, seqüenciamento e análises de bioinformática

O DNA imunoprecipitado obtido pelo ensaio de ChIP foi amplificado utilizando o kit Whole Genome Amplification (Sigma) conforme instruções do fabricante, e posteriormente clonado em vetores de entrada TOPO-pCR4 para montagem de uma biblioteca de fragmentos de DNA que GmERD15 se ligue. Estes fragmentos de DNA clonados foram seqüenciados pela empresa Macrogen (www.macrogen.com/). As seqüências obtidas foram analisadas quanto à frequência de aparecimento de seqüências específicas, ao score e ao e-value junto ao banco de dados do Phytozome (www.phytozome.net/soybean).

Buscando identificar a presença de cis-elementos análogos ao verificado para a ligação de GmERD15 nas seqüências obtidas, foi utilizado um software de busca de seqüências palindrômicas (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>), verificando a

estabilidade de formação de hairpins de acordo com a presença destas sequências.

2.14-Ensaio de medida de atividade da enzima β -glucuronidase (GUS)

O ensaio fluorimétrico para avaliar a atividade da β -glucuronidase foi conduzido segundo Freitas *et al.*, (2007), utilizando methylumbelliferone (MU) como padrão. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 500 μ l de tampão GUS [100mM NaH₂PO₄ pH 7.0, 10mM EDTA, 0,1% (p/v) sarcosil, 0,1% (v/v) Triton X-100]. Para a reação, 25 μ l do extrato foi adicionado a 25 μ l do tampão GUS contendo como substrato 2mM de 4-methylumbelliferyl- β - D- glucuronide (MUG). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e a atividade de GUS mensurada utilizando o DYNA Quant 200 Fluorometer (Amersham Pharmacia Biotech).

2.15-Análises *in silico* de sequências de ERD15

Sequências de proteínas homólogas à ERD15 de soja foram obtidas do site do NCBI. Alinhamentos múltiplos foram realizados utilizando ClustalW e dendogramas foram feitos utilizando o programa MEGA5.

2.16- Microscopia de Força Atômica

Fragmentos de 700 bp da região promotora de GmNRP-B foram obtidos por amplificação a partir de pUFV1457, e utilizados na concentração de 10 ng/ μ L, juntamente com a proteína recombinante His-GmERD15, na concentração 1 μ g/ μ L, em solução de 10 mM de Tris-HCl pH 7,9, e 5 mM de MgCl₂. Como suporte foi utilizada mica, sendo o microscópio (NT-MDT) utilizado no modo semi-contato. A ponta utilizada (Nano World), teve raio de 10 nm, com constante de força de 7,4 N.m. As imagens foram obtidas e analisadas pelo software WSxM 5.0 Develop 1.3.

2.17-Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não estão descritas detalhadamente na dissertação, como preparação de géis de agarose, preparação de plasmídeos, transformação de bactérias, digestão de DNA por enzimas de restrição, síntese de cDNA, preparação de tampões e soluções estoques foram conduzidas exatamente segundo protocolos contidos em Sambrook et al.(1989).

3. Resultados e Discussão

3.1-Um homólogo de ERD15 de soja é induzido por tunicamicina e PEG

Como os genes que codificam as N-rich proteins de soja são induzidos por tunicamicina (um indutor de estresse no retículo) e PEG (um agente causador de estresse osmótico) (Costa et al., 2008), e como a proteína GmERD15 foi identificada a partir de uma varredura por mono-híbrido de leveduras, utilizando uma biblioteca de cDNA de soja enriquecida por mRNAs induzidos por estes agentes indutores de estresse (Alves 2010), foi analisada a expressão de GmERD15 em células de soja em suspensão submetidas a tratamento com tunicamicina e PEG (Figura 1).

Assim como o gene ERD15 de *Arabidopsis* (Kariola et al.,2006), GmERD15 é rapidamente induzido por estresse osmótico (Figura 1A). Este é também induzido por estresse no retículo causado por tunicamicina (Figura 1B), mimetizando o padrão de expressão de GmNRP, com pequenas diferenças cinéticas.

A expressão de GmERD15 é induzida rapidamente por PEG no tempo de 30 minutos de tratamento e aumentou rapidamente até a saturação ocorrer depois de 1 hora (Figura 1A). A indução de GmNRP-B por PEG ocorreu com leve defasagem em relação a GmERD15, com níveis de transcritos de GmNRP-B primeiramente detectados depois de 1 hora de tratamento com PEG e então ocorrendo declínio. Em células tratadas com tunicamicina, os níveis de transcritos de GmERD15 aumentaram rapidamente com acumulação máxima no tempo de 30 minutos de indução (Figura 1B). A acumulação do RNA de GmNRP-B foi inicialmente verificada após 30 minutos de tratamento, alcançando completa indução depois de 1 hora, declinando levemente logo após. Portanto, para ambos os tratamentos, uma expressão aumentada de GmERD15 precedeu a indução de GmNRP-B. Células de soja não tratadas foram utilizadas como controle de expressão para todos os tempos dos tratamentos (dados não mostrados).

A cinética de indução de GmERD15 em células de soja em suspensão tratadas com tunicamicina e PEG implica que GmERD15 atua como um agente

upstream da via de sinalização mediada por proteínas NRP que integram sinais de resposta a estresse no retículo e osmótico com a morte celular programada em plantas de soja. De fato, foi mostrado que a expressão de GmERD15 precede a expressão de GmNRP-B sob tratamento com tunicamicina e PEG (Figura 1), um padrão esperado para um fator de transcrição atuando *upstream* a GmNRP-B na via de sinalização. Estes dados suportam a idéia que GmERD15 atua no controle da expressão de GmNRP-B.

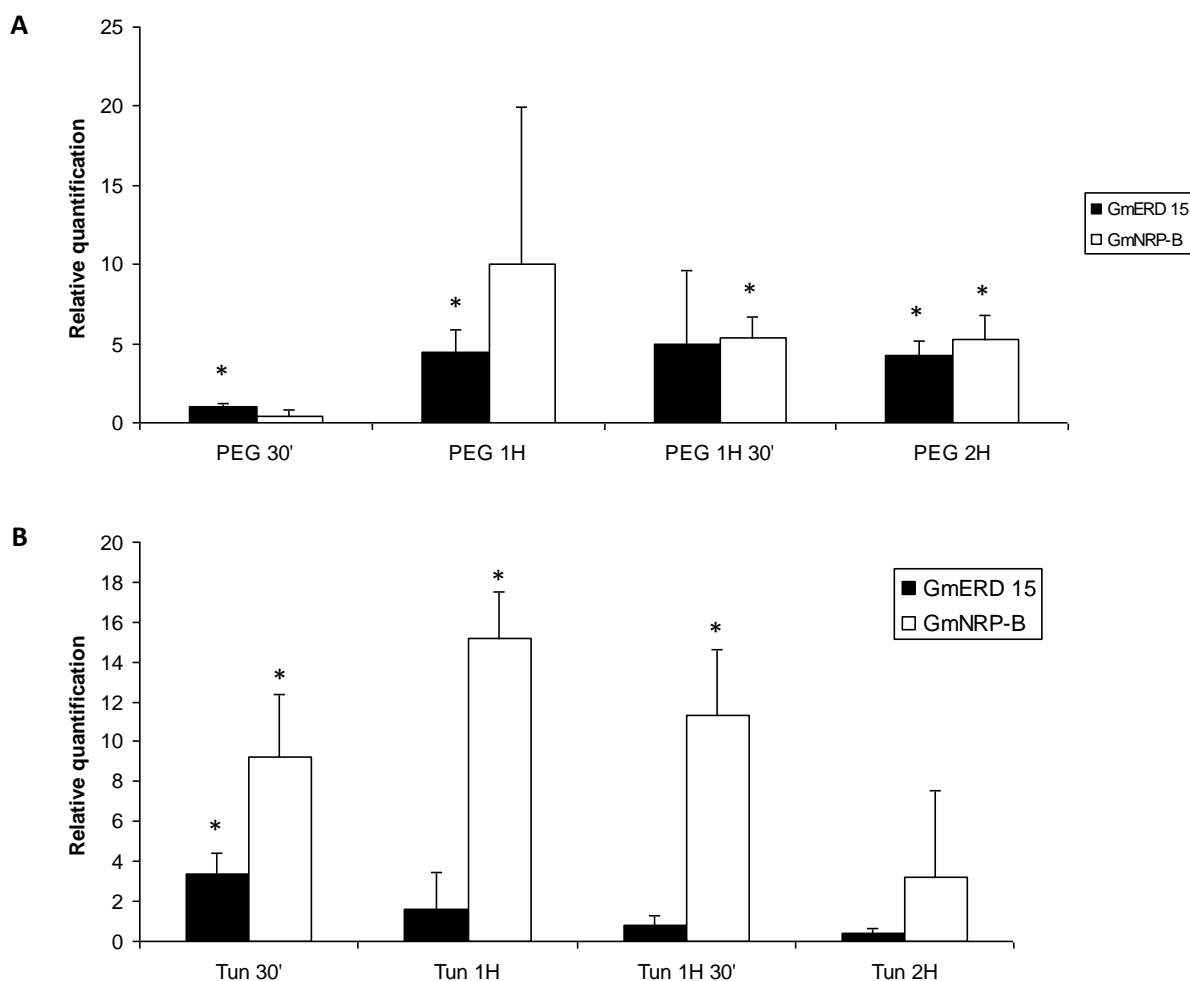


Figura 1- GmERD15 e induzido por tunicamicina e PEG. (A) Indução de GmERD15 e GmNRP-B por PEG: Foi medida a expressão dos genes por qRT-PCR em células de soja em suspensão tratadas com PEG nos tempos indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene da helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um $n = 3$ réplicas biológicas); (B) Indução de GmERD15 e GmNRP-B por tunicamicina: Foi medida a expressão dos genes por qRT-PCR em células de soja em suspensão tratadas com tunicamicina nos tempos indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene da helicase. 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 seguidas por asterisco

diferem significativamente dos tratamentos controle ao nível de 5% de probabilidade.

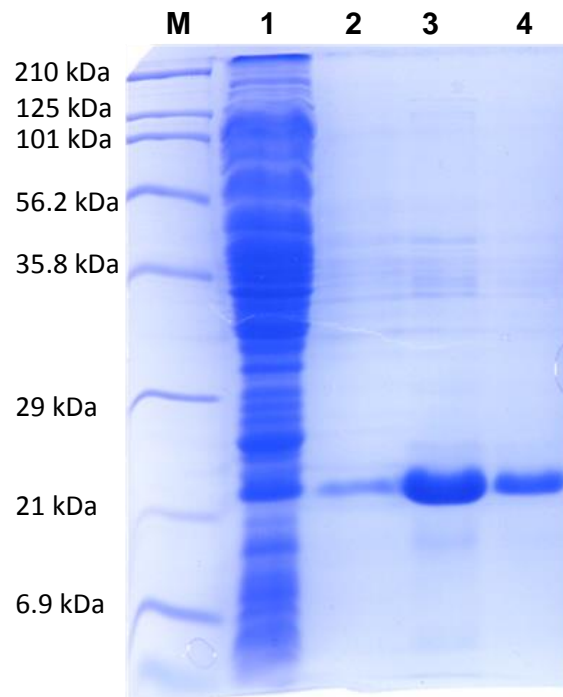
3.2-GmERD15 liga-se especificamente ao promotor de NRP-B in vitro e que exibe atividade de transativação em leveduras.

Como foi demonstrado que GmERD15 liga-se ao promotor de GmNRP-B e que induz a expressão de genes repórteres em leveduras (Alves, 2010), buscamos então analisar as propriedades de ligação ao DNA de GmERD15 e de confirmação de sua capacidade de transativação, já anteriormente demonstrada pela ativação do gene repórter β -galactosidase (Alves, 2010). Como já foi demonstrado (Alves, 2010), GmERD15 não possui qualquer motivo típico de ligação ao DNA conhecido.

Para confirmar que GmERD15 liga-se especificamente na região promotora de GmNRP-B, limitada às posições -700 a -350, como demonstrado por Alves (2010), foi realizado um ensaio de retardamento em gel utilizando um fragmento de 187 bp da região promotora de GmNRP-B (posições -340 a -517). A incubação do fragmento de 187 bp do promotor de GmNRP-B marcado com biotina com a proteína recombinante His-tagged GmERD15 (Figura 2A) resultou na formação de complexos proteína-DNA, como visto pela mudança de mobilidade eletroforética do DNA (Figura 2B, canaleta 2). As interações proteína-DNA foram específicas, já que com a introdução de um excesso de 400 vezes de uma sonda não marcada para ligação da proteína o complexo não pôde ser visualizado (canaleta 3). Além disso, o complexo proteína-DNA apresentou uma menor mobilidade eletroforética com a adição de um anticorpo anti-GmERD15, indicando que a proteína contida no complexo era certamente GmERD15 e não um contaminante (canaleta 5). Esta interpretação foi validada com a observação de que os anticorpos anti-GmERD15 não se ligam diretamente á sonda (canaleta 4). Além disto, a especificidade de ligação de GmERD15 ao promotor de GmNRP-B foi posteriormente confirmada pela incapacidade de GmERD15 ligar-se ao promotor de GmBiPD, utilizado como controle negativo (Figura 2C), bem como também foi verificado que uma proteína não relacionada GST não liga-se ao fragmento de 187 bp do promotor de GmNRP-B (Figura 2D). Tomados em conjunto, estes resultados

estabelecem que GmERD15 liga-se especificamente ao promotor de GmNRP-B *in vitro* em uma região que compreende os nucleotídeos -340 a -517.

A

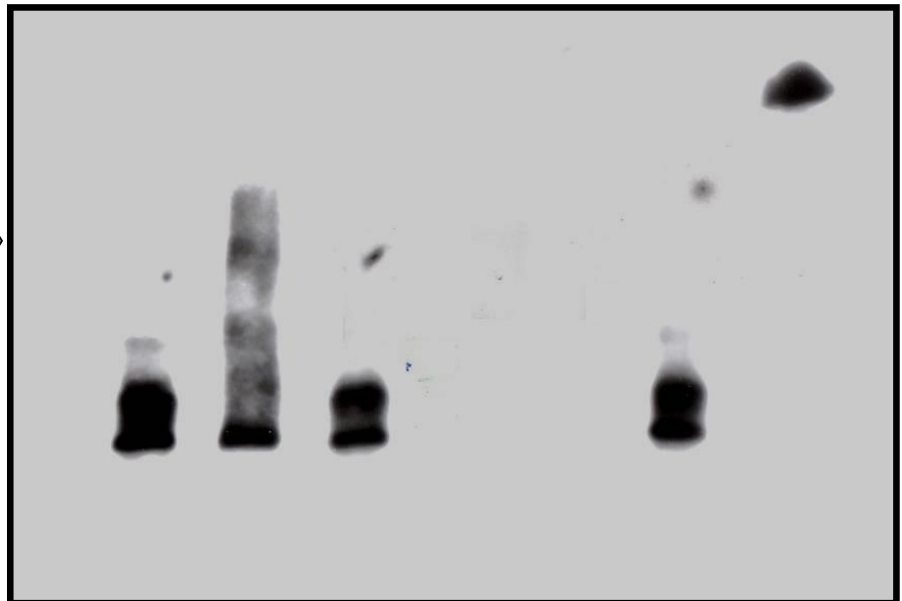


B

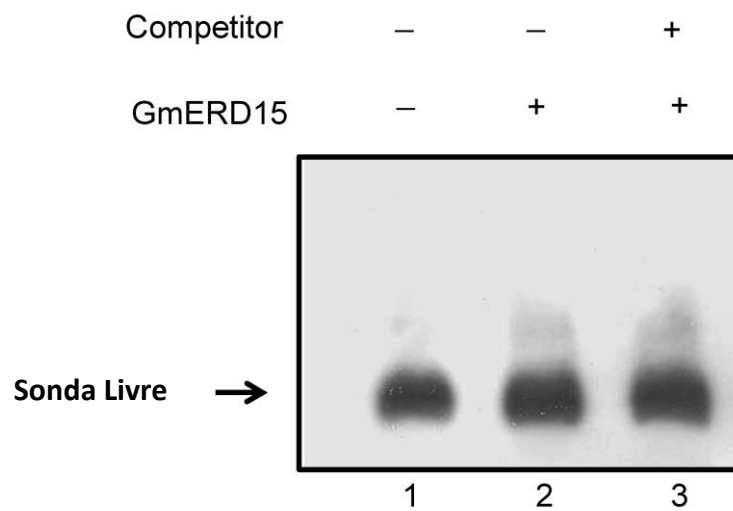
	1	2	3	4	5
Antisero AntiGmERD15	-	-	-	+	+
Competidor	-	-	4 pmoles	-	-
His-GmERD15	-	+	+	-	+

Complexo
Proteína:DNA

Sonda
livre



C



D

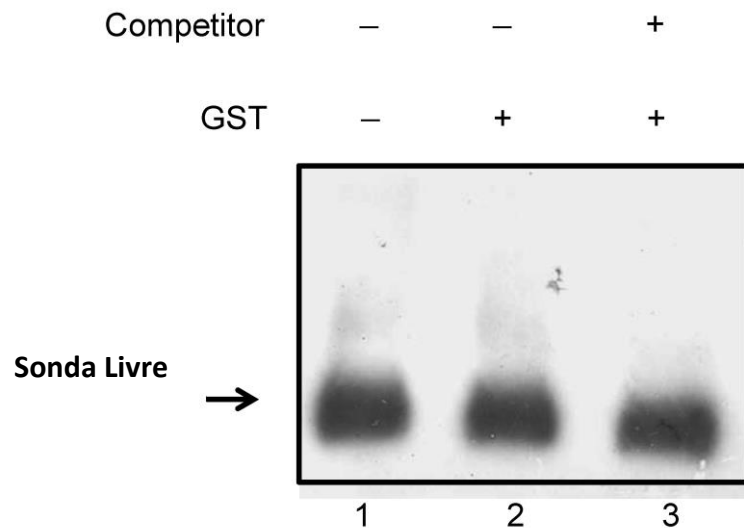


Figura 2: GmERD15 liga-se especificamente a um fragmento de 187 bp do promotor de GmNRP-B: (A) Gel de SDS-PAGE da purificação de His-GmER15. M: padrão SDS-PAGE Standards, Broad Range (BIORAD). 1- fração não ligante; 2-segunda lavagem; 3- primeira eluição; 4- segunda eluição. (B) Gel de retardamento da sonda de 187 bp na presença da proteína GmERD15. Canaleta 1, sonda livre marcada; canaleta 2, sonda marcada + His-GmERD15; canaleta 3, sonda marcada + His-GmERD15 + excesso de 400 vezes da sonda não marcada; canaleta 4, sonda marcada + antisoro anti-His-GmERD15;

canaleta 5, sonda marcada + antisoro anti-His-GmERD15 + His-GmERD15. (C) Gel de retardamento do fragmento de 350 bp do promotor de *GmBIPD* na presença de GmERD15. Canaleta 1, sonda livre marcada; canaleta 2, sonda marcada + His-GmERD15; canaleta 3, sonda marcada + His-GmERD15 + excesso de 400 vezes da sonda não marcada. (D) Gel de retardamento do fragmento de 187 bp do promotor de *GmNRP-B* na presença de GST. Canaleta 1, sonda livre marcada; canaleta 2, sonda marcada + GST; canaleta 3, sonda marcada + GST + excesso de 400 vezes da sonda não marcada.

Outro ensaio utilizado para a visualização direta da interação *in vitro* entre GmERD15 e a região promotora de GmNRP-B foi o de microscopia de força atômica. Utilizando-se um fragmento de 700 bp da região promotora de GmNRP-B, foi verificada a interação da proteína GmERD15 com a região promotora, pela visualização da proteína ligada ao fragmento de DNA utilizado (Figura 3). Uma molécula de proteína GmERD15 sozinha, apresenta um diâmetro de aproximadamente 10 nm, enquanto que a molécula de DNA de 700 bp apresenta um comprimento médio de 238 nm. As imagens mostram a ligação de um componente de diâmetro médio de aproximadamente 30 nm à molécula de DNA (Figura 3), indicando fortemente que o modo de ligação desta proteína ao DNA é multimérico, ou seja, mais de uma subunidade da proteína é requerida para a ligação estável à região promotora de GmNRP-B. Outra característica importante que pode ser visualizada é a formação de uma dobra (“bending”) na estrutura do DNA provocada pela ligação da proteína, uma característica importante na ligação de fatores de transcrição ao DNA (Van der Vliet e Peter Verrijzer 1993).

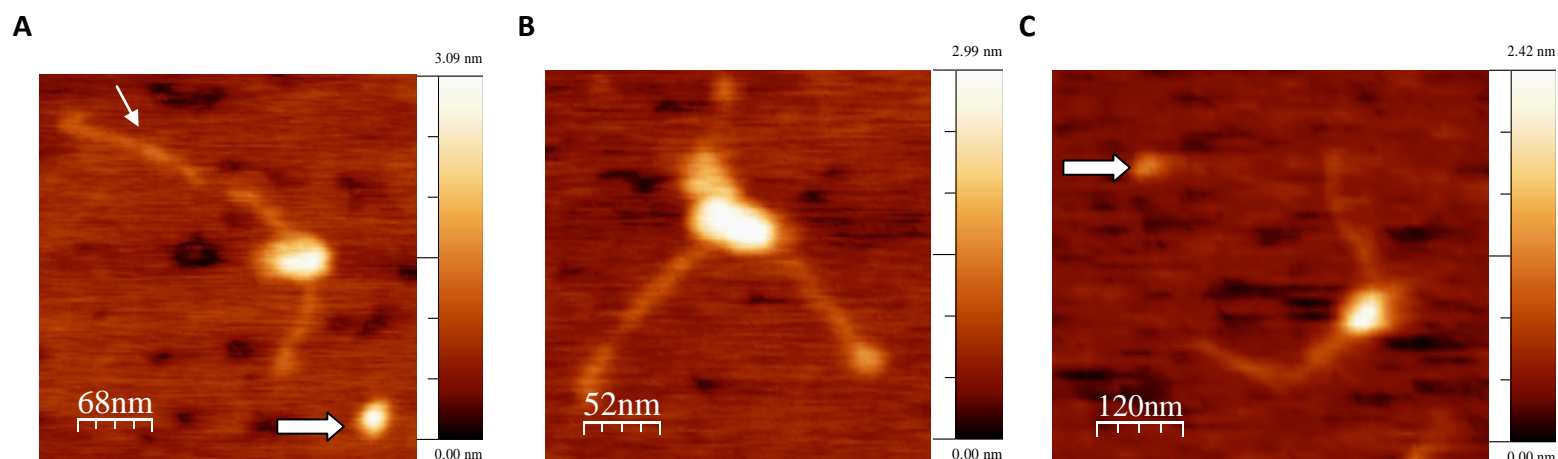


Figura 3- GmERD15 liga-se a um fragmento de DNA da região promotora de GmNRP-B *in vitro* de forma multimérica. (A) No canto superior esquerdo é mostrado um fragmento de DNA isolado (indicado pela seta branca fina), no canto inferior direito uma única molécula de proteína GmERD15 (indicado pela seta branca larga), e ao centro um fragmento de DNA ligado a um componente protéico, formado pela união de mais de uma proteína GmERD15. (B) Uma imagem mais ampliada de um componente protéico ligado a um fragmento de DNA de 700 bp. (C) No canto superior esquerdo uma unidade protéica da proteína GmERD15 (indicado pela seta branca larga), e no canto inferior direito um fragmento de DNA de 700 bp ligado a mais de um componente da mesma proteína. Em (A), (B) e (C) são indicados nos cantos inferiores esquerdos a escala de tamanho das figuras, enquanto que à direita de cada figura é mostrado o gradiente de altura verificada pela ponta do microscópio de força atômica.

Como demonstrado anteriormente (Alves, 2010), a inspeção da estrutura primária de GmERD15 revelou a existência de uma sequência conservada de 13 aminoácidos nas posições 71-83 (⁷¹DEDEKERKEGKEV⁸³), similar a encontrada em reguladores transcricionais que se ligam a DNA fita simples (ssDNA binding regulators) (Desveaux et al., 2002). Seguindo o exame da atividade de transativação de GmERD15, iniciada por Alves (2010), a região codificadora de GmERD15 foi fusionada ao domínio de ligação ao DNA do transfator de leveduras GAL4 (BD-GAL4), e expressa como uma proteína quimérica em uma linhagem de levedura contendo o gene repórter *HIS3* sob o controle do promotor *GAL1*. A expressão de BD-GAL4 fusionado a GmERD15 promoveu o crescimento do mutante de levedura na ausência de histidina, na concentração de até 75mM de inibidor 3-aminotriazole, em relação ao controle negativo contendo uma linhagem transformada apenas com BD-GAL4 vazio (Figura 4). Este resultado confirma a atividade de transativação em leveduras de GmERD15.



Figura 4- GmERD15 apresenta atividade de transativação em leveduras. Verificação da prototrofia em meio sem histidina da levedura AH109/BD-GmERD15, na concentração de 75mM do inibidor competitivo 3 amino-triazole (3AT), em relação ao controle negativo contendo uma linhagem transformada apenas com BD-GAL4 vazio (lado direito da figura).

3.3- GmERD15 é expresso constitutivamente em raiz e apresenta localização nuclear confirmada em células epidermais de folhas de tabaco, ligando-se e ativando o promotor de GmNRP-B in vivo.

Para determinar a expressão de GmERD15 em tecidos de soja nós investigamos a acumulação do transcrito de GmERD15 em vários tecidos de soja por PCR em tempo real quantitativo. Como mostrado na figura 5, os transcritos de GmERD15 estão presentes em todos os tecidos analisados , sendo porém expressos em níveis mais altos na raiz , seguido de plântulas de soja (Figura 5).

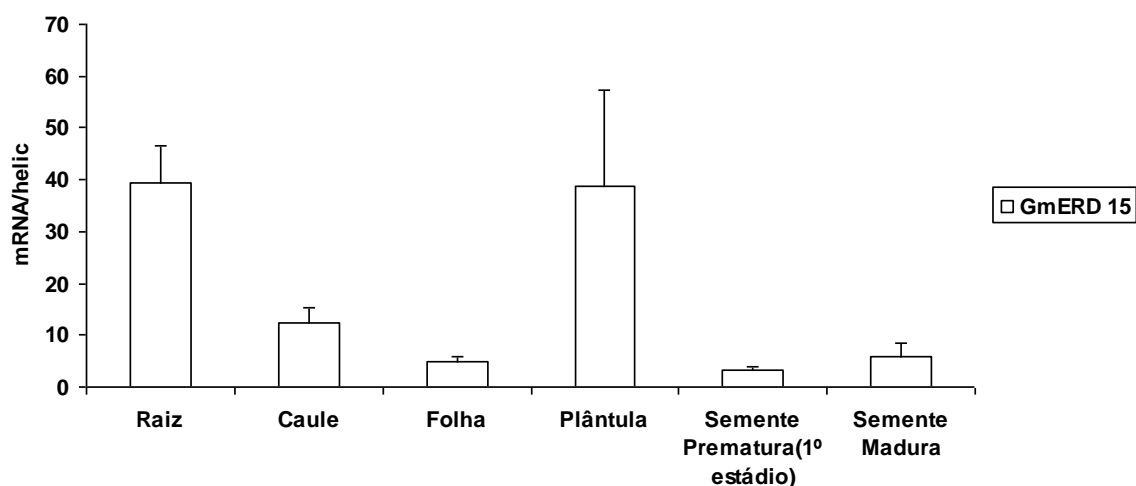


Figura 5- Expressão de GmERD15 em diferentes tecidos de soja. Foi medida a expressão do gene por qRT-PCR em diferentes tecidos de soja, como indicado na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene da helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um n = 3 réplicas biológicas).

Evidências da localização nuclear de GmERD15 já foram demonstradas anteriormente por microscopia confocal (Alves 2010), porém havia a necessidade da validação desta localização, bem como da comprovação de que GmERD15 apresenta atividade de ligação ao promotor de GmNRP-B *in vivo*. Com isso, foi utilizado novamente um ensaio de expressão transiente mediado por *Agrobacterium tumefaciens* em células epidermais de folhas de tabaco, sendo então analisada a localização subcelular da quimera YFP-GmERD15 por microscopia confocal (Figura 6). Apesar do sinal relativamente forte de YFP acumulado no citoplasma, a fusão YFP-GmERD15 foi também detectada no núcleo de células transfetadas. Na parte inferior direita da figura 6A é mostrada uma sobreposição das imagens fluorescentes de YFP-GmERD15 e NSP-GFP com. A figura mostra o sinal de fluorescência nuclear de YFP-GmERD15 co-localizado com o sinal de NSP-GFP que se acumula no núcleo de células transfetadas (Carvalho et al.,2008). A distribuição nucleocitoplasmática de YFP-GmERD15 foi então posteriormente confirmada por imunoblotting de extratos nucleares e extratos solúveis de folhas de tabaco transfetadas, (Figura 6B). A presença da proteína GmERD15 em ambos citoplasma e núcleo é consistente com o papel duplo que esta proteína pode apresentar em compartimentos subcelulares distintos (Wang e Grumet 2004).

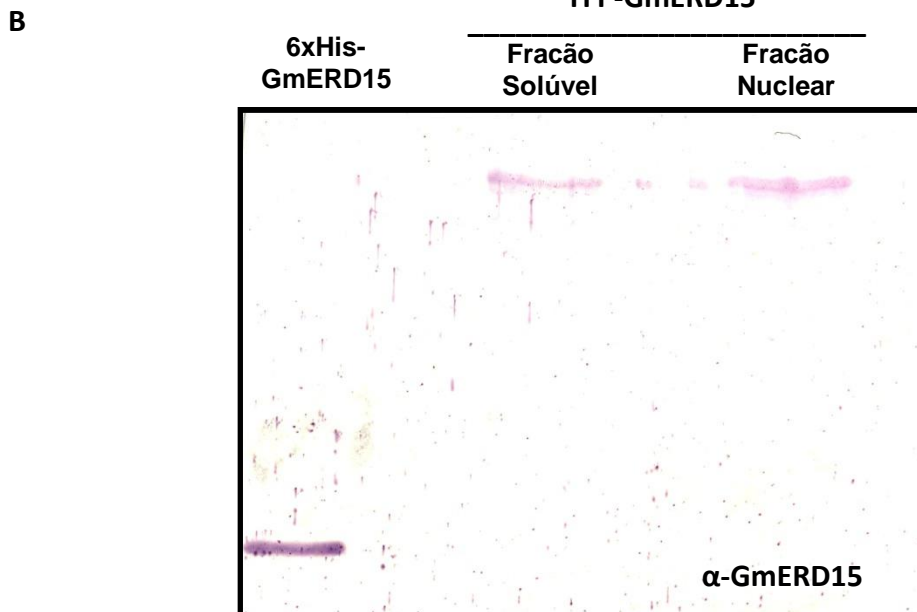
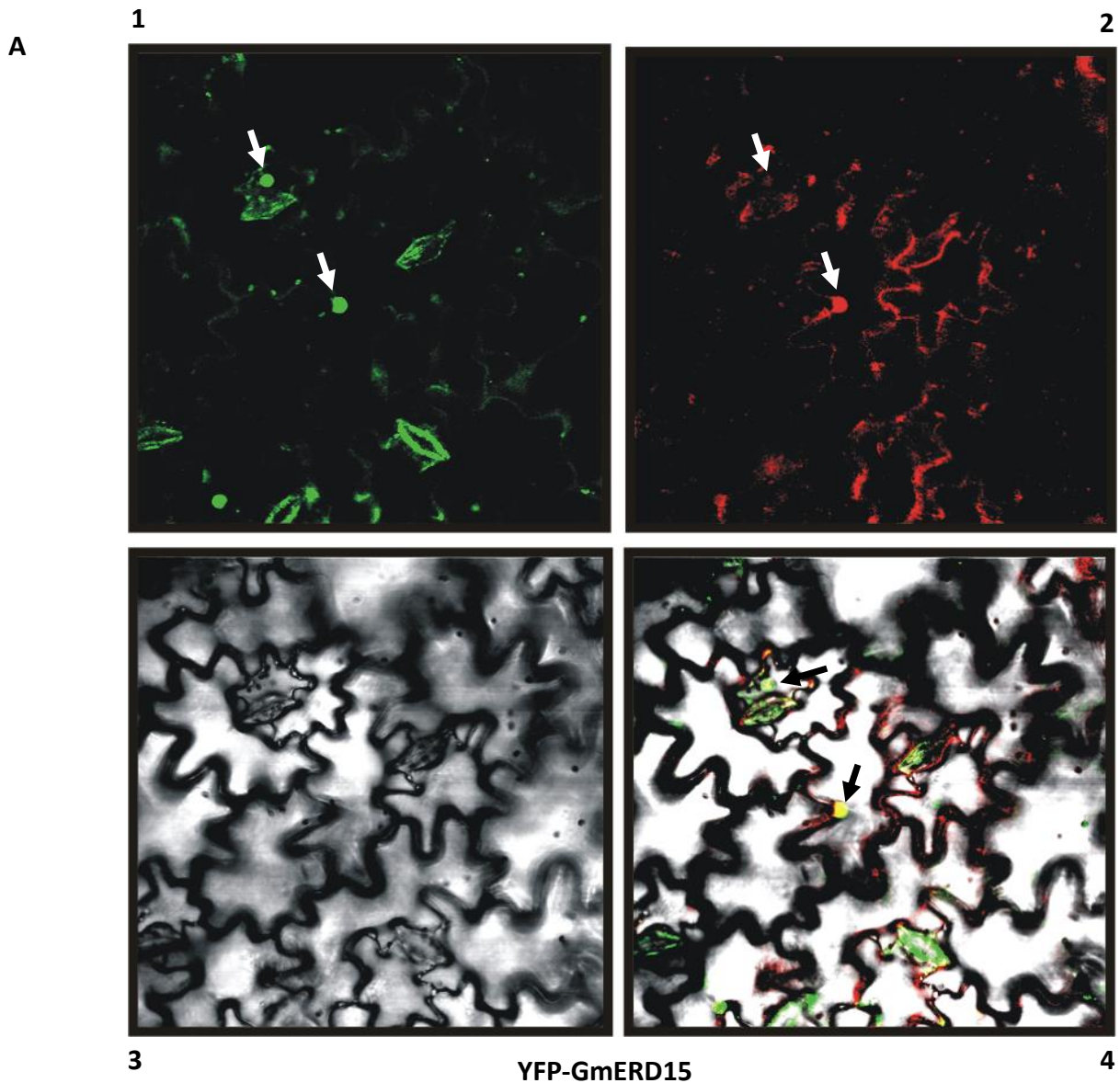


Figura 6- GmERD15 localiza-se no núcleo de células de folhas de tabaco. (A) YFP-GmERD15, bem como NSP-GFP foram expressas em células epidermais de folhas de tabaco, por meio de expressão transiente utilizando *Agrobacterium*. A expressão da proteína foi monitorada pela fluorescência emitida por YFP, por meio de microscopia confocal, 3 dias após a agroinoculação, com os vetores binários. Em (1) fluorescência de NSP-GFP, (2) fluorescência de YFP-GmERD15, (3) microscopia de luz, e em (4), a sobreposição das três imagens. (B) Immunoblotting do fracionamento nuclear, de folhas de tabaco transfectadas com YFP-GmERD15, utilizando o antisoro anti-His-GmERD15.

Como demonstrado anteriormente (Alves 2010), GmERD15 possui um domínio PAM2 conservado na extremidade N-terminal que é um dos motivos de interação com proteínas que interagem com a cauda poli-(A) de mRNAs (poli(A)-binding proteins ou PABP). Proteínas PABP estão envolvidas em vários processos de controle pós-transcricional da expressão gênica e metabolismo de RNA, incluindo biossíntese, turnover, e exportação de mRNA (Chekanova et al., 2003). PABPs citoplasmáticas são particularmente envolvidas na regulação da tradução e estabilização de mRNAs (Wang et al., 2000). Uma questão ainda a ser determinada trata-se da confirmação da ligação de GmERD15 a PABPs através de seu domínio PAM2 funcional, uma atividade coerente com a localização citoplasmática desta proteína. Apesar de GmERD15 não possuir um sinal de localização nuclear, fusões YFP-GmERD15 foram visualizadas no núcleo de células epidermais de folhas de tabaco transfetadas. Uma interação com possíveis proteínas acessórias para a localização nuclear não pode ser descartada como necessária para a atividade de controle transcricional de GmERD15.

Experimentos de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP) foram realizados para examinar se GmERD15 liga-se ao promotor de GmNRP-B *in vivo* utilizando células de soja em suspensão tratadas com tunicamicina e anticorpos anti-His-GmERD15 (Figura 7). Apesar de nenhuma quantidade significativa do fragmento do promotor de GmNRP-B ter sido imunoprecipitada de protoplastos controles (Figura 7B, segunda canaleta), um fragmento do promotor de GmNRP-B foi imunoprecipitado de protoplastos tratados com tunicamicina (Figura 7A, segunda canaleta). Este resultado é consistente com a ativação da transcrição de GmERD15 por tunicamicina (Figura 1). A imunoprecipitação do fragmento do promotor de GmNRP-B foi mediada pela interação específica de GmERD15, como pode ser mostrado pelo fato do anticorpo anti-His-GmERD15 não imunoprecipitou o promotor de GmNAC6, um gene ativado pela via integrativa, utilizado como controle negativo (Figura 7C), bem como anticorpos anti-RNA polimerase II humana e anticorpo IgG de camundongo não imunoprecipitaram o promotor de GmNRP-B (Figura 7A, terceira e quarta canaletas). Estes resultados fortalecem o argumento de que

GmERD15 funciona como uma proteína que se liga especificamente ao promotor de GmNRP-B *in vivo*.

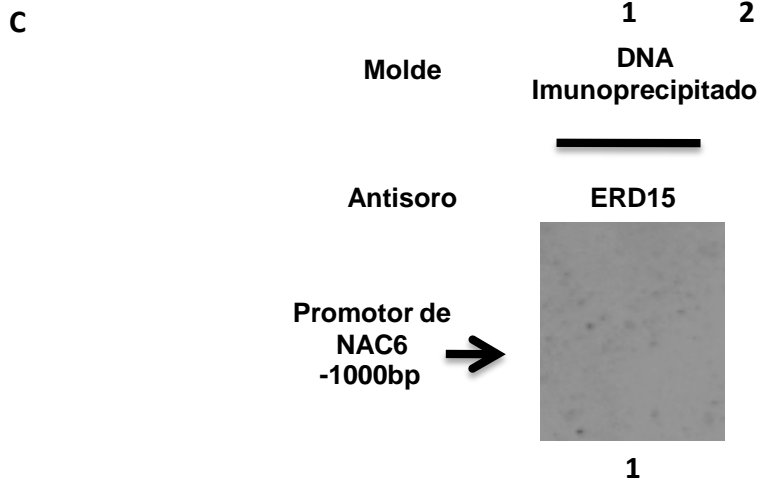
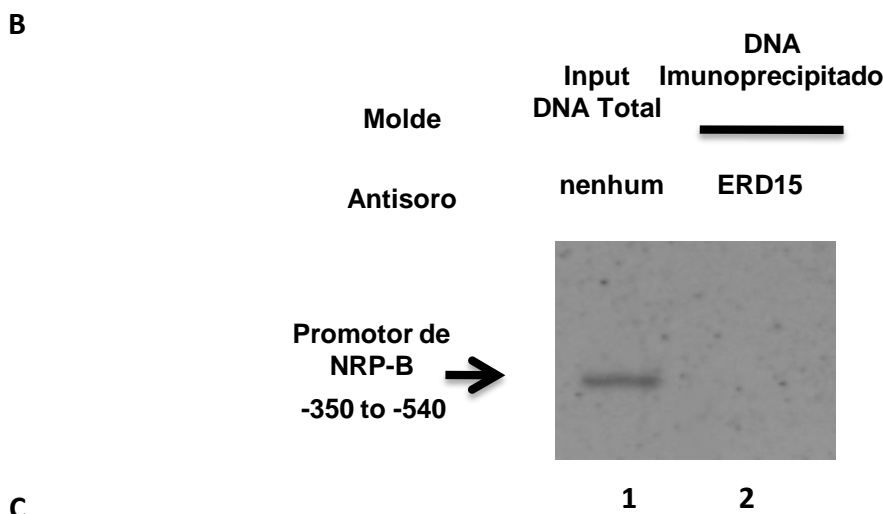
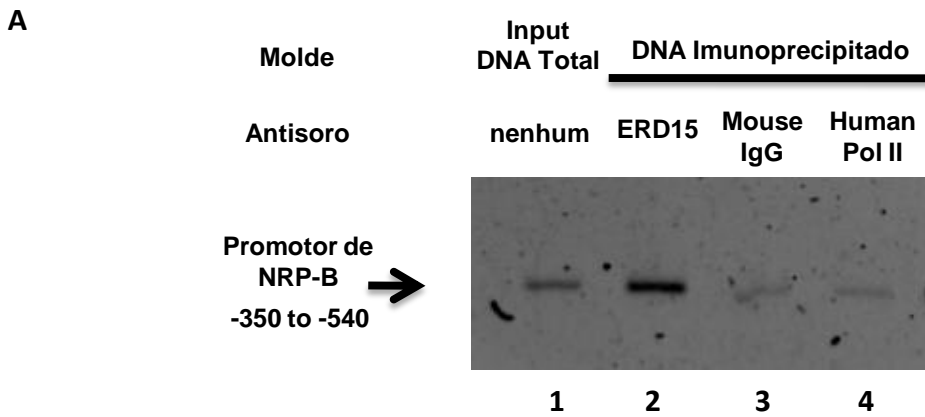


Figura 7- GmERD15 liga-se especificamente a um fragmento do promotor de GmNRP-B *in vivo*. (A) Imunoprecipitação de cromatina de protoplastos de células de soja em suspensão tratadas com tunicamicina utilizando anticorpos anti-His-GmERD15. O fragmento de 187 bp do promotor de GmNRP-B foi detectado por amplificação quando a imunoprecipitação foi

mediada por anticorpos anti-His-GmERD15 (segunda canaleta), mas não por anticorpos não relacionados (terceira e quarta canaletas). (B) Imunoprecipitação de cromatina de protoplastos de células de soja em suspensão não tratados (controle) utilizando anticorpos anti-His-GmERD15, onde não foi verificada amplificação do fragmento de 187 bp do promotor de GmNRP-B (segunda canaleta). (C) Imunoprecipitação de cromatina de protoplastos de células de soja em suspensão tratadas com tunicamicina utilizando anticorpos anti-His-GmERD15, sendo que não foi detectada a amplificação de um fragmento de 1000 bp do promotor de GmNAC6. Input representa uma amostra do DNA total não imunoprecipitado amplificado.

Como foi confirmado que GmERD15 liga-se ao promotor de GmNRP-B tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e exibe atividade de transativação em leveduras, foi então ensaiado se GmERD15 ativa a transcrição de GmNRP *in vivo*. Para isto foi realizado um ensaio de expressão transiente em protoplastos de soja com uma construção do promotor de GmNRP-B controlando a expressão de uma β -glucuronidase (GmNRP-B:: β -glucuronidase). A expressão de GmERD15 resultou em aumento da expressão do gene repórter (Figura 8), indicando que GmERD15 ativa o promotor de GmNRP-B *in vivo*. Faria (2009) já havia verificado que a expressão de GmNRP-B é induzida por fermento, e a relativamente alta expressão do promotor de GmNRP-B na ausência da expressão de GmERD15 em protoplastos de soja é aparentemente gerada devido ao sinal de fermento ativado durante a preparação dos protoplastos. Portanto, não é surpreendente que a expressão ectópica de GmERD15 cause apenas uma pequena, mas significativa, elevação na atividade do promotor de GmNRP-B sob estas condições. Estes dados somados demonstram a atividade de GmERD15 *in vivo* na ligação e ativação do promotor de GmNRP-B.

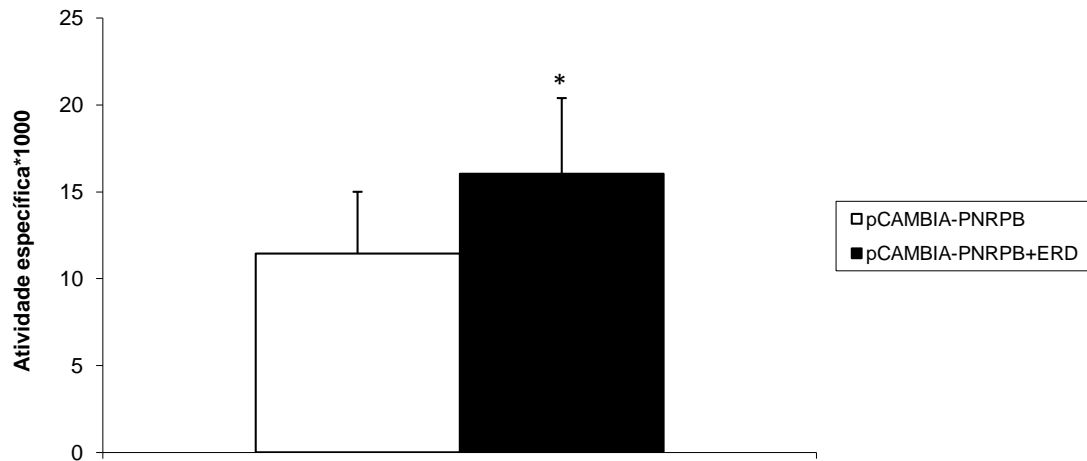


Figura 8- GmERD15 ativa o promotor de GmNRP-B em protoplastos de soja. A expressão transiente de GmERD15 em protoplastos de soja ativa a construção promotor GmNRP-B:: β -glucuronidase. Protoplastos de soja foram co-eletroporados com plasmídeos contendo o gene -1000bp promotor de GmNRP-B:: β -glucuronidase(GUS) e promotor 35S::GmERD15 ou vetor vazio. Depois de 48 horas, a atividade de β -glucuronidase (nmol/min/mg proteína) foi medida dos extratos de proteína totais de células de soja transfetadas. As barras finas indicam o desvio padrão de 15 réplicas biológicas. O asterisco indica que os valores das médias diferem estatisticamente do tratamento controle pelo Teste t de Student bicaudal com um *p value* de 0,000846.

3.4- GmERD15 liga-se especificamente a uma sequência palindrômica de 12 bp no promotor de GmNRP-B.

Visando mapear precisamente os sítios de ligação de GmERD15 no promotor de GmNRP-B, primeiramente foi realizado um mapeamento da região de 187 bp do promotor de GmNRP-B, a qual foi determinado que GmERD15 se liga. Para isso, foi realizado um ensaio de mudança de mobilidade eletroforética utilizando sequências de 50 e 60 bp como sondas (posições -550/-500; -500/-450; -450/-390 e -390/330), cobrindo todo o fragmento de 187 bp (Figura 9A). Foi verificado que GmERD15 liga-se estavelmente com o fragmento de -550/-500 (canaleta 1), e falhou na interação com os outros três fragmentos cobrindo as posições de -500 a -330 (Figura 9A). Posteriormente buscou-se determinar se o fragmento de -550/-500 era funcional e suficiente para ativar a expressão de genes repórteres em levedura, na presença de GmERD15. Este fragmento foi ligado ao promotor mínimo de levedura *CYC1*, e foi analisada sua capacidade de ativar a expressão de genes repórteres durante a expressão de GmERD15 (Figura 9B). Foi confirmado que o sítio de ligação de 50bp é suficiente para ativação do promotor mínimo de leveduras mediada por GmERD15. Consistente com estes dados, um fragmento de promotor faltando a porção de -550/-500 foi obtida pela deleção de uma região de -666/-403 do promotor de GmNRP-B, sendo que este fragmento falhou na ativação do gene repórter pela mediação de GmERD15 (Figura 9B).

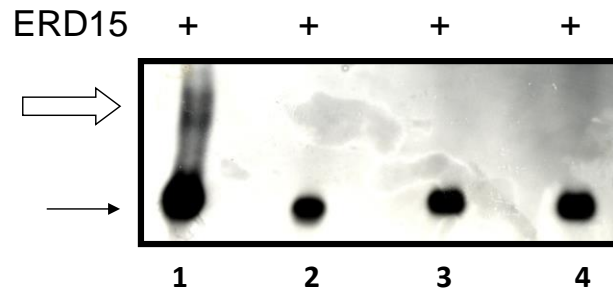
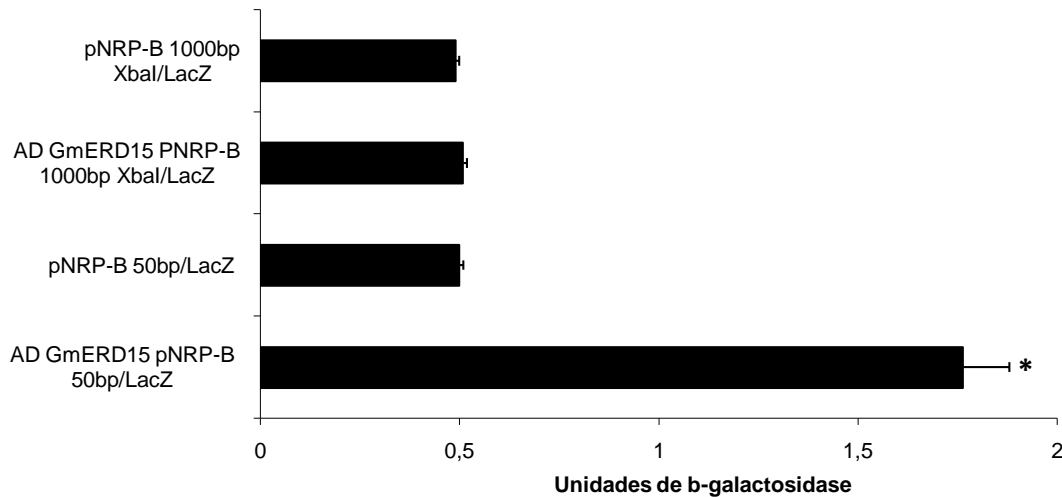
A**B**

Figura 9- Um sítio de 50 pares de bases do promotor de GmNRP-B é necessária e suficiente para a ligação de GmERD15. (A) Uma região de -550 a -330 do promotor de GmNRP-B foi dividida em quatro regiões (duas de 50bp e duas de 60bp), sendo utilizadas para verificação por gel de retardamento. Canaleta 1: de -550 a -500bp; canaleta 2: de -500 a -450; canaleta 3: de -450 a -390; canaleta 4: de -390 a -330. Os fragmentos foram biotinizados e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente com a proteína GmERD15 recombinante. A seta grande indica a formação do complexo proteína:DNA, enquanto a seta pequena indica a sonda livre. (B) Medida de atividade de β -galactosidase de mutantes de levedura transformados com a construção pLACZi-PNRP-B 1000 digerido com a enzima XbaI, e com pLACZi-Fragmento de -550 a -500 de PNRP-B, co-transformados com a fusão transcricional AD-GmERD15. Como controle foram utilizadas as construções co-transformadas com AD vazio. A atividade da enzima β -galactosidase é expressa em unidades de β -galactosidase.

A inspeção do sítio de ligação de 50 bp (posições -550/-500) revelou a presença de uma sequência palindrômica de 12 bp ⁻⁵¹¹AGCATCAGTGCT⁻⁵⁰⁰ (Figura 10A). Visto que sequências repetidas e invertidas tem demonstrado atuar como sítios de ligação de proteínas ao DNA (Desveaux et al.,2002), foi ensaiado se GmERD15 se liga a diferentes formas da sequência palindrômica (dupla fita e fitas simples, codificante e não codificante) pelo ensaio de retardamento em gel (Figura 10C). Complexos de proteína-DNA foram formados pela incubação de GmERD15 com ⁻⁵¹¹AGCATCAGTGCT⁻⁵⁰⁰ como fita dupla (canaleta dois), e fita simples codificante (canaleta 6), mas não com a fita não codificante (canaleta 4). Na região promotora de GmNRP-B existe outra sequência palindrômica existente, (⁻⁴²⁴ACGATTCTATCAGCTTCTAGAACGT³⁹⁹), com potencial termodinâmico para a formação de uma estrutura em hairpin (Figura 10B), assim como a sequência ⁻⁵¹¹AGCATCAGTGCT⁻⁵⁰⁰, porém como demonstrado por ensaios de retardamento em gel (Figura 10C), apenas esta segunda foi capaz de formar um complexo proteína-DNA estável com GmERD15, indicando a especificidade de ligação de GmERD15 a este *cis*-elemento. Apesar da presença de um possível motivo ssDNA binding transcriptional regulator na sequência de GmERD15 e de uma região de ligação de proteínas ssDNA binding proteins no fragmento do promotor de GmNRP-B, GmERD15 liga-se estavelmente e de forma específica a fragmentos dupla fita de 187 bp, 50 bp e 12 bp *in vitro* (Figuras 2, 9 e 10). Baseado na termodinâmica da estabilidade da formação do hairpin, uma idéia é que a sequência palindrômica de 12 bp forme uma estrutura em hairpin ($\Delta G = -1,92$), provendo uma alça de fita simples para a ligação de GmERD15. Alternativamente, GmERD15 poderia se ligar a porção de fita dupla da sequência palindrômica, seguida de uma separação de fitas facilitada pela ligação a porção de fita simples. Este modelo alternativo é consistente com a alta afinidade de ligação de GmERD15 a forma dupla fita da sequência palindrômica de 12 bp que foi mapeada como o sítio de ligação da proteína (Figura 10).

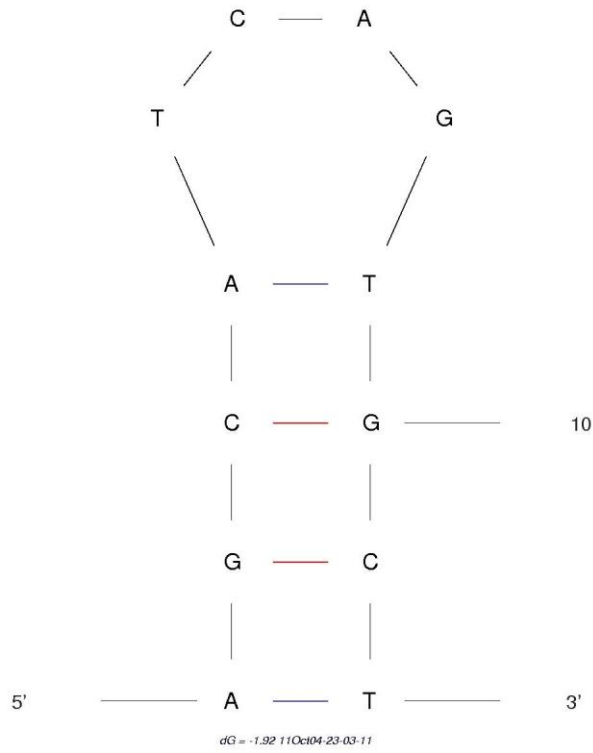
Finalmente, para a confirmação *in vivo* do papel da região palindrômica de 12 bp na ligação específica de GmERD15 na ativação da transcrição do

gene GmNRP-B, um fragmento de promotor faltando esta região palindrômica foi obtida pela deleção de uma região de -666/-403 do promotor de GmNRP-B, sendo que este fragmento falhou na ativação do gene repórter pela mediação de GmERD15 (Figura 10D). Tomados estes resultados em conjunto, verifica-se que um sítio de ligação de 12 bp, ⁻⁵¹¹AGCATCAGTGCT⁻⁵⁰⁰, da região promotora de GmNRP-B, é suficiente para a ligação específica e ativação da expressão de GmNRP-B *in vitro* e *in vivo* por GmERD15.

A

Output of the graph (9)
msig_04_4

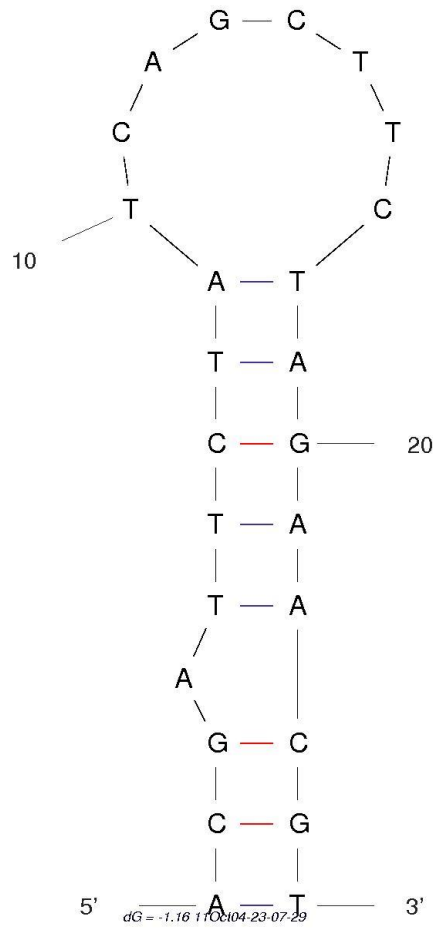
Created Tue Oct 4 23:05:03 2011



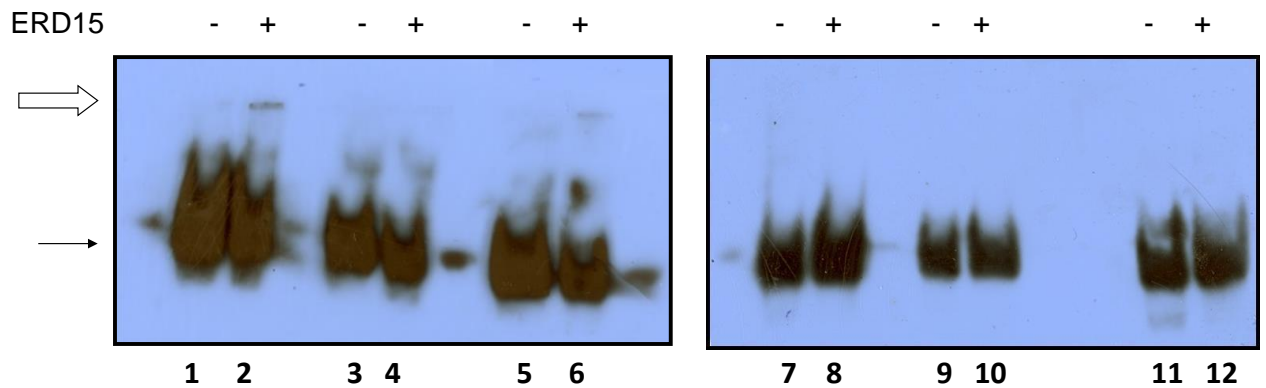
B

Output of the graph (9)
msig_04_4

Created Tue Oct 4 23:07:30 2011



C



D

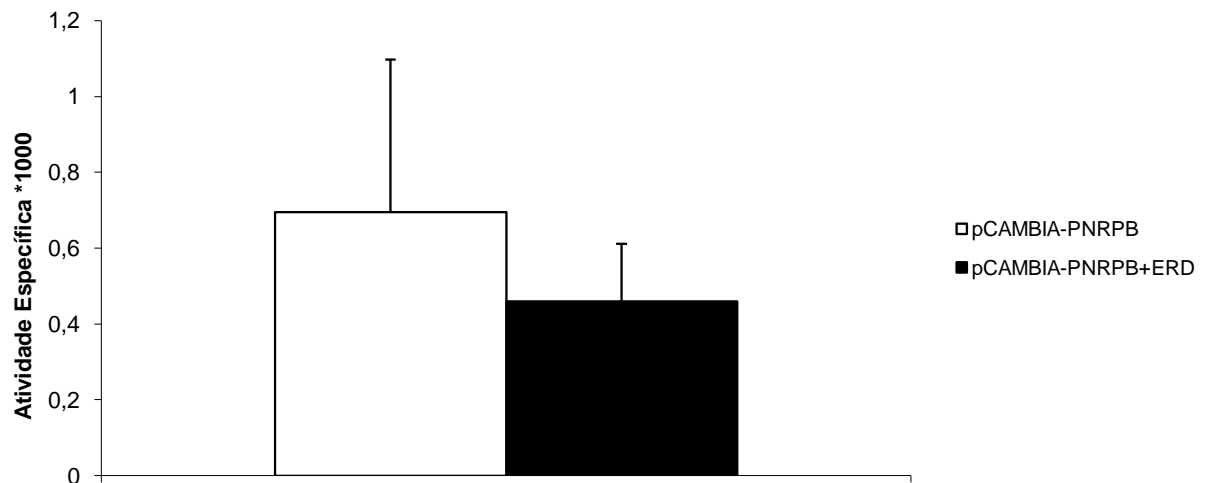


Figura 10- GmERD15 liga-se especificamente a uma sequência palindrômica de 12 pares de bases do promotor de GmNRP-B para ativar a transcrição. (A) Hairpin de 12 bp formado pela região palindrômica 511 AGCATCAGTGCT $^{-500}$ da região promotora de GmNRP-B, com o valor do ΔG de formação da estrutura indicado na parte inferior da figura. (B) Hairpin de 24 bp formado pela região palindrômica $^{-424}$ ACGATTCTATCAGCTTCTAGAACGT 399 da região promotora de GmNRP-B, com o valor do ΔG de formação da estrutura indicado na parte inferior da figura. (C) Duas sequências palindrômicas verificadas na região de 187 bp foram utilizadas como sonda para verificação da interação com GmERD15. Gel da Direita-Canaleta 1 e 2: Região de -511 a -500 dupla fita; Canaleta 3 e 4: Região de -511 a -500 fita

codificadora; Canaleta 5 e 6: Região de -511 a -500 fita não codificadora; Gel da Esquerda- Canaleta 7 e 8:Região de -424 a -400 dupla fita; Canaleta 9 e 10: Região de -424 a -400 fita codificadora; Canaleta 11 e 12: Região de -424 a -400 fita não codificadora. Os fragmentos foram biotinizados e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente com a proteína GmERD15 recombinante. A seta grande indica a formação do complexo proteína:DNA, enquanto a seta pequena indica a sonda livre. (D) Medida de atividade específica da enzima β -glucuronidase em protoplastos de soja transformados com a construção pCAMBIA1381z-PNRP-B 1000bp digerido com a enzima XbaI, e com a expressão transiente de GmERD15 pelo promotor 35S. A medida de atividade da enzima β -glucuronidase é expressa em nmol/min/ μ g de proteína.

3.5- Duas proteínas de *Arabidopsis thaliana* apresentam similaridade de sequência com GmERD15

Uma análise completa da sequência de aminoácidos desta família de proteínas (Figura 11) mostra que GmERD15 está presente em duas cópias no genoma de soja e que dentre as proteínas similares analisadas, podemos verificar que existem três grupos distintos (Figura 11), sendo que a proteína encontrada em soja constitui um grupo à parte sugerindo funções distintas da proteína ERD15 de *Arabidopsis* já estudada por Kariola e colaboradores (2006). Experimentos utilizando a fusão transcricional da proteína ERD15 de *Arabidopsis* com o domínio de ligação ao DNA do transfator de leveduras GAL4 mostraram que a construção foi capaz de transativar em os genes repórteres *HIS3* e *LACZ* (Figura 12A e B). Estes resultados indicam que a proteína descrita por Kariola e colaboradores não apresenta um domínio de transativação, ou que este domínio não é ativo, diferente de sua ortóloga de soja, que apresenta forte transativação no sistema de leveduras (Alves, 2010). Da mesma forma, não foi verificada a ativação dos genes repórteres em mutantes de levedura contendo a fusão transcricional de ERD15 de *Arabidopsis* com o domínio de ativação de GAL4, o que mostra que esta proteína não reconhece ou não possui um domínio de ligação ao DNA (Figura 12C e D).

Recentemente, Ziaf e colaboradores (2011) descreveram uma proteína ERD15 de *Solanum pennelli* com 98% de similaridade com ERD15 de *Solanum lycopersicum*, que pertence ao mesmo grupo de ERD15 descrita por Kariola, indicando possivelmente uma função semelhante entre estas ortólogas. Porém, a localização nuclear *in planta* bem definida de ERD15 de *S. pennelli*, bem como a aumentada tolerância a frio de plantas superexpressando esta proteína (Ziaf et al 2011), mostra uma possível diversidade funcional entre estas proteínas de mesmo agrupamento

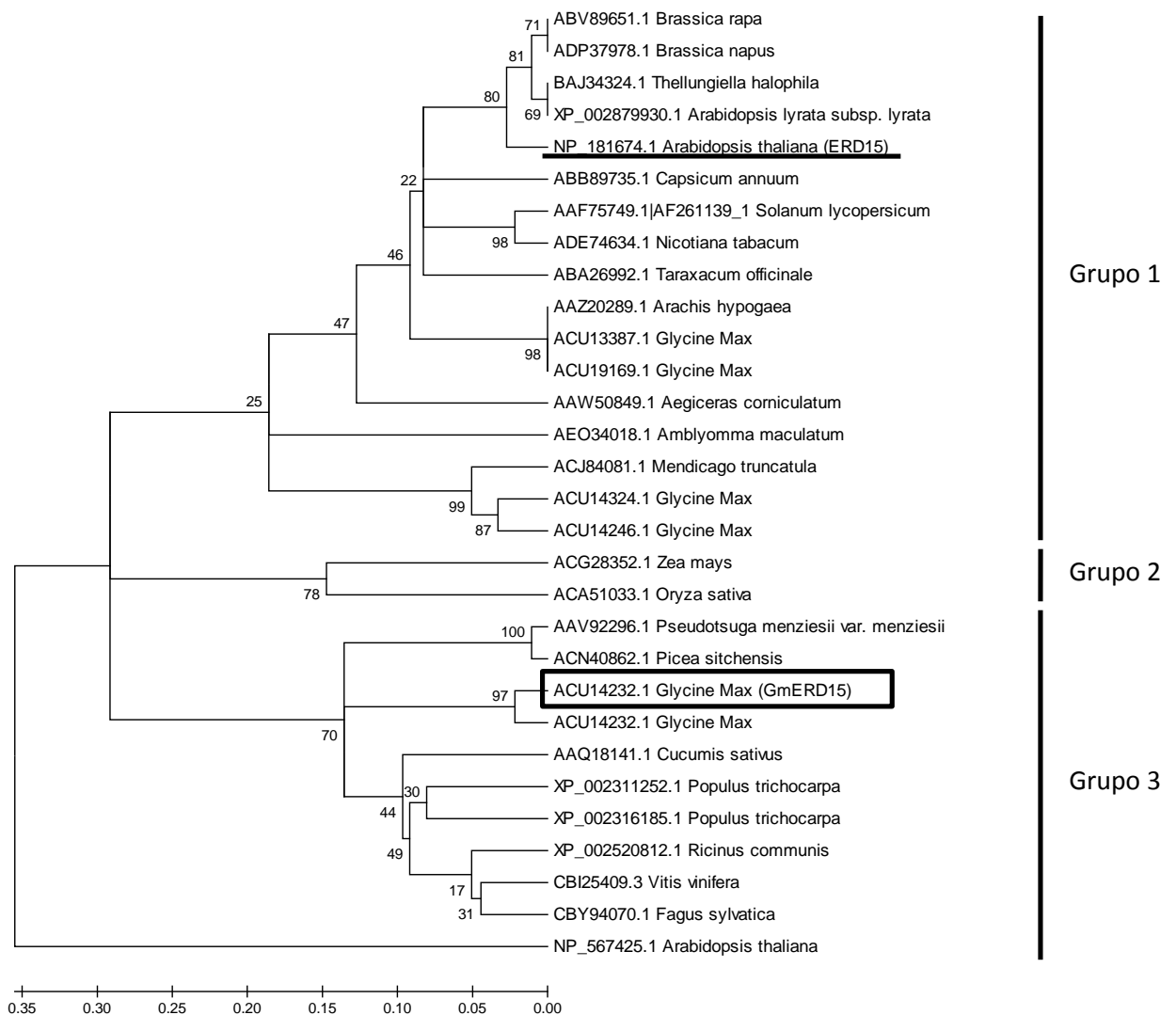
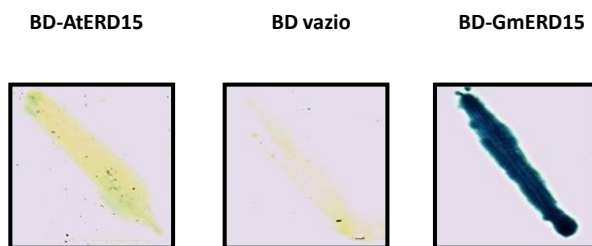
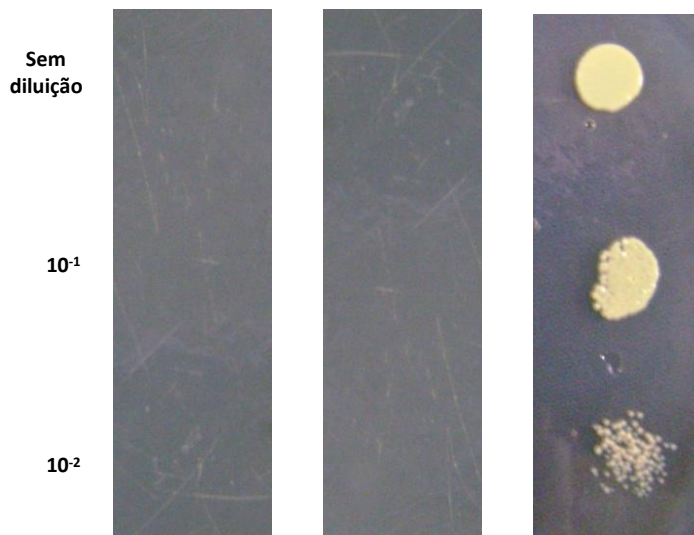


Figura 11- Dendrograma de proteínas homólogas a GmERD15 em plantas. O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando-se o programa ClustalW, e o dendrograma foi construído utilizando o programa MEGA5, pelo método de UPGMA (números nos nós indicam os valores de bootstrap). O homólogo de ERD15 descrito por Kariola et al (2006) é sublinhado, enquanto que GmERD15 é indicado por um retângulo. Os números de acesso do NCBI são indicados para cada homólogo.

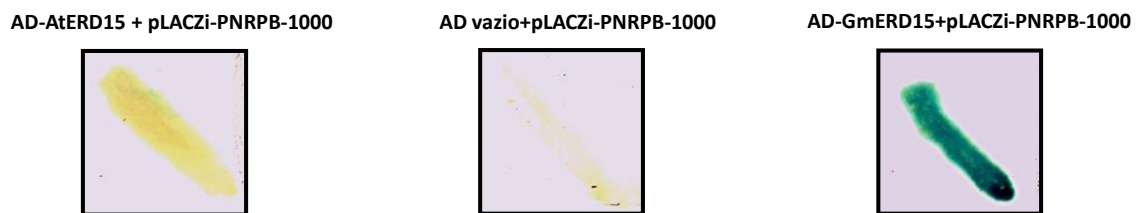
A



B



C



D

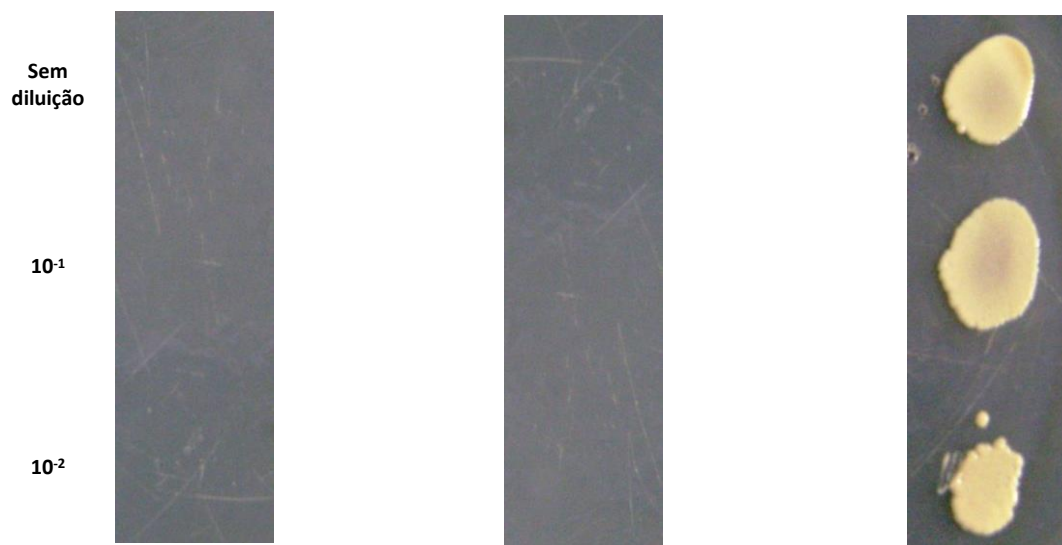


Figura 12- AtERD15 (Kariola et al.,2006) não liga-se ao promotor de GmNRP-B e também não possui atividade de transativação em leveduras. (A) BD-AtERD15 não apresentou ativação significativa do gene de β -galactosidase, em comparação com o controle BD vazio e BD-GmERD15, que ativa fortemente a expressão de β -galactosidase. (B) BD-AtERD15 não apresentou prototrofia significativa em meio sem histidina, em comparação com o controle BD vazio e BD-GmERD15, que apresenta notável prototrofia em meio deficiente em histidina. (C) AD-AtERD15 não apresentou ativação significativa da expressão do gene de β -galactosidase, sob controle do promotor de GmNRP-B-1000bp, em comparação com o controle AD vazio e AD-GmERD15, que ativa fortemente a expressão de β -galactosidase sob controle deste promotor. (D) AD-AtERD15 + pLACZi-Promotor de GmNRP-B-1000bp não apresentou prototrofia significativa em meio sem histidina, em comparação com o controle AD vazio+pLACZi-Promotor de GmNRP-B-1000bp e AD-GmERD15+pLACZi-Promotor de GmNRP-B-1000bp , que apresenta notável prototrofia em meio deficiente em histidina. Em B e D estão indicados do lado esquerdo da figura as diluições da OD600 inicial de 1,0 dos mutantes de leveduras.

Posteriormente nós identificamos a existência de uma proteína de *Arabidopsis* pertencente ao mesmo grupo de GmERD15 (NP_567425.1, ou AT4G14270 pelo número de acesso do TAIR-www.arabidopsis.org/), o que indicava uma possível similaridade funcional em relação a GmERD15. Para verificar esta hipótese, foi feito um ensaio de transativação com leveduras contendo a fusão transcricional da proteína AT4G14270 de *Arabidopsis* com o domínio de ligação ao DNA de GAL4, bem como um ensaio de mono-híbrido de leveduras utilizando o promotor de 1000 bp de GmNRP-B em leveduras contendo a fusão transcricional da proteína AT4G14270 de *Arabidopsis* com o domínio de ativação de GAL4 (Figura 13). A construção apresentou transativação significativa em ambos os experimentos, apesar de em menor intensidade em relação a GmERD15 (Alves 2010) em levedura, utilizando o gene repórter *LACZ* (Figura 13). Estes resultados indicam que a proteína AT4G14270 pode ter função similar a GmERD15 em *Arabidopsis*, o que não foi verificado com relação a proteína ERD15 estudada por Kariola et al (2006).

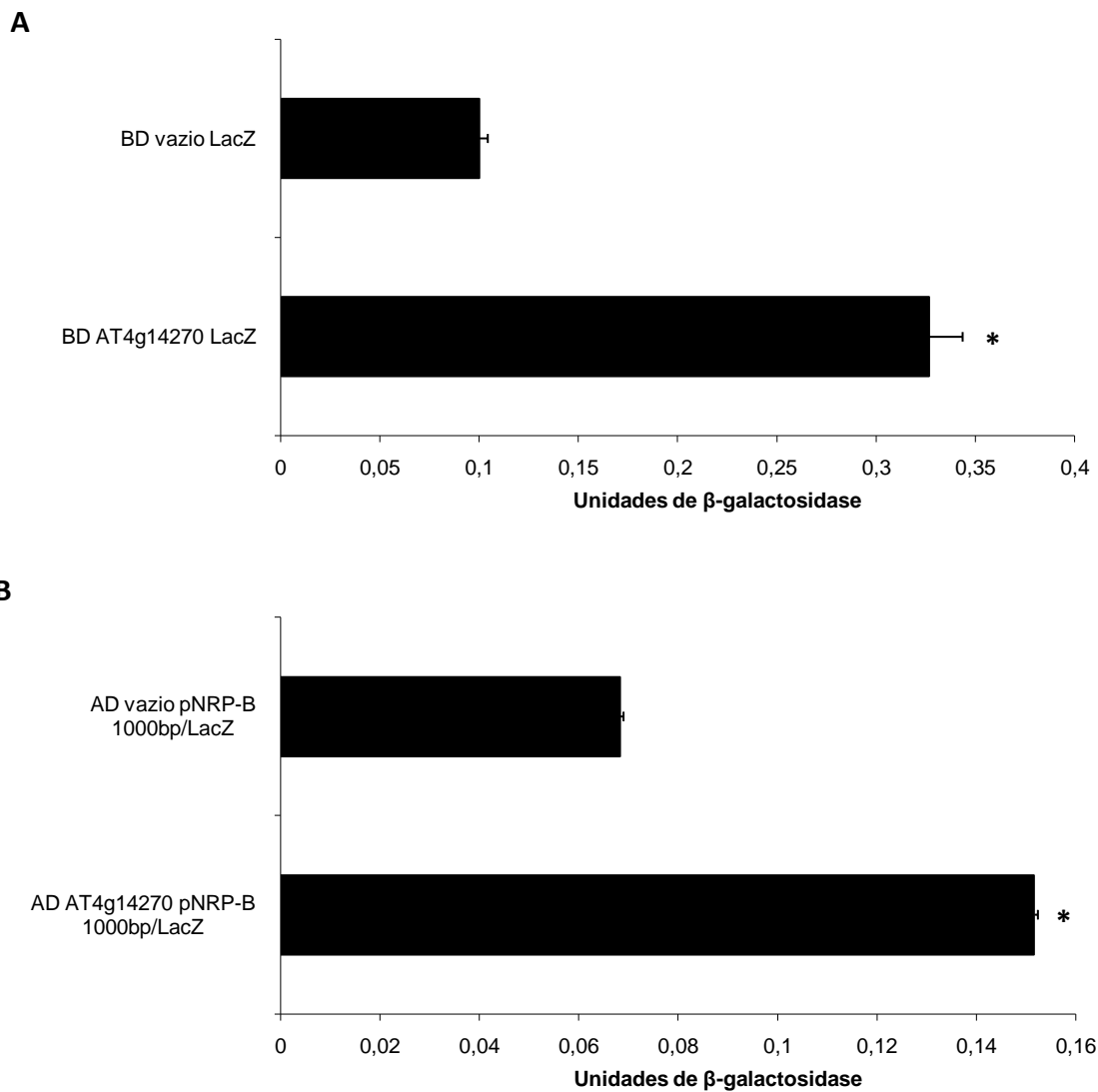


Figura 13- Uma proteína homóloga a GmERD15 (AT4G14270), apresenta atividades similares a GmERD15. (A) BD-AT4G14270 apresentou ativação significativa do gene de β -galactosidase, em comparação com o controle BD vazio. (B) AD-AT4G14270 apresentou ativação significativa da expressão do gene de β -galactosidase, sob controle do promotor de GmNRP-B-1000bp, em comparação com o controle AD vazio. A atividade da enzima β -galactosidase é expressa em unidades de β -galactosidase, e as barras finas indicam o desvio padrão de n=3 amostras biológicas. Os asteriscos indicam que os valores médios de atividade β -galactosidase diferem significativamente ao nível de significância de 5%.

3.6- O motivo ssDNA-binding transcriptional regulator de GmERD15 é um possível domínio de transativação funcional em GmERD15

Foi constatado que GmERD15 é um fator de transcrição que liga-se ao promotor de GmNRP-B *in vivo* e *in vitro*. Como descrito anteriormente (Alves 2010), GmERD15 não contém nenhum domínio típico de transfatores conhecido, sendo a única exceção a presença de uma sequência conservada de 13 aminoácidos na posição 71 a 83 (DEDEKERKEgKEv), representando um possível motivo do tipo ssDNA-binding transcriptional regulator. Este motivo é parte de um motivo tripartido derivado de vários ssDNA-binding transcriptional regulators de vários reinos distintos: os co-ativadores KELP e KIWI da proteína RNA polimerase II de *Arabidopsis* (Cormack et al., 1998); a proteína de ligação ao DNA p24 de *Solanum tuberosum* (Desveaux et al., 2000); o fator nuclear 1 tipo-C de humanos, camundongos e galinhas; a proteína de humanos poli-(C)-binding protein 4 e seus homólogos SUB1 de *S. cerevisiae*; dentre muitas outras. Estas proteínas têm demonstrado funcionar como ativadoras ou repressoras de genes (Duncan et al., 1994; Sridhar et al., 2004). Foi verificado que GmERD15 pertence a uma classe de ssDNA-binding proteins que reconhecem especificamente sequências palindrômicas em ambas as configurações dupla fita e fita simples codificadora. Este padrão é condizente com a classe de ssDNA-binding proteins.

Para verificar se o motivo ssDNA binding transcriptional regulator presente em GmERD15 possui a função de domínio de ligação ao DNA, foram construídas quimeras transcricionais entre as sequências codificadoras de GmERD15 e ERD15 de *Arabidopsis* estudada por Kariola et al (2006), a qual não possui atividade aparente de fator de transcrição. Foram construídas duas quimeras, a primeira contendo a sequência codificadora de GmERD15 com a porção codificadora do motivo ssDNA binding transcriptional regulator substituída pela região equivalente em ERD15 de *Arabidopsis*, e a segunda contendo a sequência codificadora de ERD15 de *Arabidopsis* com a porção codificadora do motivo ssDNA binding transcriptional regulator de GmERD15 substituindo a região equivalente em ERD15 de *Arabidopsis* (Figura 14A). Estas construções quiméricas foram utilizadas para verificar a capacidade de

ligação ao DNA das quimeras produzidas, a partir de ensaios de mono-híbrido de leveduras utilizando a região promotora de 50 bp contendo as sequências palindrômicas do gene *GmNRP-B*, e de retardamento em gel (Figura 14). Foi demonstrado que a quimera GmERD15 (QGmERD15) mantém a atividade de ativação do promotor de GmNRP-B mesmo após a perda do motivo ssDNA binding transcriptional regulator, enquanto que a quimera de ERD15(QAtERD15) que adquiriu o motivo não apresentou atividade de transativação (Figura 14B). Reforçando esta idéia, um ensaio de retardamento em gel foi realizado, sendo que um modesto complexo proteína:DNA pode ser observado na incubação de uma sonda de 187 bp com QGmERD15 (Figura 14C canaleta 3), enquanto que não ocorreu formação de complexo na incubação da sonda com QAtERD15 (Figura 14C canaleta 2). A especificidade da interação pode ser confirmada com a ausência de complexo proteína:DNA na presença de um excesso de competidor específico (Figura 14C canaleta 4). Estes resultados indicam que o motivo ssDNA binding transcriptional regulator presente em GmERD15 possa atuar não na ligação específica de GmERD15 ao promotor de GmNRP-B, mas possivelmente no recrutamento da maquinaria de transcrição como domínio funcional de transativação. Estes achados são coerentes com a estrutura verificada para este motivo, devido a alta presença de resíduos de aminoácidos carregados negativamente, o que dificultaria uma interação com sulcos na estrutura do DNA, ocasionando repulsão.

A



B

AtERD15	MAMVSGRRST	LNPDAPLFIP	AAVRQVEDFS	PEWWQLVTTS	TWYPDYWISQ
GmERD15	MEVIS--ASS	LNPNAPMFVP	LAYRTVEDFS	DQWWNLVHSS	PWFRDYWLRE
AtERD15	QQQGADGFYD	NGENENGGGH	IDVADLLPES	FDFDMMEDFF	DTDAAEFDQG
GmERD15	CFQ--DPQFQ	NDD-----	-----A	FDFDFDLDLQ	DEDEKERKEG
AtERD15	FDGRMYQAP	SEFGFGKNGE	MVKKSSGNRS	PRSIVEPAKY	AEKPAKWGNQ
GmERD15	KE-----	----VVSLGV	LKWRSCGG--	--GWAQAPRY	VEKAPKFVKP
AtERD15	RVAAAPRNIH	QPR			
GmERD15	KVS--PRAIH	QPR			

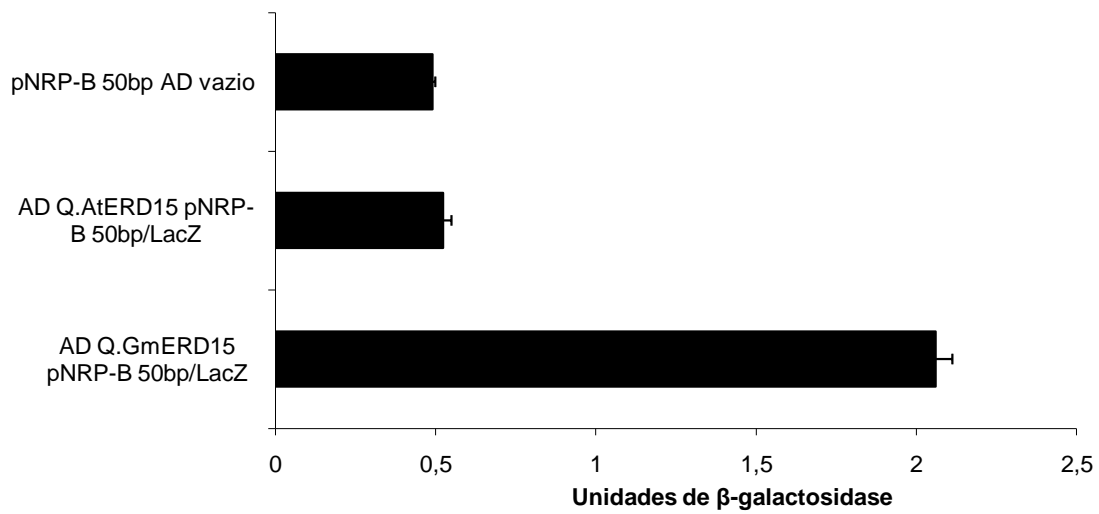
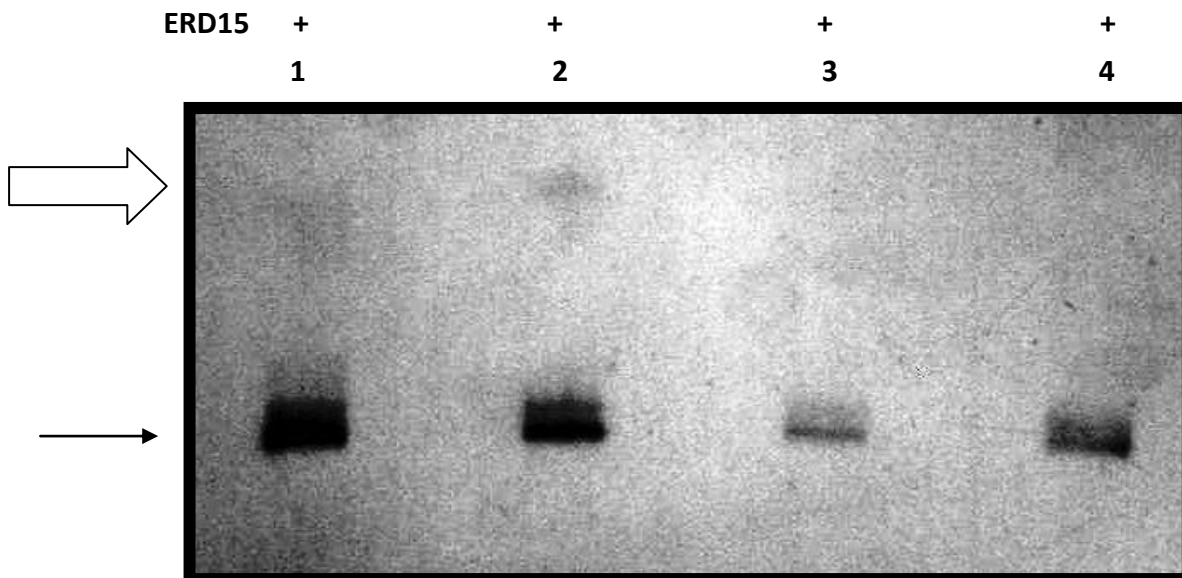
C**D**

Figura 14- O motivo ssDNA-binding transcriptional regulator não atua na ligação específica ao DNA. (A) Esquema da construção das quimeras, onde as regiões codificadoras de regiões aminoacídicas homólogas das proteínas GmERD15 e AtERD15 são trocadas entre si; N-ERD15 como sendo a porção amino-terminal da proteína ERD15 correspondente e ERD15-C a porção carboxi-terminal da proteína (B) Alinhamento das sequências de aminoácidos de GmERD15 e AtERD15 (Kariola et al.,2006), pelo programa ClustalW, onde são indicadas em vermelho as regiões correspondentes a troca de sequência de aminoácidos, onde localiza-se o motivo ssDNA-binding transcriptional regulator em GmERD15. (C) AD-QGmERD15 apresentou ativação significativa da expressão do gene de β -galactosidase, sob controle do promotor de GmNRP-B-50bp (posição -550/-500), em comparação com AD-QAtERD15 e o controle AD vazio, que não apresentaram ativação significativa. A atividade da enzima β -galactosidase é expressa em unidades de β -galactosidase, e as barras finas indicam o desvio padrão de n=3 amostras biológicas. (D) Um fragmento de 187 bp do promotor de GmNRP-B foi utilizada como sonda para incubação com as quimeras His-QGmERD15 ou His-QAtERD15 para verificação por gel de retardamento. Canaleta 1: sonda juntamente com His-QAtERD15; canaleta 2: sonda juntamente com His-QGmERD15; canaleta 3: sonda juntamente com His-QAtERD15 e 400 vezes um competidor específico (a própria sonda não marcada); canaleta 4: sonda juntamente com His-QGmERD15 e 400 vezes um competidor específico (a própria sonda não marcada). Os fragmentos foram biotinilados e incubados por 20 minutos a RT com a proteína recombinante. A seta grande indica a formação do complexo proteína:DNA, enquanto a seta pequena indica a sonda livre.

3.7- GmERD15 liga-se a outras regiões no genoma da soja

Uma análise global da ligação de GmERD15 a regiões do genoma da soja foi realizada a partir de experimentos de imunoprecipitação de cromatina, utilizando o anticorpo anti-GmERD15 e células de soja tratadas com tunicamicina. O seqüenciamento de fragmentos de DNA imunoprecipitados levou a identificação de possíveis genes controlados por GmERD15 (Tabela 3). Foram identificadas regiões do genoma upstream a genes de funções diversas, como genes relacionados a GmNRP-B (KELCH related proteins), relacionados a via de biossíntese do fitohormônio jasmonato (SAM related proteins), e que codificam cinases, como serino-treonino cinases e cinases de regulação de ciclo celular (CDC2 related kinases). Estas regiões foram avaliadas com relação a frequência de aparecimento no seqüenciamento, locus do gene upstream próximo a região identificada, e identidade do gene downstream próximo a região identificada (Tabela 3).

Tabela 3- Identificação de regiões do genoma de possível ligação de GmERD15. Fragmentos de DNA foram imunoprecipitados, amplificados e seqüenciados, sendo o resultado do seqüenciamento submetido a análise no banco de dados do Phytozome (www.phytozome.net/soybean), obtendo-se dados de locus, região do genoma, e value, seqüência e frequência de aparecimento.

Identidade do gene alvo	Locus	Região do Genoma	E value	Seqüência do Genoma com Match	Número de vezes verificada no seqüenciamento
Cdc2-related protein kinase	Glyma06g17460	>Gm06:13817430..13817483	3.8e-9	AAAAATGAAAACAAAAAA ATAAAAACAAAAA TACAAACCAAACACACC	10
Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	Glyma15g39090	>Gm15:45664329..45664403	1.3e-8	GGGTGTGTTGGTTATAT TTTTATTTATGTTATTATT TTTTGTTTTATTTTTGAA AATTATTTTATTTTT	3
SERINE-THREONINE PROTEIN KINASE, PLANT-TYPE	Glyma11g18310	>Gm11:14967280..14967343	4.28e-2	TTGGGTGTGTTGGTTAG AATAGATAATTAATAGA GTAATAGAAATA	3
Kelch motif; KELCH REPEAT DOMAIN	Glyma20g22880	>Gm20:32811744..32811784	2.67e-3	TTTTCTTCTTCTTTTTTT TTTTATTGGAAAACACCC AAA	2
KELCH-RELATED PROTEINS	Glyma10g02940	>Gm10:2126098..2126132	1.1e-7	GGGTGTGTTGGTTGTAT TTTCATTTCTGTTTT	1
WRKY DNA - binding domain	Glyma01g06550	>Gm01:6814848..6814904	1.93e-2	AAAAAATGAAAACAAAA AATAAAAATAGAAAATA AAATACAAACCAAACACA CCC	1
KELCH-RELATED PROTEINS; F-box domain	Glyma13g43730	>Gm13:43338907..43338945	9.08e-2	ATTAGTCAAATTTTTGAT AAAAAATAATTATAACA AA	1
SAM dependent carboxyl methyltransferase	Glyma03g16360	>Gm03:20754752..20754780	2.43e-3	TTTTTTTTTATTGTACCAA ACACCCCAA	2
DNAJ/HSP40 heat shock protein binding	Glyma14g31850	>Gm14:38837264..38837307	2.67e-3	TTTTGTTTCTTTTTTTTT TTTTGTCTTAACCCAAA CACCC	4

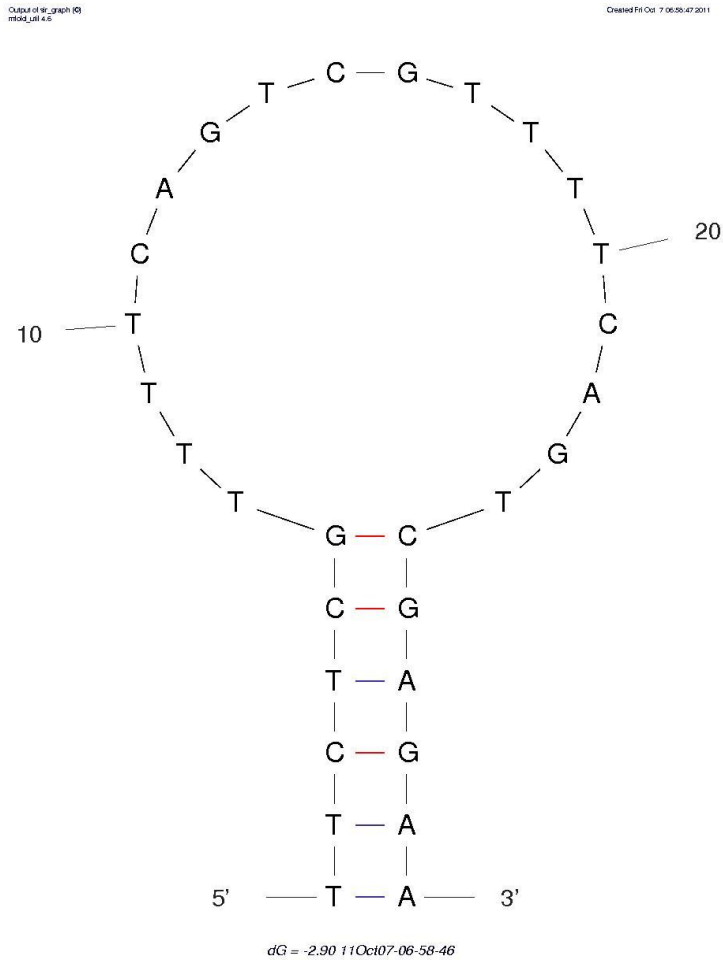
Para avaliar e validar a ligação de GmERD15 às regiões identificadas pelo seqüenciamento, foi escolhido, inicialmente, um único candidato a ligação específica de GmERD15 para validação *in vitro*, por ensaio de retardamento em gel. Foi tomada a partir da análise da varredura a região próxima do gene que codifica para uma cinase relacionada com a regulação do ciclo celular (CDC2-related protein kinase), por apresentar a região com aparecimento mais frequente no experimento. Para esta análise foi clonada a sequência do genoma que correspondeu à identificada pelo seqüenciamento e regiões de aproximadamente 500 bp *upstream* e *downstream* a esta sequência, visando abranger uma faixa possível de ligação de GmERD15 a esta região do genoma, totalizando uma região de 1000 bp (Figura 15A). A análise desta sequência buscando possíveis sítios de ligação de GmERD15 revelou a presença de sequências palindrômicas *upstream* à sequência identificada no seqüenciamento (Figura 15A). Uma análise *in silico* desta sequência palindrômica mostrou que esta era capaz de formar estavelmente uma estrutura de hairpin (Figura 15B), bem como apresenta na estrutura que forma a alça de fita simples uma sequência TCAG, também encontrada na sequência palindrômica a qual GmERD15 se liga na região promotora de GmNRP-B. Para a confirmação da ligação de GmERD15 a esta região do genoma, foi feita uma clivagem com a Enzima EcoRI originando dois fragmentos um de 463 bp e outro de 537 bp. Estes dois fragmentos foram utilizados como sonda em um ensaio de retardamento em gel, sendo o resultado apresentado na figura 15C. Um complexo proteína/DNA foi formado estavelmente na presença da sonda de 463 bp e da proteína GmERD15 (figura 15C canaleta 4), enquanto que não ocorre formação estável de complexos proteína/DNA entre GmERD15 e o fragmento de 537 bp (Figura 15C canaleta 2). Interessantemente, a sequência palindrômica encontra-se neste fragmento de 463 bp, indicando que possivelmente esta sequência possa atuar como sítio de ligação de GmERD15. Uma possível explicação desta região do DNA, próxima ao gene que codifica uma cinase que regula o ciclo celular em soja, ser um provável alvo para a ligação de GmERD15, seja a necessidade da atenuação do processo de divisão celular mediante a indução por estresses diversos. GmERD15 poderia

então atuar na regulação transcricional negativa deste gene para determinar este quadro de atenuação, atuando por exemplo, na modulação de uma via de salvamento da célula, uma hipótese a ser testada posteriormente. Estes achados indicam a presença de novos genes regulados por GmERD15.

A

```
>Gm06:13816957..13817956
GGAGGCCCGAAAACCCGTCATTGAATCCTTACCCACAAATTTTAATTTAGAACGAAAACGTTTGACTGC
ATACAAGTTTCCTAACAAAAAAAGGTGTATACAAGCTGGGTACTTAAATGCAATTGCTCCAGTTATTAA
CATGTTAGGAGTGTTTGGTTTTGTTAGTTGTTTTCTGTTTTTCAATTTTCACTTAAAACAGAAAACGGTGAT
GAAATGTGTTTGATTGAATTTCTGAAAATATTTTTAGTGAAAATGAAAATAATAAA[TTCTCG]TTTTCAG
TCGTTTTCAGT[CGAGAA]CAGAAAATTTATTTCAATTTAAATGAAATTACGGTGACAATGAATGTAATTTT
AAACAAATCTAAAAATACAAAAAGACAACAAAGTCAATATATCATAAAATTTTTCAGTATTTTTATTTTCATG
AAAATCGAAAACAAGAAATCAAAATCATAACATATTTTTTGAATTC[AAATCTTTTAAAAATGAAAACAAAAA
AATAAAAACAAAAAAAAATACAAACCAAAACACACC]TTAATTTTCTTATCTCCATGCTTTATTTAAGAA
TGGTCCTTGATATCTCTGAAAGAATGCTCGTAACTTGTAGAAATAACTTTTATTTATTTTGTAGCATTG
GGTTTGGAATTTAAATTAGAATTGTGTGCTGCAATTTATGCATTGTAAGTAAGATTTTCTTTTATGTTT
TGTAGGGAGAGTAAAGTGCGTGTGTTTTCTATTTAACACCCCTCCAAATGGACGAATCAAAGTAATAA
TTTGTGCTTCTCACAAGACGGTGTGGAAAGTGTGTTCCCAAAATGAAACGTTAAGACAAACATAGCG
AAAGTCGTTTGCTTCTGATTGTGTGCATTCTTTACATATGATGGAATCCATGGTAGACAGGTGAAAATTA
TTTGTTATAAGTTCCTTTTTTTTTTTTTAATAAGATTTTCATTGGAAGACTTGGGTCATGGACTCATGGCAAT
ATGAAAAGATGAAAATGTG
```

B



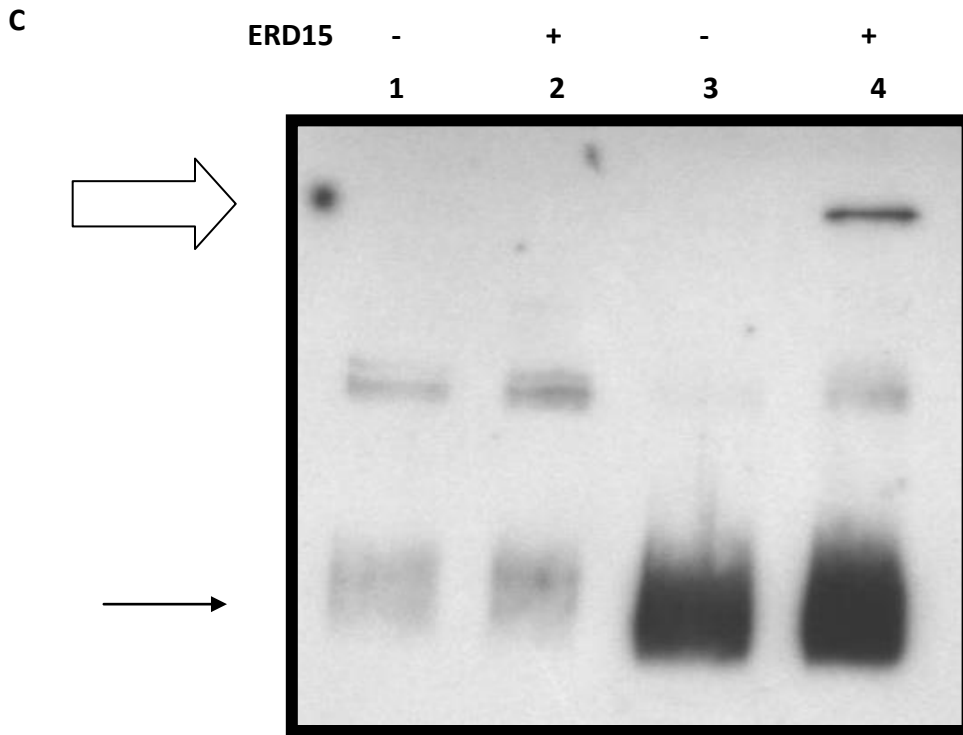


Figura 15- GmERD15 liga-se especificamente a outras regiões do genoma da soja. (A) Utilizando o banco de dados do Phytozome, foi obtido um fragmento de 1000 bp que abrange uma região identificada por sequenciamento (sequência em vermelho). Neste fragmento, foi verificada a presença de uma sequência palindrômica (733 TTCTCGTTTTTCAGTCGTTTTTCAGTCGAGAA $^{-703}$), demarcada por retângulos. Uma sequência presente na alça de fita simples, TCAG, verificada também na alça da sequência palindrômica da região promotora de GmERD15, é demarcada em azul claro. O sítio de EcoRI utilizado para divisão do fragmento é demarcado em amarelo. (B) A estrutura do hairpin formado pela sequência palindrômica presente no fragmento de 1000 bp, sendo indicado o valor de ΔG para a formação do hairpin. (C) Fragmentos de 463 bp e 537 bp da região de 1000 bp foram utilizados como sonda para incubação com His-GmERD15 para verificação por gel de retardamento. Canaleta 1: sonda de 537 bp; canaleta 2: sonda de 537 bp juntamente com His-GmERD15; canaleta 3: sonda de 463 bp; canaleta 4: sonda de 463bp juntamente com His-GmERD15. Os fragmentos foram biotinilados e incubados por 20 minutos a RT com a proteína recombinante. A seta grande indica a formação do complexo proteína:DNA, enquanto a seta pequena indica a sonda livre.

4- Conclusão

Como conclusão, estes dados indicam que GmERD15 é um novo fator de transcrição que se liga ao promotor e ativa a transcrição de GmNRP-B, um gene induzido por estresse osmótico e do retículo. Apesar de GmERD15 conter um motivo conservado de ssDNA binding transcriptional regulator, a falta de dois motivos adicionais que compõem o domínio completo faz com que a estrutura tradicional deste domínio possa não ser gerada (Desveaux et al.,2002), sendo provavelmente funcional com sua multimerização, como foi evidenciado (Figura 4).

Foi visto também que este motivo pode apresentar uma possível função de transativação, a ser confirmada, e não de ligação ao DNA, devido a sua composição aminoacídica altamente carregada negativamente (Figura 14). GmERD15, portanto, define uma nova classe de fatores de transcrição específicos de planta que podem compor novos membros dentro da família de proteínas Early Responsive to Dehydration, com funções distintas de proteínas da mesma família, como visto para ERD15 de Arabidopsis, estudada por Kariola et al (2006), mas com possivelmente função similar a AT4G14270, um dado a ser confirmado posteriormente. É proposto que GmERD15 atue como um componente upstream da via de sinalização mediada por proteínas NRPs e conecta a resposta a estresse no retículo a resposta a estresse osmótico, podendo desencadear um sinal de morte celular programada. Ambos GmERD15 e GmNRP-B são coordenadamente induzidos por estresses abióticos e bióticos, o que mostra que a via mediada por proteínas NRPs pode representar uma via de resposta geral a múltiplos estresses.

ERD15 de Arabidopsis é funcionalmente caracterizada como um regulador comum da resposta a ABA e ácido salicílico (SA) (Kariola et al.,2006). A superexpressão de ERD15 reduziu a sensibilidade a ABA, com as plantas transgênicas sendo menos tolerantes a seca e com menor tolerância a congelamento em resposta a este hormônio. Contrastando com este quadro, a perda de função de ERD15 causou uma hipersensibilidade a ABA e plantas silenciadas mostraram tolerância aumentada a seca e congelamento. O efeito negativo de ERD15 na sinalização por ABA aumenta a via de defesa mediada

por SA, onde a superexpressão de ERD15 foi associada com uma maior resistência ao patógeno *Erwinia carotovora* e uma expressão aumentada de genes marcadores de resistência sistêmica adquirida. Estes resultados em conjunto sugerem que ERD15 de *Arabidopsis* atua como um componente compartilhado das respostas a ABA e SA (Figura 16B). Apesar de ERD15 de *Arabidopsis* e GmERD15 de soja fazerem parte de grupos diferentes dentro dos genes ERD15 analisados (Figura 11), e apresentarem atividades bioquímicas diferentes (Figura 12), estas proteínas tem em comum o papel de conectores de vias de sinalização (Figura 16; Alves *et al.*, 2011). A análise de expressão de GmERD15 em resposta a tratamentos com ABA, SA e jasmonato (JA), aclimatação a frio e ferimento podem fornecer novas pistas sobre a função de GmERD15 como um conector de múltiplas vias de sinalização que podem transduzir em um sinal de morte celular programada em plantas.

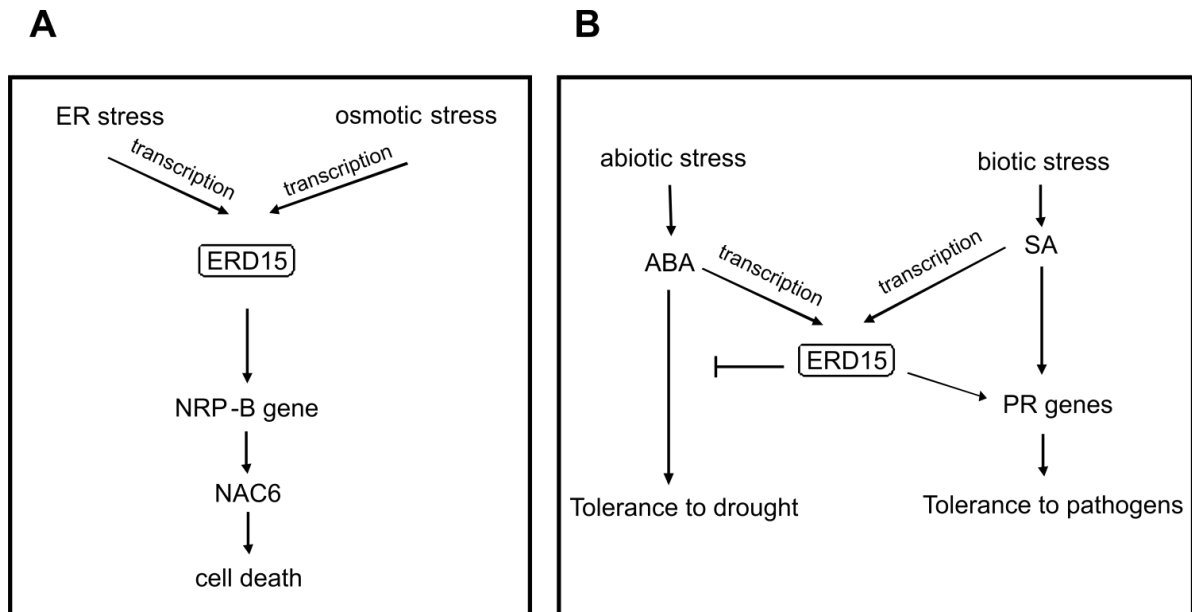


Figura 16- O papel de ERD15 como um conector de vias de sinalização em resposta a estresses. (A) GmERD15, como demonstrado neste trabalho, atua na conjunção de vias de resposta a estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático, desencadeando um sinal de morte celular programada. (B) ERD15 de *Arabidopsis* atua na conexão entre as vias de ABA e SA, atenuando a via mediada por ABA, aumentando a via de tolerância a patógenos mediada por SA. Figura gentilmente cedida por Alves e colaboradores (2011).

5- Referências bibliográficas

Albrecht, M, Lengauer, T (2004). Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochemical Biophysical Research Communications* 316: 129–138.

Alves, MS (2010). Identificação de *GmERD 15*, um novo fator de transcrição que controla a expressão do gene *GmNRP-B* em soja. Viçosa, MG. 70p. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa.

Alves MS, Fontes EP, Fietto LG (2011). EARLY RESPONSIVE to DEHYDRATION 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior* ; 6:1993 - 1996.

Amberg, D C. Burke, D J. Strathern, J N (2005). Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Bohnert HJ e Sheveleva E (1998). Plant stress adaptations-making metabolism move. *Current opinion in Plant Biology*, 1, 267-274

Bray EA (2002). Abscisic regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of Arabidopsis genome. *Plant, Cell and Environment*, 25, 153-161.

Carvalho, C.M., (2008). A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*. 55, 869–880.

Cascardo, JCM, Buzeli, RAA, Almeida, RS, Otoni, WC, Fontes, EPB (2001). Differential expression of the soybean BiP gene family. *Plant Science*, 160:273-281.

Chawla, A ,Niwa, M (2005). The unfolded protein response. *Current Biology*, 15, 22,R907-R907.

Chekanova JA, Belostotsky DA (2003). Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA*. Volume 9, 12, 1476-90

Cormack RS, Hahlbrock K, Somssich IE (1998). Isolation of putative plant transcriptional coactivators using a modified two-hybrid system incorporating a GFP reporter gene. *Plant Journal*, volume 14, 6, 685-92.

Costa, M.D.L.; Reis, P.A.B.; Valente, M.A.S.; Irsigler, A.S.T.; Carvalho, C.M.; Loureiro, M.E.; Aragão, F.J.L.; Boston, R.S.; Fietto, L.G. & Fontes, E.P.B. (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plantspecific asparagine-rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 20209–20219, ISSN 0021-9258.

Dadalto, SP (2010). Expressão heteróloga de proteína GmERD15 em sistema bacteriano e produção de anticorpos anti GmERD15. Viçosa, MG. 29p. Monografia em Bioquímica. Universidade Federal de Viçosa.

Delessert, C, Kazan, K, Wilson, IW, Van Der Straeten, D, Manners, J, Dennis, ES, Dolferus, R (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 43:745-757.

Delú-filho, N., Pirovani, C.P., Pedra, J.H.F., Matrangolo, F.S.V., Macêdo, J.N.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B (2000). A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in transgenic tobacco suspension-cultured cells. *Plant Physiol Biochem* 38, 353-361.

Desveaux, D, Allard, J, Brisson, N, Sygusch, J (2002). A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nature structural biology*, volume 9, número 7.

Desveaux, D, Després, C, Joyeux, A, Subramaniam, R, Brisson, N (2000). PBF-2 Is a Novel Single-Stranded DNA Binding Factor Implicated in *PR-10* Gene Activation in Potato. *The Plant Cell*, 12, 1477–1489.

Dunaeva, M. and Adamska, I. (2001). Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur. J. Biochem.* 268: 5521–5529.

Duncan, R., Bazar, L., Michelotti, G., Tomonaga, T., Krutzsch, H., Avignan, M., and Levens, D (1994). A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* 8, 465–480.

FARIA, JAQA (2009). Caracterização funcional do fator de transcrição *GmNAC6* de soja (*Glycine max*) e padrão de expressão de genes *GmNACs* em resposta a estímulos bióticos. Viçosa, MG. 114p. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa.

Farooq, M., S.M.A. Basra, A. Wahid, Z.A. Cheema, M.A. Cheema and A. Khaliq (2008). Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agron. Crop Sci*, 194: 325–333

Finer, JJ, Nagasawa, A (1988). Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15, 125–136.

Freitas, RL (2007). identificação de regiões no promotor do gene *SBP2* (*SUCROSE BINDING PROTEIN*) de soja que conferem expressão espacial específica. Viçosa, MG 50p. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa.

Fujita M, Mizukado S, Fujita Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Matsui M, Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K. (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 250-257.

H. Gao, F. Brandizzi, C. Benning, R. M. Larkin (2008) A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 16398-16403.

Irsigler, A.S.T.; Costa, M.D.L.; Zhang, P.; Reis, P.A.B.; Dewey, R.E.; Boston, R.S. & Fontes, E.P.B. (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics*, 8, 431, ISSN 1471-2164

Jaleel, C.A., P. Manivannan, G.M.A. Lakshmanan, M. Gomathinayagam and R. Panneerselvam (2008). Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 61: 298–303

Kariola, T., Brader, G., Helenius, E., Li, J., Heino, P. and Palva, E.T. (2006). EARLY RESPONSIVE to DEHYDRATION 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 142: 1559–1573.

Kim SY, Chung H, Thomas TL (1997). Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Volume 11, 6, 1237-1251.*

Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica Biophysica Acta* 1370:187–191

Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993). Characterization of two cDNAs (ERD11 and ERD13) for dehydration-inducible genes that encode putative glutathione S-transferases in *Arabidopsis thaliana* L. *FEBS Letters* 335:189–192.

Kiyosue, T., Yamaguchi–Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994a). Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Mol. Biol.* 25: 791–798.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994b). Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 35: 225–231.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994c) ERD15, a cDNA for a dehydration-inducible gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology.* 106: 1707.

LANNA, A. C (2002). Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja. Viçosa, MG, 84p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa.

Lee SC, Choi HW, Hwang IS, Choi Du S, Hwang BK. (2006) Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, CAbZIP1, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta* 224: 1209-1225.

Li, S., Xu, C., Yang, Y. and Xia, G. (2010). Functional analysis of TaDi19A, a salt responsive gene in wheat. *Plant Cell Environ.* 33: 117–129.

Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH. (2007a) Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J* 51:897-909.

Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH. (2007b) An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell* 19: 4111-4119.

Liu, J.-X. & Howell, S.H. (2010). Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants. *Plant Cell*, 22, 1–13, ISSN 1040-4651.

Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline

and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. *Plant Physiology* 118:1233–1241.

Park, M.Y., Chung, M.S., Koh, H.S., Lee, D.J., Ahn, S.J. and Kim, C.S. (2009). Isolation and functional characterization of the Arabidopsis salt-tolerance 32 (AtSAT32) gene associated with salt tolerance and ABA signaling. *Physiol. Plant.* 135: 426–435.

Pinheiro, GL, Marques, CS, Costa, MDBL, Reis, PAB, Alves, MS, Carvalho, CM, Fietto, LG, Fontes, EPB, (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444 10–23.

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

Schulze ED Whole (1986). Plant responses to drought . *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 127-141

Smirnov N (1998). Plant resistance to environmental stress . *Current opinion in Biotechnology*, 9, 214-219.

Soitamo AJ, Piippo M, Allahverdiyeva Y, Battchikova N, Aro E (2008) Light has a specific role in modulating Arabidopsis gene expression at low temperature. *BMC Plant Biology* 8:13. doi: 10.1186/1471-2229-8-13.

Sridhar, V.V., Surendrarao, A., Gonzalez, D., Conlan, R.S., Liu, Z (2004). Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for Arabidopsis flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11494–11499.

Takahashi Y, Uehara Y, Berberich T, Ito A, Saitoh H, Miyazaki A, Terauchi R, Kusano T. (2004) A subset of hypersensitive response marker genes, including HSR203J, is the downstream target of a spermine signal transduction pathway in tobacco. *Plant J* 40: 586-595.

Tateda C, Ozaki R, Onodera Y, Takahashi Y, Yamaguchi K, Berberich T, Koizumi N, Kusano T. (2008) NtbZIP60, an endoplasmic reticulum-localized transcription factor, plays a role in the defense response against bacterial pathogens in *Nicotiana tabacum*. *J Plant Res* 121: 603-611.

Vliet, V e Verrijzer, P. Bending of DNA by Transcription Factors (1993). *BioEssays*, vol. 15, 1, 25-31.

Wang, X, Grumet, R (2004). Identification and characterization of proteins that interact with the carboxy terminus of poly(A)-binding protein and inhibit translation in vitro. *Plant Molecular Biology* 54: 85–98.

Xiong, L., Lee, B.H., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. and Zhu, J.K. (2001). FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15: 1971–1984.

Zhang, X.L., Zhang, Z.J., Chen, J., Chen, Q., Wang, X.C. and Huang, R.F. (2005). Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta* 222: 494–501.

Ziaf K., Loukehaich R., Gong P., Liu H., Han Q., Wang T., Li H., Ye Z. (2011). A multiple stress responsive gene *ERD15* from *Solanum pennellii* confers stress tolerance in tobacco, *Plant Cell Physiology* 52(6):1055-1067.

**CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2*
RESPONSIVOS À INFECÇÃO POR *Phakopsora pachyrhizi*, AGENTE
CAUSADOR DA FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA**

1. Revisão de literatura

Phakopsora pachyrhizi é um fungo biotrófico fitopatogênico obrigatório que causa a doença comumente conhecida como ferrugem asiática da soja. *Phakopsora pachyrhizi* primariamente coloniza o tecido foliar e sob condições ambientais favoráveis a infecção pode resultar em perdas de até 80% de uma lavoura (Patil et al., 1997). Seis *loci* em *Glycine max*, identificados até o momento, conferem imunidade [*Rpp1* (CHENG e CHAN 1968)], ou resistência parcial [*Rpp2*, (HIDAYAT e SOMAATMADJA 1977), *Rpp3* (BROMFIELD e HARTWIG 1980), *Rpp4* (HARTWIG 1986), *Rpp5* (Garcia et al. 2008) e *Rpp6* (Li et al., 2012)] ao patógeno, sendo responsáveis pela ausência de lesão ou produção de lesões *do tipo* castanho-avermelhada (lesões do tipo reddish-brown- RB), que são facilmente visíveis em ambas as faces da folha (Bromfield e Hartwig, 1980). Tais lesões apresentam pouca ou nenhuma esporulação do fungo, e, conseqüentemente, diminuem a capacidade de disseminação da doença (Monteros et al., 2007; Garcia et al., 2008). Entretanto, nenhum destes genes foi clonado até o presente momento (Bromfield, 1984; Bromfield and Hartwig, 1980; Hartwig and Bromfield, 1983; Hyten et al., 2007; Morceli et al., 2008).

O fenótipo de resistência em plantas contra *P. pachyrhizi* sempre tem sido superado na natureza devido a elevada diversidade genética do fungo (Bromfield, 1984), apesar de os genótipos *Rpp2* e *Rpp4* terem sido estáveis no Brasil desde a sua introdução e por mais de 20 anos na Ásia (Hartman et al., 2005). Este cenário de superação da resistência pelo fungo é denominado de síndrome 'boom and bust', onde ocorre a superação do fenótipo de resistência da planta hospedeira pelo patógeno.

Assim como é verificado para outros patógenos da soja, até o presente momento nenhum cultivar de soja, comercial ou resistente, pode resistir a todas as raças de *P. pachyrhizi*, portanto a prática de manejo mais utilizada para o controle da ferrugem tem sido a utilização de fungicidas para controlar a doença (Miles et al., 2007). Devido ao seu impacto econômico e ecológico,

tratamentos com fungicidas são altamente criticados, além disso, a emergente resistência do fungo a certos fungicidas é esperada (Miles et al., 2007).

O potencial destrutivo de *P. pachyrhizi* juntamente com sua recente introdução nos principais países produtores de soja do hemisfério ocidental gerou grande interesse no entendimento das interações moleculares de *P. pachyrhizi* com a soja e com outras plantas não hospedeiras (Hoefle et al., 2009; Goellner et al., 2010), visando identificar novos genes de resistência ao fungo, bem como a obtenção de variedades com maior resistência ou imunidade.

Plantas respondem a ataques de patógenos ativando uma grande variedade de mecanismos de defesa, incluindo a resposta de hipersensibilidade (HR), a indução de genes que codificam proteínas relacionadas a patógenos (PR), a produção de compostos antimicrobianos denominados fitoalexinas, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e o reforço da parede celular (Reymond and Farmer 1998; Kim et al., 2012).

Estes complexos mecanismos de resposta são finamente regulados por um grande número de genes que codificam proteínas regulatórias. Um exemplo típico de proteínas regulatórias são os fatores de transcrição (Huang et al., 2005; Nakashima K e Yamaguchi-Shinozaki 2006; Umezawa et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki 2005; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki 2006). Fatores de transcrição respondem a estímulos ambientais através de uma cascata de sinalização que podem aumentar a sua concentração ou a sua atividade. Em consequência, estes fatores regulam a expressão de genes de uma via de resposta interagindo com os promotores dos genes alvo. Entre os fatores de transcrição mais estudados de plantas encontra-se a família de fatores contendo o domínio zipper de leucina básico (bZIP). Fatores de transcrição da família bZIP foram intensamente estudados com relação a regulação de genes de armazenamento em sementes (Albani et al. 1997; Chern et al. 1996), fotomorfogênese (Oyama et al. 1997), desenvolvimento foliar (Yin et al. 1997), desenvolvimento floral (Chuang et al. 1999), resposta a ácido abscísico (ABA) (Nakagawa et al. 1996), e biossíntese de giberilinas (Fukazawa et al. 2000).

Entretanto, entre as várias funções das proteínas bZIP em plantas, a defesa contra patógenos é uma das menos estudadas (Singh *et al.*, 2002; Jakoby *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2013).

Um exemplo clássico são os fatores TGA (TGACGTCA *cis*-element-binding proteins) (Singh *et al.*, 2002) que atuam como reguladores da sinalização por ácido salicílico (SA) durante a resposta de defesa em plantas. Trabalhos demonstraram que algumas proteínas TGA interagem com uma proteína com domínio ankyrin repeat denominada non-expresser of Pathogen Related (PR) genes (NPR1), onde é um componente importante da sinalização por SA em respostas de defesa (Singh *et al.*, 2002; Jakoby *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2013).

Em plantas com valor agrônomico, um dos primeiros bZIPs estudados foi a proteína G/HBF-1 de soja, onde foi demonstrado que este fator liga-se a *cis*-elementos responsivos a elicitores de patógenos denominados motivos G-box e H-box. Estes *cis*-elementos foram encontrados no promotor do gene *chs15*, o qual codifica uma Chalcona sintase, enzima chave na via de biossíntese de flavonoides em plantas (Dröge-Laser *et al.*, 1997), que está envolvida na síntese de diterpenoides e flavonoides durante a resposta a patógenos (Dröge-Laser *et al.*, 1997). Foi visto que a expressão de *G/HBF-1* não é alterada durante a indução da transcrição de *chs15*, porém esta proteína é rapidamente fosforilada em células de soja elicítadas, indicando um controle pós-traducional deste transfator (Dröge-Laser *et al.*, 1997). Em uva, um membro bZIP, denominado VvbZIP23, foi identificado como um importante regulador de respostas a estresses e sua expressão é fortemente induzida por seca, salinidade, frio, ABA, etileno (ET), ácido jasmônico (JA), e SA (Tak *et al.*, 2012). Em pimenta foi caracterizado um novo transfator denominado PPI1, o qual possui uma estrutura distinta de outros membros bZIPs previamente estudados (Lee *et al.*, 2002). Sua expressão é preferencialmente induzida por infecção por patógenos, e não é alterada durante a exposição aos hormônios SA e JA (Lee *et al.*, 2002).

Existem poucos exemplos que apresentam a caracterização molecular de fatores de transcrição responsivos a fungos de ferrugem. Em trigo, foi identificado um fator de transcrição da família NAC (acrônimo NAM, ATAF, CUC) TaNAC4, envolvido na defesa contra infecção por stripe rust fungus e estresses abióticos (Xia *et al.*, 2010). Com relação à família bZIP, um transfator denominado TabZIP1, foi demonstrado estar envolvido na tolerância a estresse e resposta de defesa ao mesmo stripe rust fungus (Zhang *et al.*, 2009). Estes estudos demonstram o envolvimento de reguladores transcricionais na defesa da planta contra a infecção pelo fungo causador de ferrugem.

No presente trabalho foram identificados e caracterizados quatro genes que codificam fatores de transcrição da família bZIP de soja. Os fatores tiveram sua localização subcelular e seu perfil de expressão determinado em diferentes tecidos, além das atividades de transativação e capacidade de homo e heterodimerização. Finalmente, foram examinados os possíveis papéis como reguladores de vias de defesa contra patógenos em plantas utilizando análise filogenética, análise de expressão em resposta ao tratamento com SA e MeJA, e em resposta à infecção por *P. pachyrhizi*.

2–Material e métodos

2.1 - Análise filogenética da família de proteínas bZIPs de soja

Análises filogenéticas foram geradas por inferência baysiana (BI) e máxima verossimilhança (ML), utilizando os programas BEAST v1.7.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) e GARLI 2.0 (Zwickl, 2006), respectivamente.

Um total de 148 proteínas foram anotadas como sequências de proteínas bZIPs de soja (*Glycine max*) nos bancos de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), que possuíam uma assinatura exata de domínios bZIP, foram utilizadas na construção do agrupamento hierárquico de sequências para as análises filogenéticas. Adicionalmente, 10 sequências de proteínas bZIPs caracterizadas como responsivas a patógenos (ACT66299_TabZIP; AAX20030_CAbZIP1; CAA71687_GHBF1; AAL27150_BZI1; O22763_AtZIP10; AAN61914_PPI1; BAG24402_SBZ1; NP_001234596_SIAREB1; P43273_TGA2; Q39234_TGA3) também foram utilizadas e incluídas nas análises. Os números de acesso de todas as sequências utilizadas estão descritos nas figuras correspondentes.

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado pelo programa MAFFT version 7 (Kato et al., 2002), e o JTT+G (Jones et al., 1992) foi calculado pelo programa ProtTest 3.2.1 (Darriba et al., 2011) como o melhor modelo de substituição de aminoácidos.

As árvores filogenéticas de inferência baysiana foram calculadas utilizando o método Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) com 5×10^7 gerações e uma frequência de amostragem de 10^4 considerando o modelo de substituição JTT+G. A convergência dos parâmetros foi analisada no programa TRACER v1.5.0 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>), e a cadeia atingiu uma distribuição estacionária após 5×10^5 gerações. Então, um total de 1% das árvores geradas foi utilizado para produzir a árvore consenso. O modelo de

substituição JTT + G também foi selecionado nas configurações GARLI (datatype = aminoacid; ratematrix = jones; statefrequencies = jones; ratehetmodel = gamma; numratecats = 4; invariantsites = none), e o suporte estatístico das árvores ML foi calculado a partir de 10^3 replicatas de bootstrap. Então, 50% das árvores majoritárias de consenso de todas as replicatas de bootstrap foram sumarizadas utilizando o programa SumTrees of DendroPy 3.8.0 (Sukumaran *et al.*, 2010).

Para fins de comparação entre os grupos filogenéticos, uma pesquisa de domínios conservados foi realizada utilizando o banco de dados do Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; Sonnhammer *et al.*, 1997). Apenas domínios preditos a 1% de significância foram considerados.

2.2 - Clonagem dos genes GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 em vetores de expressão

Para clonar as sequências completas dos *bZIPs* alvo nos vetores de expressão de leveduras pDEST32 e pDEST22, e de expressão em plantas pCAMBIA1300-YFP-*pnos*, os genes foram amplificados com oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), a partir de cDNA extraído de folhas de soja suscetíveis (EMBRAPA48), e os produtos de amplificação resultantes foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), e inseridos por recombinação no vetor de entrada pDONR201, utilizando-se a enzima BP clonase (Invitrogen). Os clones obtidos, pDONR201-GmbZIP62, pDONR201-GmbZIP105, pDONR201-GmbZIPE1 e pDONR201-GmbZIPE2 foram utilizados para transferência dos respectivos cDNAs para os vetores pDEST32, pDEST22, e pCAMBIA1300-YFP-*pnos* por recombinação pela enzima LR clonase (Invitrogen), resultando nos clones pBD-GmbZIP62 (pDEST32- GmbZIP62) e pAD-GmbZIP62 (pDEST22-GmbZIP62), pBD-GmbZIP105 (pDEST32-GmbZIP105) e pAD-GmbZIP105 (pDEST22-GmbZIP105), pBD-GmbZIPE1 (pDEST32- GmbZIPE1) e pAD-GmbZIPE1 (pDEST22-GmbZIPE1), pBD-GmbZIPE2 (pDEST32-GmbZIPE2) e pAD-

GmbZIPE2 (pDEST22-GmbZIPE2), e pYFP-GmbZIP62 (pCAMBIA1300-YFP-pnos-GmbZIP62), pYFP-GmbZIP105 (pCAMBIA1300-YFP-pnos-GmbZIP105), pYFP-GmbZIPE1 (pCAMBIA1300-YFP-pnos-GmbZIPE1) e pYFP-GmbZIPE2 (pCAMBIA1300-YFP-pnos-GmbZIPE2).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem dos genes *bZIP* em vetores de expressão

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Vetor de Entrada
Fw-GmbZIP62	AAAAAGCAGGCTTCACAATGACTTCCTTTTCAGCTTG	pDONR201
GmbZIP62-Rv	AGAAAGCTGGGTTCGCGGCCGCAAGCTTCTAGTCGAGTGGCCAAATAG	pDONR201
Fw-GmbZIP105	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAATGAAATTCAAATACT	pDONR201
GmbZIP105-Rv	AGAAAGCTGGGTTCGCGGCCGCAAGCTTTCAATTAGAAGGAGTTCCAC	pDONR201
Fw-GmbZIPE1	AAAAAGCAGGCTTCACAATGACGCAATTACCTCCAAA	pDONR201
GmbZIPE1-Rv	AGAAAGCTGGGTTCGCGGCCGCAAGCTTTCACGTTACATCCCAAACCT	pDONR201
Fw-GmbZIPE2	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCAAATTCAAAGGGCTC	pDONR201
GmbZIPE2-Rv	AGAAAGCTGGGTTCGCGGCCGCAAGCTTCTAAATTCTGAGAGCAGGGT	pDONR201

2.3- Ensaios de transativação e dimerização

Linhagens de levedura AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1 GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ) transformadas com pBD-GmbZIP62, pBD-GmbZIP105, pBD-GmbZIPE1, pBD-GmbZIPE2, foram crescidas em meio SD (Synthetic dropout) na ausência de leucina e histidina, suplementado com 20mM de 3-aminotriazole, por 3 dias a 28°C. As linhagens modificadas foram crescidas por 3 dias e utilizadas para medida da atividade de β -galactosidase, como descrito por Amberg et al (2005).

Para avaliar a capacidade de homo e hetero dimerização entre as proteínas bZIP, as mesmas linhagens modificadas acima foram re-transformadas com as construções pAD-GmbZIP62 ou pAD-GmbZIP105 ou AD-GmbZIPE1 ou pAD-GmbZIPE2, e então crescidas em meio SD (Synthetic dropout) na ausência de leucina, triptofano e histidina, suplementado com 50mM de 3-aminotriazole, e permitidas crescerem por 3 dias a 28°C. As linhagens modificadas foram crescidas por 3 dias e utilizadas para medida da atividade de β -galactosidase, como descrito por Amberg et al (2005).

2.4– Perfil de expressão dos genes bZIPs em tecidos de soja e em resposta a fitohormônios

A expressão dos genes *bZIPs* foi analisada em diferentes tecidos de soja variedade CD 206 e em diferentes estádios de desenvolvimento da semente. O RNA foi extraído a partir de folha, caule e raiz na fase vegetativa. Para a utilização das sementes, foi extraída a massa fresca segundo Lanna *et al.* (2002) no primeiro estádio, segundo estádio, terceiro estádio e quinto estádio correspondente à semente com até 75 mg, e semente madura, superior a 450 mg.

Para avaliação da expressão dos genes em resposta à aplicação exógena de fitohormônios as plantas foram inicialmente germinadas e ao atingir o estágio V3 foram tratadas com metil jasmonato (MeJA) 100 μ M ou ácido salicílico (SA) 1 mM pelo período de tempo indicado nas respectivas figuras. Como controle de tratamento, plantas do mesmo estágio foram tratadas com água. O material vegetal foi coletado após os tratamentos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e em seguida armazenado a -80 °C até o processamento.

2.5 - Experimentos de infecção

Para avaliar a expressão dos genes *bZIPs* durante a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*, foram utilizadas plantas resistentes (PI561356) e suscetíveis (EMBRAPA48) infectadas com ferrugem asiática. Amostras de soja foram plantadas e mantidas em casa de vegetação, sob condições de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (>60%) controladas, e fotoperíodo de 12h, até o estágio de desenvolvimento V3 (30 dias). O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições (cada repetição contendo três replicatas), e estrutura de tratamentos em fatorial com dois fatores: tempo de coleta (12, 24, 48, e 192 horas após inoculação - hai) e genótipos (PI561356 e Embrapa 48). A infecção foi induzida através da pulverização de uma suspensão de esporos (3×10^5 esporos/mL) em plantas nos estádios V2 para V3 de crescimento em triplicata. Como controle dos tratamentos, plantas nos mesmos estádios citados foram submetidas a um tratamento de falsa inoculação (MOCK) para cada respectivo tempo de infecção. Após 12, 24, 48 e 192 horas de inoculação, as folhas das plantas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e em seguida armazenadas a -80 °C até o processamento para extração de RNA.

2.6 - Extração de RNA e síntese de cDNA para qRT-PCR

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 unidades 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.

2.7 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR) e análises estatísticas

O procedimento de PCR em Tempo Real, bem como testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo os 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 análises de quantificação relativa de cada gene foram feitas em tubos individuais. Inicialmente foi feito um ensaio para a determinação da eficiência da reação. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} do cDNA. Para a verificação da eficiência de reação, foi calculado o valor de R^2 da equação de regressão linear obtida para cada gene. Após 40 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação (melting). As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C .

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: $2^{-\Delta\text{Ct}}$ e $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Como

controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado a expressão do gene actina (AAA33939.1), que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

Os contrastes entre médias referentes à expressão relativa dos genes analisados foram avaliadas utilizando-se o Teste t, ao nível de 5% de probabilidade, sendo que o programa utilizado para as análises foi o software ASSISTAT (www.assistat.com/), versão 2013.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene Alvo	Eficiência
RT Fw-GmbZIP62	CTTACCGGATGCGATGACTT	<i>GmbZIP62</i>	95%
RT GmbZIP62-Rv	TCAATGGTTGCAGTGATGGT	<i>GmbZIP62</i>	95%
RT Fw-GmbZIP105	GTTGGGAGGCATTTCTTCAA	<i>GmbZIP105</i>	99%
RT GmbZIP105-Rv	CCAGGCTAGCCACTCTATGC	<i>GmbZIP105</i>	99%
RT Fw-GmbZIPE1	GACCCCAAGAGAGTCAAAGAATC	<i>GmbZIPE1</i>	95%
RT GmbZIPE1-Rv	GCTCTGATATGTATTGCAGCTTCCT	<i>GmbZIPE1</i>	95%
RT Fw-GmbZIPE2	CAACCACAGACACAGCCACAA	<i>GmbZIPE2</i>	95%
RT GmbZIPE2-Rv	GCGAACTGAGATTCGAGGTCTCT	<i>GmbZIPE2</i>	95%
RT Fw-GmPR1	AACTATGCTCCCCGGCAACTATATTG	<i>GmPR1</i>	95%
RT GmPR1-Rv	TCTGAAGTGGCTTTACATCGAAACAA	<i>GmPR1</i>	95%
RT Fw-GmPR4	TGCGGGTGACAAATACAGGAA	<i>GmPR4</i>	95%
RT GmPR4-Rv	TGCTGCACTGATCTACGATTCTC	<i>GmPR4</i>	95%
RT Fw-GmNAC6	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	<i>GmNAC6</i>	95%
RT GmNAC6-Rv	GGACTATTCAACTGAGCCCAAAG	<i>GmNAC6</i>	95%
RT Fw-GmActina	GAGACATCCGAGACCAGCTC	<i>Actina</i>	91%
RT GmActina-Rv	AATGCCTGATGCTTCCATTC	<i>Actina</i>	91%

2.8 - Transformação transiente de plantas de tabaco e localização subcelular

A transformação transiente de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. havana) foi realizada como descrito anteriormente, por meio de agroinoculação (Carvalho *et al.*, 2008). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os vetores de interesse foram crescidas em 5 mL de meio Rhizo, com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 5000 RPM por 5 min. O pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetosiringona 10 µM) e ressuspendido em 1 mL do mesmo tampão. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco de aproximadamente 30 dias foram infiltradas com *A. tumefaciens* estirpe GV3101 em uma D.O. no comprimento de onda de 600 nm de 0,2, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da epiderme inferior. A expressão das proteínas foi confirmada por microscopia confocal, três dias após a agroinoculação.

Para a expressão transiente das proteínas bZIP fusionadas a YFP, folhas de tabaco foram agroinoculadas com as construções de DNA pYFP-GmbZIP62, pYFP-GmbZIP105, pYFP-GmbZIPE1 e pYFP-GmbZIPE2. Como controle de localização nuclear, foi utilizada a construção pEGFP, que contém o gene GFP, para agroinoculação. Três dias após a inoculação, as folhas transformadas foram observadas no microscópio LSM 510 META invertido (ZEISS), utilizando a objetiva de 40x1,4 e o laser de argônio. A análise foi realizada com explantes montados em água utilizando-se lâminas e lamínulas de vidro. Para a obtenção de imagens, a YFP foi excitada a 514 nm, e sua emissão coletada a 535-590 nm. A fenda do microscópio foi fixada, fornecendo uma faixa óptica de 1,5 a 2,0 µm. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser” (ZEISS) e do programa Adobe Photoshop.

3. Resultados

3.1. Análise filogenética das proteínas bZIPs de soja e seleção das proteínas GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 para estudos funcionais.

Baseado nas análises filogenéticas, as sequências das proteínas bZIP de *Glycine max* agruparam-se de acordo com o modelo proposto para as proteínas bZIP de *Arabidopsis*, as quais são compostas de dez grupos: A, B, C, D, E, F, G, H, I e S (Jakoby *et. al.*, 2002). Uma vez que esta classificação é baseada em domínios conservados, este modelo é útil na classificação geral das proteínas bZIP de *Glycine max* (Alves *et al.*, 2013). Nas árvores filogenéticas, estes dez grupos foram recuperados como clados monofiléticos validados por valores moderados de probabilidade posterior (PP) (em árvores Bayesianas) e valores de bootstrap (BV) (em árvores de máxima verossimilhança): PP>85 e BV>50, e a maioria das 119 proteínas incluídas nestes clados compartilham os mesmos domínios verificados no PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Baseado nestes dados, nós também propomos um grupo adicional de 9 proteínas bZIP relacionadas que possuem um conjunto de 4 domínios distintos (Figura 1). Além destes 11 grupos, 20 (13,5%) proteínas bZIP permaneceram não agrupadas (Figura 1).

Após a distribuição de todas as proteínas bZIPs de soja anotadas no GenBank pelos 11 grupos formados, buscamos sequências candidatas que estivessem no mesmo grupo de proteínas bZIPs caracterizadas como responsivas a patógenos (Figura 1). Desta forma, foram escolhidas quatro sequências de proteínas bZIPs (cujos números de acesso encontram-se destacados na árvore) para análises funcionais (Figura 1). Duas proteínas do grupo E foram selecionadas para a análise de resposta à infecção por *P. pachyrhizi* (Figura 1). Esse é o mesmo grupo no qual foi incluída a proteína TabZIP (ACT66299), única proteína bZIP que foi caracterizada funcionalmente na resposta à infecção por um fungo de ferrugem, *Puccinia striiformis* f. sp.

Triticum, fungo causador da ferrugem do trigo (Zhang *et al.*, 2009). As proteínas de soja selecionadas (XP_003543312 e XP_003525005) são similares às proteínas bZIPs de *Arabidopsis* do grupo E (Jakoby *et al.*, 2002), as quais não foram atribuídas uma função biológica definida (Jakoby *et al.*, 2002). Assim, nós selecionamos estas duas proteínas para estudos funcionais e para analisar suas expressões durante a infecção por *P. pachyrhizi*. As proteínas foram denominadas GmbZIPE1 (XP_003543312) e GmbZIPE2 (XP_003525005), devido a similaridade com proteínas do grupo E de *Arabidopsis* (Jakoby *et al.*, 2002).

Além de GmbZIPE1 (XP_003543312) e de GmbZIPE2 (XP_003525005) outras duas proteínas bZIPs (ABI34659 e NP_001237027) do grupo C foram selecionadas. O grupo C foi o grupo que apresentou o maior número de fatores de transcrição da família bZIP responsivos a patógenos (Figura 1). A proteína ABI34659, identificada no GenBank como GmbZIP105, e a proteína NP_001237027, identificada como GmbZIP62, apresentam-se fortemente similares a membros responsivos do grupo C (Figura 1), como as proteínas G/HBF-1 e SBZ1 de soja (Figura 1; Jakoby *et al.*, 2002). GmbZIP62 foi caracterizado anteriormente como responsivo a estresses abióticos (Liao *et al.*, 2008), onde foi demonstrado que sua super-expressão em *Arabidopsis* aumentava a tolerância a estresses de seca, salinidade e congelamento (Liao *et al.*, 2008). Desta forma, GmbZIP62 pode apresentar-se como um fator de resposta geral a estresses em plantas, incluindo estresses causados por patógenos, uma característica já descrita para outros bZIPs (Lee *et al.*, 2006; Orellana *et al.*, 2010).

As proteínas GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 agruparam em diferentes clados refletindo uma diferença estrutural que possivelmente está acompanhada de diferenças funcionais entre estas proteínas (Figura 1).

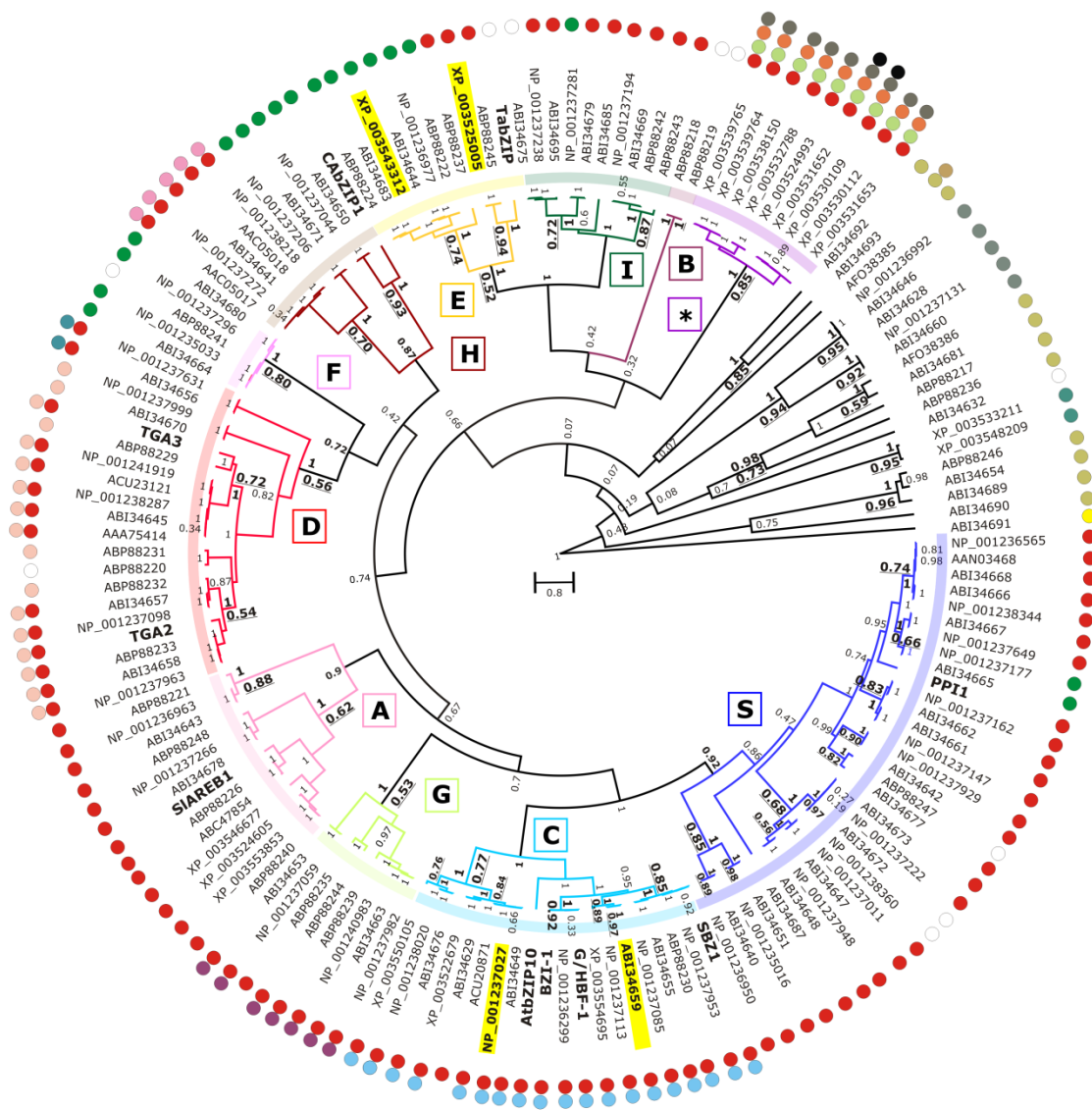


Figura 1. Filogenia das proteínas bZIPs de soja. O alinhamento múltiplo foi gerado utilizando o programa MAFFT, e a árvore filogenética final de máxima verossimilhança foi construída como descrito no item 3.1 da metodologia. As proteínas bZIPs foram separadas em 11 grupos conforme indicado na figura. Os números de acesso do GenBank são indicados na árvore. Os domínios observados pelas análises do banco de dados do PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) são indicados na figura e descritos no texto. As

proteínas selecionadas para estudo são indicadas em negrito e destacadas em amarelo (GmbZIPE1, XP_003543312; GmbZIPE2, XP_003525005; GmbZIP105, ABI34659; GmbZIP62, NP_001237027). Os números de acesso das 10 proteínas responsivas a patógenos incluídas nas análises são: ACT66299_TabZIP; AAX20030_ CAbZIP1; CAA71687_ GHBF1; AAL27150_BZI1; O22763_AtZIP10; AAN61914_ PPI1; BAG24402_ SBZ1; NP_001234596_ SIAREB1; P43273_ TGA2; Q39234_ TGA3. Estas proteínas são indicadas na árvore em negrito.

3.2. Localização subcelular das proteínas bZIPs de soja

A expressão transiente das proteínas fusionadas a YFP em células da epiderme inferior de tabaco mostrou que as fusões YFP-GmbZIP62 e YFP-GmbZIP105 localizam-se no núcleo (Figura 2), enquanto a fusão YFP-GmbZIPE1 localiza-se predominantemente no citoplasma. A fusão YFP-GmbZIPE2 se localiza tanto no citoplasma quanto no núcleo das células (Figura 2). Estes resultados sugerem que a localização das quimeras pode refletir um possível controle por localização das proteínas bZIPs.

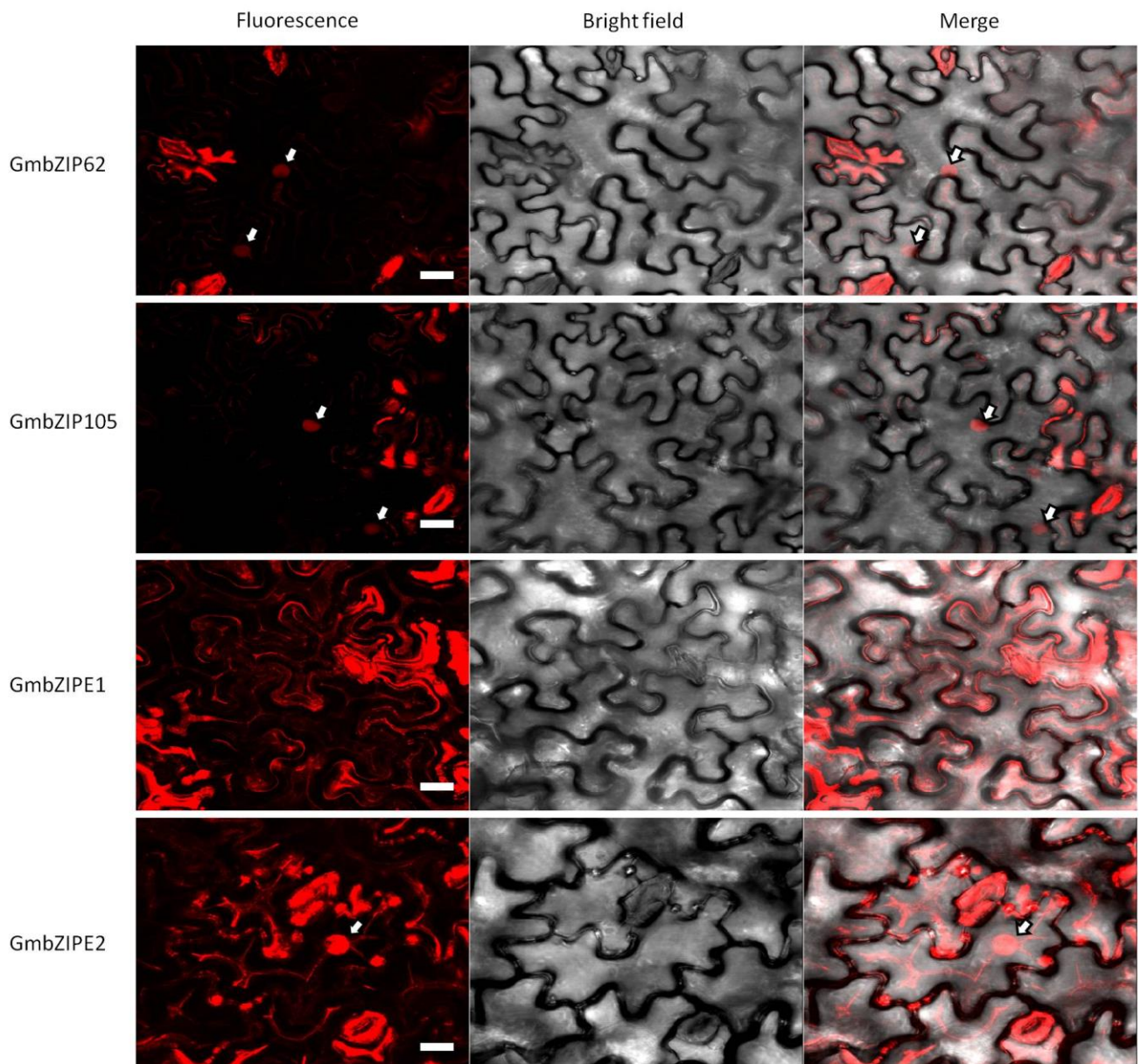


Figura 2. Localização subcelular das proteínas bZIPs de soja. As proteínas bZIPs fusionadas a YFP (*yellow fluorescent protein*) foram expressas em folhas de tabaco, por meio de agroinoculação. A expressão das proteínas foi monitorada pela fluorescência emitida por YFP, por meio de microscopia confocal, 3 dias após a agroinoculação com os vetores binários. As setas brancas indicam o núcleo das células, visualizados por fluorescência. Barra = 20 μ m.

3.3. Atividade de transativação dos fatores GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2

Quando expressas em células de *S. cerevisiae* linhagem *AH109*, as fusões das proteínas bZIPs ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 (BD-GmbZIP62, BD-GmbZIP105, BD-GmbZIPE1, BD-GmbZIPE2) apresentaram diferentes propriedades de ativação transcricional, como é mostrado na Figura 3. A fusão BD-GmbZIP62 foi capaz de ativar fortemente a expressão dos genes repórteres *LacZ* e *HIS3*, enquanto que a fusão BD-GmbZIPE1 foi capaz de ativar fracamente e apenas a expressão do gene *HIS3*. As fusões BD-GmbZIP105 e BD-GmbZIPE2 não foram capazes de ativar a expressão de nenhum dos genes repórteres nos ensaios realizados.

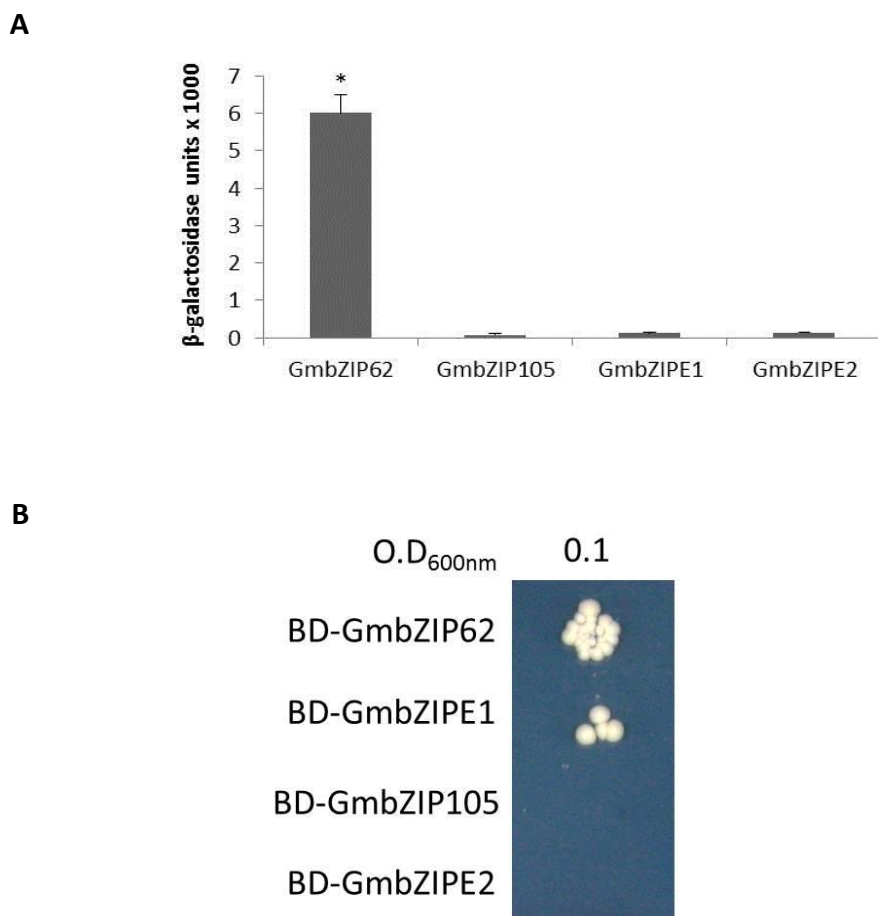


Figura 3. Atividade de transativação de proteínas bZIPs em levedura. A) A atividade de β -galactosidase foi determinada a partir da utilização de células de levedura permeabilizadas com clorofórmio e SDS 0,1% crescidas overnight transformadas com as construções BD-GmbZIP62, BD-GmbZIP105, BD-GmbZIPE1 e BD-GmbZIPE2. As barras finas indicam o desvio padrão de três experimentos distintos. As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do experimento controle (AH109 transformada com vetor pDEST32 vazio) ao nível de 5% de significância pelo Teste t. B) BD-GmbZIP62, BD-GmbZIP105, BD-GmbZIPE1 e BD-GmbZIPE2 foram introduzidos separadamente na linhagem de levedura AH109. As culturas crescidas overnight foram diluídas conforme indicado na figura e crescidas por

3 dias em meio sem histidina suplementado com 20mM de 3-aminotriazole (3AT).

3.4. Análise de dimerização entre as proteínas GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2

Proteínas bZIP podem formar homodímeros ou heterodímeros possivelmente utilizando o motivo em espiral zíper de leucina como um motivo de dimerização, e estas interações podem com isso afetar a afinidade e especificidade pelo DNA alvo (Jakoby *et al.* 2002). Um ensaio utilizando o sistema de duplo-híbrido de leveduras mostrou que ocorre forte homodimerização de GmbZIPE2, homodimerização fraca de GmbZIPE1 e ausência de homodimerização de GmbZIP105 (Figura 4), e ocorre a heterodimerização entre GmbZIPE2 e GmbZIP105 e uma heterodimerização fraca entre GmbZIPE1 e GmbZIP105 e entre GmbZIPE1 e GmbZIPE2 (Figura 4), mostrando que bZIPs de grupos estruturais e funcionais diferentes podem interagir, afetando possivelmente sua especificidade pelas sequências alvo. As interações são indicadas pela atividade da enzima β -galactosidase (Figura 4A) e pelos níveis de crescimento dos transformantes em meio sem histidina, suplementado com inibidor competitivo 3AT na concentração de 50mM (Figura 4B).

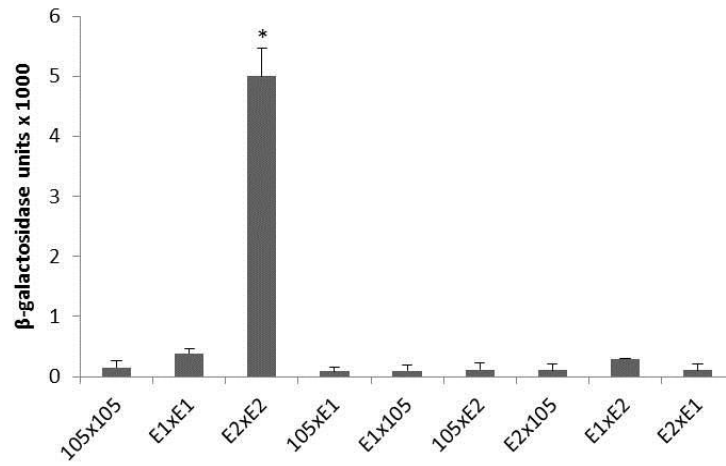
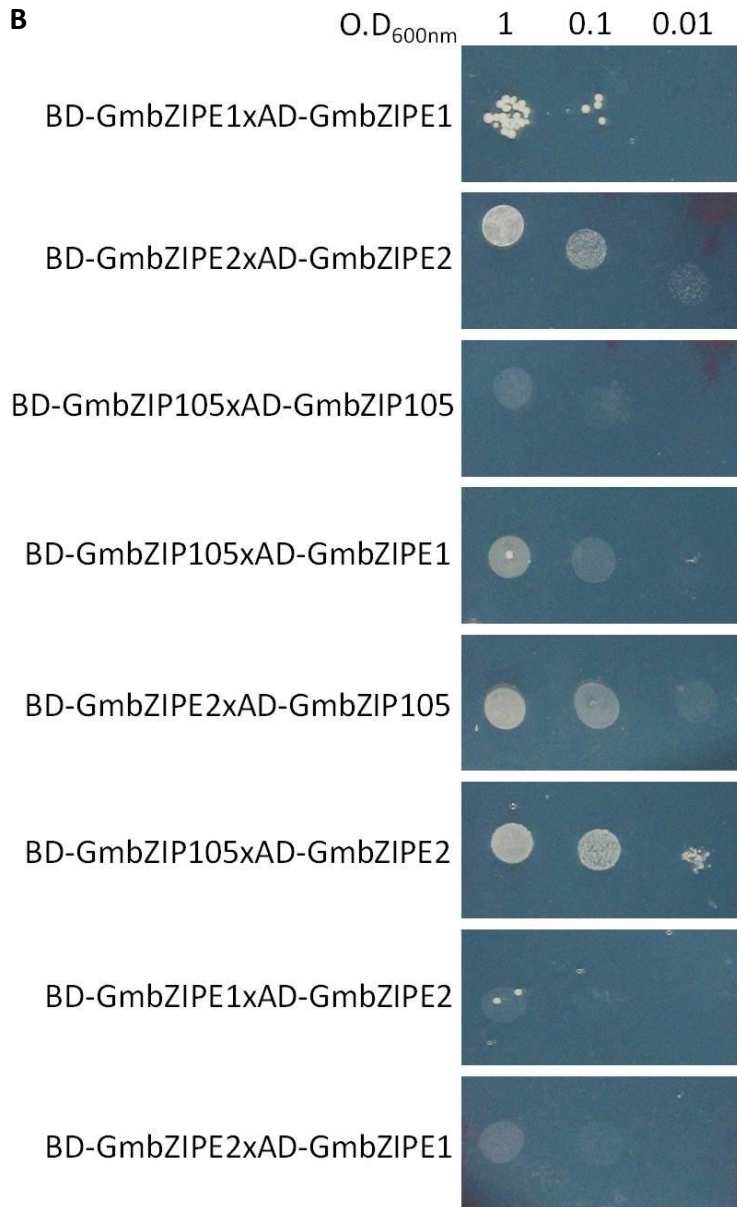
A**B**

Figura 4. Análise de formação de homo e heterodímeros entre as proteínas bZIPs. Os membros selecionados da família bZIP de soja foram testados como isca e presa em um sistema de duplo-híbrido de leveduras. As combinações BDxAD de GAL4 no sistema de duplo-híbrido de leveduras foram realizadas com as construções BD-GmbZIP105, BD-GmbZIPE1, BD-GmbZIPE2, AD-GmbZIP105, AD-GmbZIPE1 e AD-GmbZIPE2, sendo que estas combinações foram introduzidas na linhagem de levedura AH109. Como controle negativo, foi utilizada AH109 transformada com os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios (dados não mostrados). A) A atividade de β -galactosidase foi determinada a partir da utilização de células de levedura permeabilizadas com clorofórmio e SDS 0,1% crescidas overnight. As barras finas indicam o desvio padrão de três experimentos distintos. As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do experimento controle (AH109 transformada com os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios) ao nível de 5% de significância pelo Teste t. B) As culturas crescidas overnight foram diluídas conforme indicado na figura e plaqueadas em meio sem histidina suplementado com 50mM 3-aminotriazole (3AT) e incubadas por 3 dias. A ativação do gene *HIS3* (a capacidade de crescer em meio sem histidina) foi utilizada como indicação da interação.

3.5. Perfil transcricional dos genes *bZIPs* em tecidos de soja

Os experimentos de qRT-PCR demonstraram que os genes *bZIPs* analisados apresentam expressão tecidual diversa (Figura 5). *GmbZIP62* e *GmbZIP105* foram expressos predominantemente na raiz enquanto que *GmbZIFE1* e *GmbZIFE2* apresentaram maiores níveis de expressão em folhas e em sementes no estágio maduro (Figura 5). O padrão de expressão do gene *Actina* foi considerado estável em todos os tecidos testados, ao nível de probabilidade de 5% (dados não mostrados).

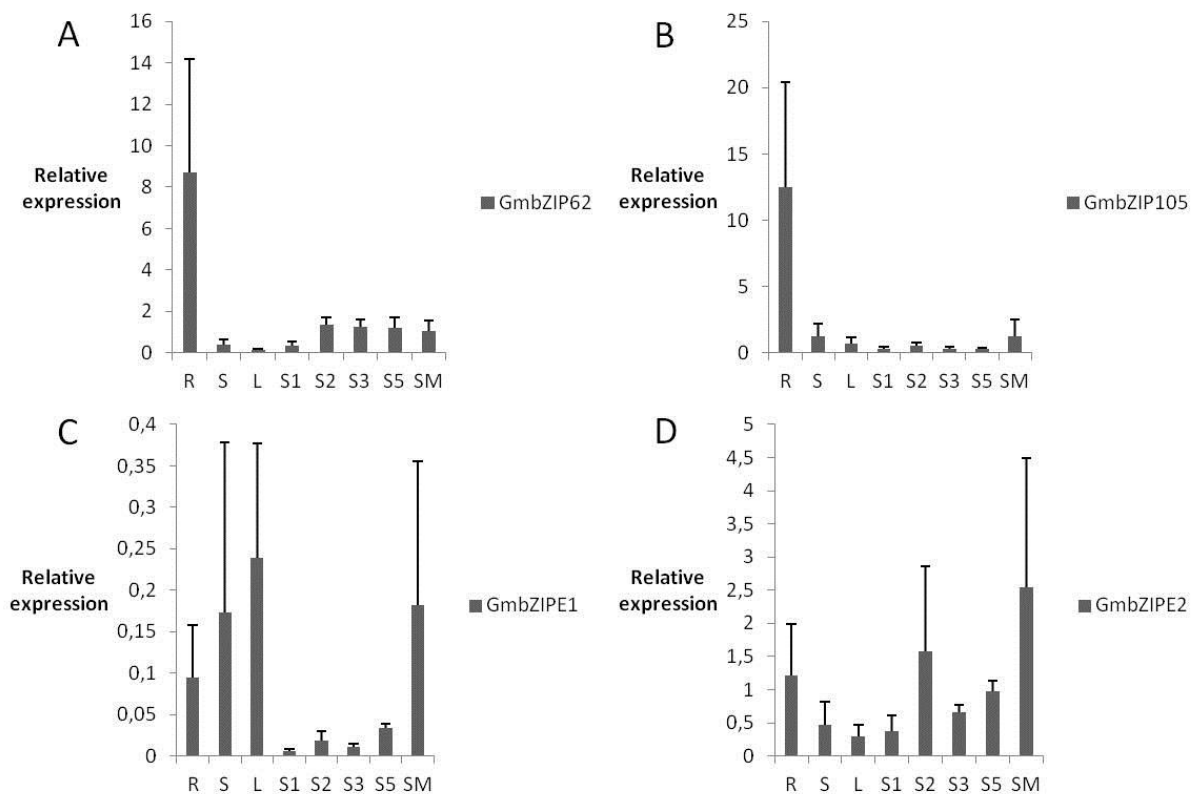


Figura 5. Expressão dos genes GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 em diferentes tecidos de soja. A expressão relativa do gene alvo foi quantificada por qRT-PCR em diferentes tecidos de soja, como indicado na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como normalizador e calibrador o gene da Actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (as barras finas indicam o Desvio Padrão de um n = 3 réplicas biológicas). R, raiz; S, caule; L, folha; S1, semente primeiro estágio; S2, semente segundo estágio; S3, semente terceiro estágio; S5, semente quinto estágio; e SM, semente madura.

3.6. Indução de genes *bZIPs* por fitohormônios

A transcrição dos genes *bZIPs* foi modificada pelos tratamentos com hormônios relacionados com a ativação das defesas moleculares de plantas (Figura 6). Em relação ao tratamento com ácido salicílico, um hormônio que regula principalmente as defesas contra patógenos biotróficos, todos os genes *bZIPs* analisados apresentaram rápido aumento no número de transcritos, sendo que os picos máximos de indução foram atingidos principalmente no tempo de 2 horas após a aplicação, exceto para o gene *GmbZIFE1*, que atingiu o máximo em 6 horas (Figura 6). Em relação ao tratamento com metil jasmonato, um composto análogo ao hormônio ácido jasmônico, que regula as defesas contra patógenos necrotróficos e herbivoria, os picos máximos de indução da expressão dos genes apareceram em tempos mais tardios, entre 6 e 12 horas após a aplicação (Figura 6). Estes dados evidenciam a responsividade destes genes *bZIPs* a hormônios de resposta a ataque de patógenos. A modificação da expressão de genes marcadores de defesa (*GmPR1*, *GmPR4* e *GmNAC6*), responsivos aos hormônios utilizados, evidenciam que os tratamentos foram eficazes na ativação das vias moleculares de resposta a estresses bióticos nas plantas analisadas (Figura 6).

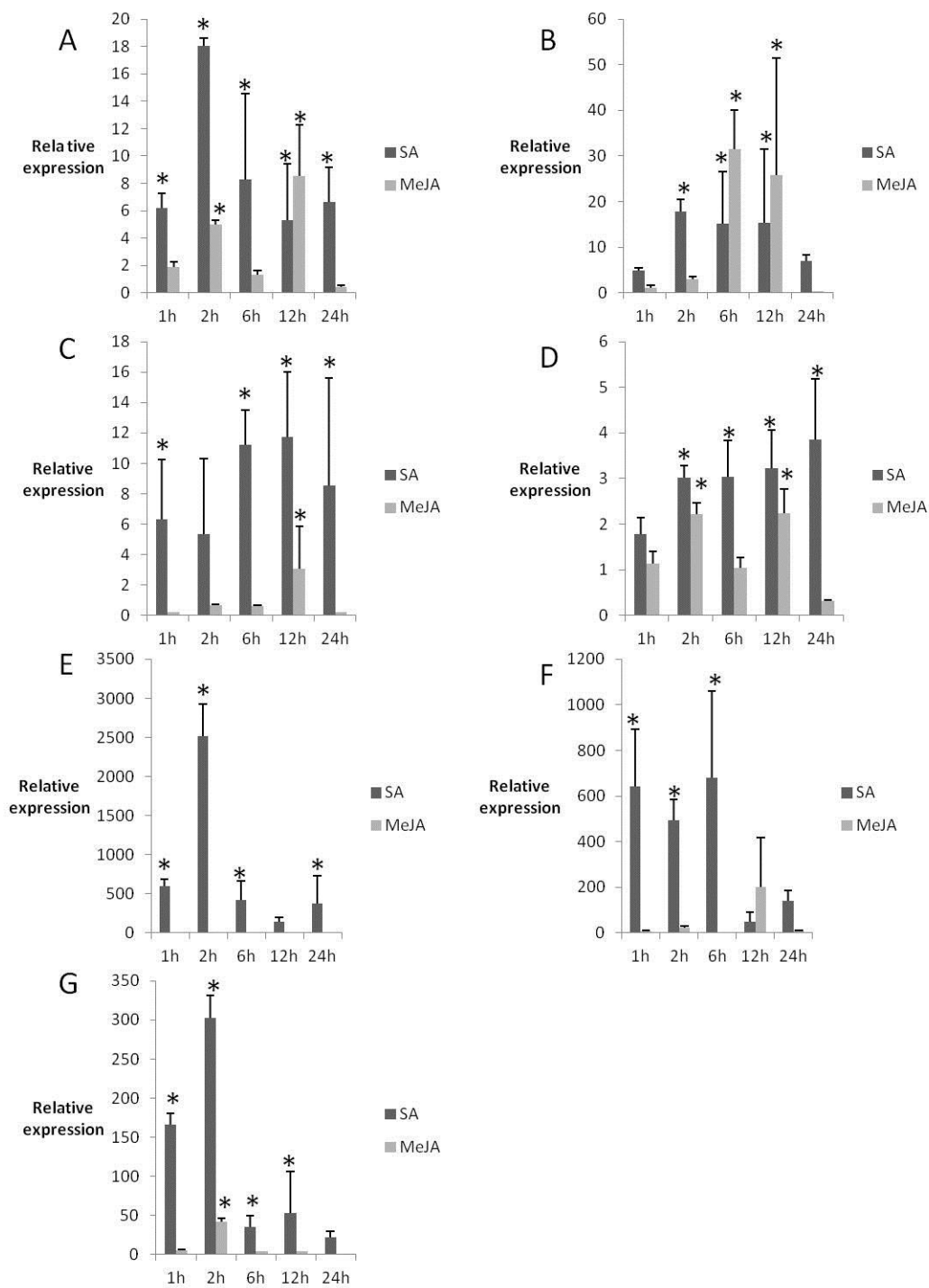


Figura 6. Análise da expressão de GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 em resposta aos tratamentos com SA e MeJA em folhas de soja. Na ordem: A) GmbZIP62, B) GmbZIP105, C) GmbZIPE1, D) GmbZIPE2, E) GmPR1, F) GmPR4, G) GmNAC6. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene da Actina, e água

como tratamento controle. 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.

3.7. Perfil de expressão dos genes *bZIPs* em plantas de soja suscetíveis e resistentes durante o curso da infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*

O ensaio de qRT-PCR foi utilizado para determinar os perfis de expressão dos genes *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* durante a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* em plantas de soja suscetíveis (cultivar EMBRAPA48), sendo o resultado apresentado na Figura 7. Na interação compatível estabelecida entre o fungo da ferrugem e as plantas hospedeiras suscetíveis, a expressão dos genes *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* foi fortemente induzida nos primeiros estágios da infecção. *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* apresentaram picos máximos de indução no tempo de 24 horas após inoculação (Figura 7). Interessantemente, de modo inverso, a expressão do gene *GmbZIP62* foi fortemente reprimida em quase todos os tempos de infecção (Figura 7). Após os picos de maior expressão dos genes induzidos, os níveis de transcritos regrediram lentamente até o nível basal (Figura 7). O gene *GmbZIP62* apresentou um ligeiro aumento próximo ao valor basal no tempo de 24 horas após infecção, mas voltou a ser reprimido nos tempos posteriores da infecção. A indução da expressão de genes marcadores de resposta a patógenos (*GmPR1*, *GmPR4* e *GmNAC6*) evidenciam que a infecção foi estabelecida nas plantas analisadas (Figura 7).

Da mesma forma, o ensaio de qRT-PCR foi utilizado para determinar os perfis de expressão dos genes *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* durante a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* em plantas de soja resistentes (PI561356). As plantas utilizadas contêm o alelo do gene de resistência mapeado próximo a *Rpp1* (Kim *et al.*, 2012). Em plantas resistentes ao fungo, há a predominância de uma interação incompatível entre a planta hospedeira e o fungo, sendo que diferentemente da expressão dos genes *bZIPs* observada em plantas suscetíveis, ocorreu uma indução da expressão dos genes *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* em tempos mais tardios após a inoculação do fungo. O pico máximo de expressão do gene *GmbZIP105* ocorreu em 48 horas após a inoculação, enquanto que os picos máximos de

expressão dos genes *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* ocorreram somente 192 horas após a inoculação (Figura 7). Novamente, a expressão do gene *GmbZIP62* foi fortemente reprimida, sendo que a expressão somente chega a níveis basais 48 horas após a inoculação (Figura 7). A indução da expressão de genes marcadores de resposta a patógenos (*GmPR1*, *GmPR4* e *GmNAC6*) também ocorreu em tempos mais tardios após a inoculação (Figura 7).

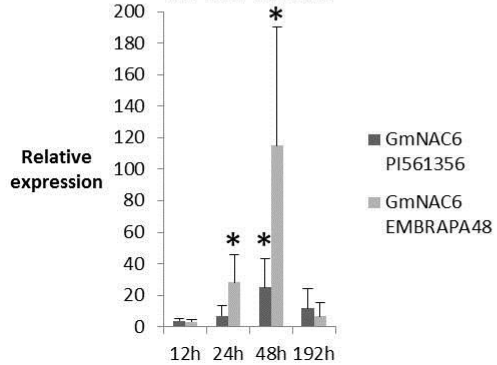
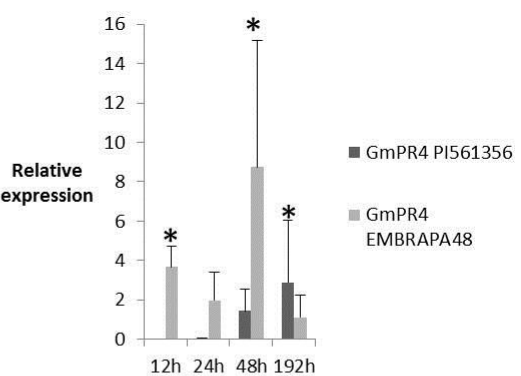
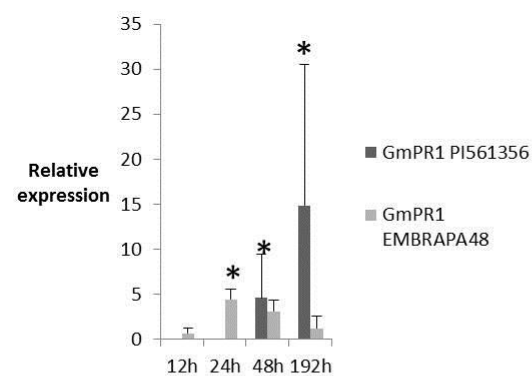
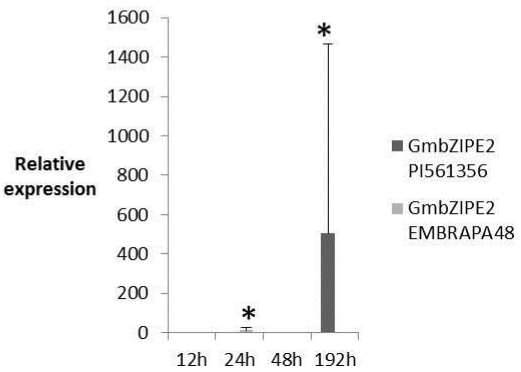
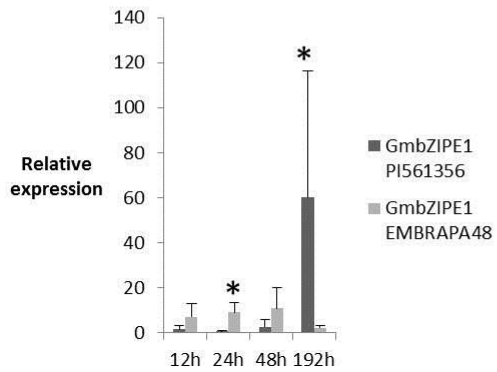
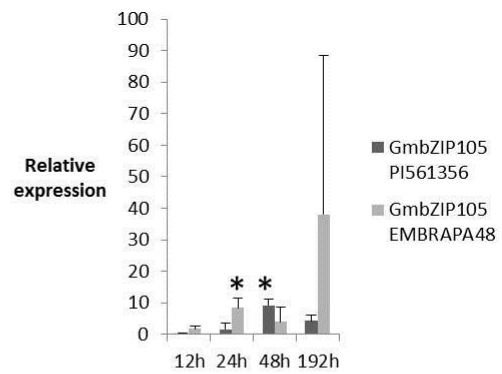
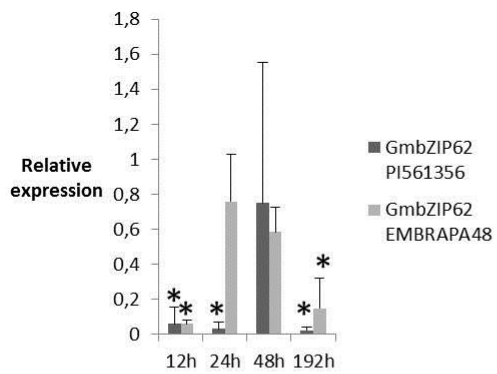


Figura 7. Análise da expressão de GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 em plantas de soja suscetíveis e resistentes durante o curso da infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene da Actina, 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.

4. Discussão

As análises filogenéticas evidenciam a grande diversidade estrutural e funcional da família bZIP de fatores de transcrição. Trabalhos anteriores (Jakoby *et al.*, 2002) propuseram a separação dos bZIPs de *Arabidopsis* em 10 grupos. Em soja, os mesmos 10 grupos foram propostos para agrupar os bZIPs de acordo com a similaridade estrutural apresentada com as proteínas de *Arabidopsis* (Liao *et al.*, 2008). A análise filogenética realizada neste trabalho revelou a presença em soja de pelo menos 11 grupos de proteínas bZIP, o que evidencia a existência de outros grupos funcionais além dos previamente descritos por Jakoby e colaboradores (2002). 20 das 148 proteínas de soja analisadas não agruparam em nenhum dos 11 grupos formados, devido provavelmente a não existência da sequência completa destas proteínas no banco de dados do GenBank, ou a não caracterização de seus domínios funcionais como domínios bZIPs, apesar destas proteínas terem sido preditas como proteínas da família bZIP em estudos anteriores (Liao *et al.*, 2008).

Um novo grupo adicional proposto é formado por proteínas homólogas a proteínas da família HB-PHD de *Arabidopsis* (Ariel *et al.*, 2007). A estrutura do domínio homeobox (HB), apresenta um motivo conservado de 60 aminoácidos presente em fatores de transcrição encontrados em todos os organismos eucariotos (Ariel *et al.*, 2007). Este motivo enovela-se em uma estrutura hélice tripla que é capaz de interagir especificamente com o DNA alvo (Ariel *et al.*, 2007). O domínio PHD finger, um dedo de zinco Cys4-His-Cys3, é encontrado em muitas proteínas regulatórias de plantas ou animais os quais são frequentemente associados com a regulação da transcrição por modificação da cromatina (Halbach *et al.*, 2000). Em fatores de transcrição contendo domínio homeobox o PHD finger é combinado com um zíper de leucina upstream (Halbach *et al.*, 2000). Ambos estes domínios juntos formam uma região altamente conservada de 180 aminoácidos denominada de motivo ZIP/PHDf, e já foi verificado que a atividade transcricional do PHD finger é mascarada quando este domínio encontra-se nesta longa região (Halbach *et al.*, 2000).

Curiosamente, pouco é conhecido sobre a região básica proximal ao domínio zíper de leucina desta região de 180 aminoácidos, sendo que estas proteínas ainda não haviam sido descritas na literatura como proteínas contendo o domínio bZIP. Além de possuir domínios descritos em proteínas HB-PHD, as 9 proteínas deste grupo apresentam também os domínios MEKHLA (os quais possuem MEKHLA como sequência conservada de aminoácidos), que possui similaridade com o domínio PAS (Per, Arnt e Sim proteins), que em eucariotos possui a função de detector de sinais em vias de sinalização (Dunham *et al.*, 2003), e o domínio START (StAR protein-related lipid-transfer), que possui função de ligação a lipídeos, como colesterol, fosfolipídeos ou esfingolipídeos (Ponting *et al.*, 1999), o que indica que estas proteínas podem estar ancoradas a membranas celulares como receptores de sinais em células vegetais.

Analisando a composição dos domínios protéicos verificados em cada proteína bZIP de soja, verificamos uma diversidade estrutural entre os grupos monofiléticos (Figura1). Os membros dos grupos A, C, E, F, I e S apresentam como assinatura estrutural principal a presença dos domínios de zíper de leucina básicos (bZIP), sendo que os domínios bZIPs verificados diferem estruturalmente de acordo com a classificação proposta por Jakoby e colaboradores (2002). Por exemplo, o domínio bZIP_C, encontrado em 19 dos 20 membros do grupo C, difere dos domínios bZIP_1 e bZIP_2 por possuir um zíper de leucina estendido de até nove repetições contendo sete leucinas cada (Jakoby *et al.*, 2002). Diferentemente dos membros destes grupos, os membros dos demais grupos possuem diversos domínios que refletem as características de seus papéis funcionais. A maioria dos membros do grupo D (17) possuem além do domínio bZIP um domínio DOG1 (Delay of germination 1 protein), relacionado ao controle do desenvolvimento de sementes (Jakoby *et al.*, 2002), enquanto dois membros apresentam um domínio denominado HSF (Heat shock factor), um domínio de ligação a elementos de promotores relacionados a choque térmico (Clos *et al.*, 1990). Sete membros do grupo G possuem um domínio denominado MFMR (Multifunctional mosaic region), com função crucial na ativação da transcrição (Jakoby *et al.*, 2002). Cinco membros do grupo H

possuem um domínio dedo de zinco tipo RING finger, de provável função de interação proteína-proteína (Halbach *et al.*, 2000). Apesar de 20 proteínas não agruparem em nenhum dos 11 grupos monofiléticos formados, 16 delas apresentam domínios de função ainda desconhecida (DUF), com similaridade estrutural ao domínio bZIP (DUF630, DUF632 e DUF1664), enquanto outras 3 proteínas apresentaram domínios não relacionados (Figura 1). 10 proteínas verificadas no agrupamento não apresentaram nenhum domínio significativamente relevante (Figura 1).

Em plantas, os fatores bZIPs apresentam-se como reguladores mestres da expressão de genes de resposta a estresses abióticos, processos de maturação de sementes e desenvolvimento floral (Singh *et al.*, 2002). Análises filogenéticas com as proteínas da família bZIP de soja, nos levou a selecionar 4 fatores de transcrição que supostamente estão envolvidos na resposta à infecção por patógenos por apresentarem similaridade estrutural significativa com bZIPs sabidamente responsivos a patógenos (Figura 1). Os genes *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* foram diferencialmente expressos tanto durante a infecção em plantas suscetíveis como em plantas resistentes (Figura 7 e 8). Todos os genes analisados foram induzidos após o tratamento com hormônios mediadores de respostas de defesa (Figura 6). Estes resultados sugerem que as proteínas *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* são fatores que podem fazer parte da maquinaria de defesa da planta em resposta a patógenos.

Características bioquímicas inerentes a função de fatores de transcrição mostraram-se diversas nas proteínas bZIPs analisadas. Excetuando-se a proteína *GmbZIPE1*, as proteínas *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, e *GmbZIPE2* apresentaram localização nuclear (Figura 2). A interação fraca demonstrada pelo sistema de duplo-híbrido entre *GmbZIP105* e *GmbZIPE1*, e entre *GmbZIPE2* e *GmbZIPE1* (Figura 4) sugere que possivelmente *GmbZIPE1* possa ser translocado para o núcleo mediante interações com outras proteínas parceiras. Outra hipótese é que *GmbZIPE1* possa depender de estímulos ambientais, por exemplo, elicitores, para que ocorra modificações pós-

traducionais que possibilitem a sua translocação e acumulação no núcleo das células. Estes mecanismos de realocação já foram descritos para outras proteínas bZIPs responsivas a patógenos, como G/HBF-1 de soja, que é fosforilada e acumula-se no núcleo somente após a exposição da planta a elicitores. Outro exemplo é o fator BZI-1 de tabaco, que interage com ANK-1, uma proteína com domínio ankirina, que têm a função de reter o fator no citoplasma, sendo esta interação desfeita na presença de elicitores, translocando o fator BZI-1 para o núcleo (Dröge-Laser *et al.*, 1997; Kuhlmann *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2013).

Apenas a proteína GmbZIP62 foi capaz de ativar fortemente a transcrição dos genes repórteres *LacZ* e *HIS3* em leveduras, mostrando que esta possui um domínio de ativação altamente conservado em eucariotos (Figura 3). A proteína GmbZIPE1 foi capaz de ativar fracamente a transcrição do gene repórter *HIS3*, o que mostra que esta proteína é capaz de recrutar a maquinaria de transcrição da célula vegetal. GmbZIP105 e GmbZIPE2 não foram capazes de transativar os genes repórteres em levedura, porém GmbZIPE2 apresentou um forte padrão de homodimerização, bem como o mesmo padrão foi observado na heterodimerização com GmbZIP105 (Figura 4), evidenciando que a função destas proteínas pode ser modulada a partir de interações proteína-proteína com outros domínios bZIPs. Muitos fatores de transcrição da família bZIP utilizam a interação entre seus domínios zíper de leucina para regular a afinidade e especificidade de ligação ao DNA alvo, uma característica muito estudada em bZIPs de *Arabidopsis* (Jakoby *et al.*, 2002). Um exemplo da importância funcional da homo e heterodimerização de proteínas bZIPs foi mostrado na via de resposta a escassez severa de nutrientes em *Arabidopsis*. Nesta via duas proteínas bZIPs de *Arabidopsis*, bZIP1 e bZIP53, são ativadas por heterodimerização com outros membros da família bZIP. Esta interação acarreta uma mudança na atividade transcricional dos fatores afetando a afinidade de ligação aos *cis*-elementos ACGT ou ACTCAT-like, causando a reprogramação do metabolismo primário em

resposta a estresse devido a baixa disponibilidade energética (Dietrich *et al.*, 2011).

Vários genes que codificam para fatores de transcrição bZIPs em plantas apresentam expressão constitutiva em raiz, mas pouca ou nenhuma expressão em caule e folhas (Schindler *et al.*, 1992; Miao *et al.*, 1994; Katagiri *et al.*, 1989). Neste estudo, foi demonstrado que os níveis de expressão dos genes *GmbZIP62* e *GmbZIP105* foram maiores em raiz, e comparativamente mais baixos nos demais tecidos analisados (Figura 5). Diferentemente, os genes *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* tiveram expressão predominante em sementes maduras, e somente *GmbZIPE1* apresentou expressão em folhas (Figura 5).

Os genes *bZIPs* analisados foram responsivos ao tratamento com SA e MeJA (Figura 6), hormônios mediadores de resposta de defesa contra patógenos em plantas, sendo que para o tratamento com SA os genes *bZIPs* apresentaram picos de máxima expressão em tempos variados. Os genes *GmbZIP62* e *GmbZIP105* apresentaram o pico máximo de expressão 2 horas após aplicação, enquanto que os genes *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* apresentaram os picos em 12 e 24 horas, respectivamente. A expressão dos genes diminuiu logo após o pico máximo de expressão. Para o tratamento com MeJA, os genes *GmbZIP105* e *GmbZIPE1* apresentaram, respectivamente, picos máximos nos tempos de 6 e 12 horas após a aplicação, também seguidos de queda na expressão. Porém, os genes *GmbZIP62* e *GmbZIPE2* apresentaram dois picos de expressão, ambos nos tempos de 2 e 12 horas, mostrando uma resposta bifásica em resposta ao JA.

Schneider e colaboradores (2011) demonstraram que a inoculação de plantas de soja (*Glycine max*) com *P. pachyrhizi* leva a uma resposta bifásica, caracterizada por uma explosão de expressão diferencial de genes responsivos iniciada nas primeiras 12 horas em genótipos resistentes contendo o gene *Rpp3*. Um período silencioso ocorre em torno de 24 a 48 horas depois da inoculação, no qual *P. pachyrhizi* continua a desenvolver-se mas não elicitava respostas hospedeiras, seguido então por uma segunda fase de intensa alteração na expressão gênica, iniciada em torno de 72 horas depois da

inoculação (Schneider *et al.*, 2011). A primeira grande variação da expressão gênica pode ser correlacionada com a formação do apressório e penetração de células epidermais. A segunda onda na expressão gênica ocorre no começo da formação do haustório, sendo que estes processos ocorrem tanto em plantas suscetíveis como em resistentes, durante as interações compatível e incompatível, respectivamente. A proliferação dos haustórios coincide com a inibição do crescimento de *P. pachyrhizi* numa interação incompatível em plantas resistentes, ou o começo do crescimento acelerado de hifas do fungo na interação compatível em plantas suscetíveis (Schneider *et al.*, 2011). As relações temporais entre o crescimento de *P. pachyrhizi* e as respostas da planta hospedeira mostram um importante contexto no qual se podem detalhar as redes de interações moleculares durante a infecção (Schneider *et al.*, 2011). A expressão aumentada dos genes *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* nos tempos iniciais da interação compatível entre o fungo *P. pachyrhizi* e as plantas suscetíveis sugere que os genes *bZIPs* analisados podem estar envolvidos nos processos moleculares de reconhecimento fungo-planta e nas respostas de defesa contra a penetração da cutícula e paredes celulares das células epidermais da folha pelo fungo, um processo já relatado para outros genes *bZIPs* em resposta a fungos de ferrugem (Zhang *et al.*, 2009). Em contraste, a repressão do gene *GmbZIP62* durante a infecção por *P. pachyrhizi* revela a possível existência de um mecanismo de repressão da maquinaria de defesa da planta pelo fungo, sendo *GmbZIP62* possivelmente um dos genes alvo durante a repressão. Como *GmbZIP62* confere tolerância a estresses abióticos diversos (Liao *et al.*, 2008), e apresentou expressão induzida por tratamento com SA e JA, possivelmente sua função conservada na defesa da planta pode ter sido bloqueada a partir de modulação negativa de sua expressão, mediada pela maquinaria molecular do fungo, uma hipótese a ser confirmada futuramente.

As análises de expressão dos genes *bZIPs* e dos genes controle responsivos a patógenos (*GmPR1*, *GmPR4* e *GmNAC6*) mostram uma indução tardia para todos os genes nas plantas resistentes em comparação com as

suscetíveis (Figura 8). Estudos de expressão gênica em larga escala utilizando plantas de soja resistentes *Rpp1* revelou uma regulação positiva na expressão de genes de resposta a estresse oxidativo, como lipoxigenases e peroxidases, sugerindo uma importante função para estes genes na resistência mediada por *Rpp1* (Choi *et al.*, 2008). Uma expressão bifásica também é observada na infecção por *P. pachyrhizi* em plantas de soja com resistência mediada por *Rpp2* (van de Mortel *et al.*, 2007). A resposta transcricional prematura observada em plantas suscetíveis, e tardia em plantas resistentes, pode representar uma resposta geral da soja a reconhecimento não específico de qualquer patógeno, presumivelmente pela interação com microbe-associated molecular patterns (MAMPs) (Mackey and McFall, 2006). Em estudos recentes em *Glycine tomentella*, vários genes diferencialmente expressos durante a infecção por ferrugem asiática foram associados com a via biossintética de flavonoides e fenilpropanoides (Soria-Guerra *et al.*, 2010). Neste estudo, a expressão de isoflavona redutase aumentou em 12 horas após a inoculação no genótipo resistente, mas seu aumento foi defasado até 24 horas no genótipo suscetível. Uma regulação positiva similar de genes desta via em soja também foi observada em plantas *Rpp1*, depois da infecção com isolados compatíveis e incompatíveis de *P. pachyrhizi* (Choi *et al.*, 2008). Choi e colaboradores (2008) reportaram altos níveis de expressão de isoflavona redutase em 24 e 48 horas após a inoculação em plantas suscetíveis e resistentes ao fungo. Com relação a participação de fatores de transcrição na resposta a ferrugem asiática, Choi e colaboradores (2008) mostraram que fatores de transcrição MYB possuem expressão induzida em 12 e 24 horas após inoculação e são reprimidos em 48 horas em soja. Diferentemente, fatores de transcrição WRKY são induzidos em 12 horas após inoculação e reprimidos em 24 e 48 horas. Resultados similares são observados na regulação positiva de fatores WRKY, que ocorre em 12 horas após inoculação no genótipo resistente, mas apenas nos tempos de 24 e 48 horas são induzidos no genótipo suscetível, enquanto que fatores MYB são reprimidos em ambos os genótipos em todos os tempos, em *Glycine tomentella* (Soria-Guerra *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que fatores de

transcrição podem ter ambas as funções positivas e negativas no controle da expressão de genes adicionais envolvidos nas vias de defesa da planta para prevenir a infecção. Outra hipótese é que durante a infecção pode haver interferência na expressão destes genes reguladores por ação da maquinaria molecular do fungo, evitando as respostas da planta hospedeira.

Baseado em análises de expressão em larga escala, aparentemente a indução de genes no tempo é mais relevante que o envolvimento específico de genes para determinar o resultado da interação entre a planta hospedeira e o fungo (van de Mortel *et al.*, 2007). Além disso, o próprio estágio de crescimento da planta pode influenciar o padrão de expressão de genes durante o curso da infecção (Panthee *et al.*, 2009).

Como o estabelecimento da infecção ocorre tardiamente nos cultivares resistentes *Rpp1*, devido provavelmente a esta regulação positiva na expressão de genes associados a estresse oxidativo, os genes *bZIPs* e os genes marcadores utilizados neste estudo podem estar sendo induzidos somente após o estabelecimento da infecção, onde estarão exercendo suas funções. Estudos diversos da função de proteínas *bZIPs* em vias de resposta a patógenos dão suporte às hipóteses das possíveis funções biológicas dos fatores *bZIPs* aqui estudados, na defesa contra a infecção por *P. pachyrhizi* (Alves *et al.*, 2013). As proteínas *GmbZIP62* e *GmbZIP105* são homólogas às proteínas *G/HBF-1* e *SBZ-1* de soja, ambas responsivas ao ataque de patógenos, bem como também apresentam homologia com os fatores *bZIPs* *CPRF-1*, *CPRF-2* e *CPRF-3* de salsa, que ligam-se a um *cis*-elemento funcional que confere resposta a luz, denominado *H-box*, no promotor de *chs15*, que controla a expressão do gene que codifica para chalcona sintase, assim como foi demonstrado para os genes de soja *G/HBF-1* e *SBZ1* (Dröge-Laser *et al.*, 1997; Weisshaar *et al.*, 1991). A proteína chalcona sintase (CHS, EC 2.3.1.74), é uma enzima chave da via de biossíntese de flavonoides, isoflavonoides e fenilpropanóides, e está diretamente envolvida na via de defesa mediada por SA em plantas (Dröge-Laser *et al.*, 1997; Bhuiyan *et al.* 2007, 2009; Vance *et al.* 1980; Pandey *et al.*, 2011). O *cis*-elemento *H-box* tem

sido estudado como um elemento fundamental no promotor de *chs15* para a ativação da transcrição durante a resposta de defesa contra patógenos, através da ligação de fatores de transcrição da família bZIP a este *cis*-elemento (Weisshaar et al., 1991; Loake et al., 1992; Dröge-Laser et al., 1997). Estes dados sugerem uma possível função das proteínas GmbZIP62 e GmbZIP105 como reguladores da expressão de genes da via de biossíntese de flavonoides mediada por SA. Os genes que são controlados pelos fatores GmbZIPE1 e GmbZIPE2 ainda permanecem indeterminados e mais estudos são necessários para elucidação de suas funções na maquinaria de defesa.

Estudos anteriores mostraram que a proteína GmbZIP62 foi capaz de ligar-se a ABREs, bem como plantas de *Arabidopsis* super-expressando GmbZIP62 mostraram-se tolerantes a estresses abióticos diversos, como congelamento e déficit hídrico, sugerindo um possível papel de GmbZIP62 na sinalização de resposta a estresses ambientais mediada por ABA (Liao et al., 2008). Sendo GmbZIP62 homóloga às proteínas G/HBF-1 e SBZ1, de soja, e às proteínas da família CPRF, de salsa, há evidências da possível função desta proteína na resposta global a estresses ambientais em plantas.

5. Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que os genes *bZIPs* analisados, *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2*, estão envolvidos na resposta à infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*, agente causador da ferrugem asiática da soja. Análises de filogenia molecular demonstraram que dois dos genes identificados *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* codificam proteínas do mesmo agrupamento de fatores de transcrição da família *bZIP* conhecidamente responsivos a fungos de ferrugem (*TabZIP*). As outras duas proteínas *bZIP* identificadas *GmbZIP62* e *GmbZIP105* apresentam similaridade com fatores de transcrição sabidamente responsivos a patógenos em soja (*G/HBF-1* e *SBZ1*), sendo que *GmbZIP62* já havia sido caracterizado com relação a sua função na tolerância a estresses abióticos (Liao *et al.*, 2008). A localização nuclear dos genes *GmbZIP62*, *GmbZIP105* e *GmbZIPE2* demonstra o provável papel como fatores de transcrição, porém apenas *GmbZIP62* apresentou capacidade efetiva de transativação. A capacidade de heterodimerização entre *GmbZIP105* e *GmbZIPE1* e de *GmbZIPE2* e *GmbZIPE1* indica que *GmbZIPE1* também pode localizar-se no núcleo da célula através da interação com outros fatores de transcrição *bZIP*. A capacidade de homodimerização de *GmbZIPE1* e de *GmbZIPE2* mostra que estes fatores podem ser funcionais apenas em um complexo. A transcrição dos quatro transfatores analisados foi induzida pelos hormônios de resposta à patógenos, sugerindo a participação destas proteínas em vias de sinalização de defesa durante a interação planta-patógeno. A expressão diferencial dos genes *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* durante a infecção pelo fungo, tanto em plantas suscetíveis quanto em plantas resistentes dão suporte à suposição da participação destes fatores na interação planta-patógeno. A diferença de expressão dos genes *GmbZIP62*, *GmbZIP105*, *GmbZIPE1* e *GmbZIPE2* entre as plantas suscetíveis e resistentes durante a infecção pelo fungo foi principalmente devido ao atraso e diminuição na expressão dos genes *bZIPs* analisados, perfil também observado para genes efetores de defesa *GmPR1*, *GmPR4*, e *GmNAC6*, o que

nos levou a conclusão de que a expressão dos genes GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 são alteradas somente após o estabelecimento da infecção pelo fungo, em resposta a penetração bem sucedida da parede celular de células epidermais ou a formação estável de haustórios dentro das células hospedeiras. Várias vias de resistência à infecção e de respostas a estresses podem estar regulando a atividade transcricional dos genes *bZIPs* estudados. Dentro de um grande número de fatores de transcrição de plantas nossos resultados mostram que os genes GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2 são candidatos importantes para serem avaliados como prováveis genes a criar resistência durável ao fungo *P. pachyrhizi*.

6. Referências

Albani, D., Hammond-Kosack, M. C., Smith, C., Conlan, S., Colot, V., Holdsworth, M., and Bevan, M. W. 1997. The wheat transcriptional activator SPA: A seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *Plant Cell* 9:171-184.

Alves, M.S., Dadalto, S.P., Gonçalves, A.B., De Souza, G.B., Barros, V.A., and Fietto, L.G. 2013. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7815-7828.

Amberg, D. C., Burke, D. J., and Strathern, J. N. 2005. Assay of β -Galactosidase in Yeast: Assay of Crude Extracts. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A., and Chan, R.L. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.* 12(9):419-26.

Bhuiyan, N. H., Liu, W., Liu, G., Selvaraj, G., Wei, Y., and King, J. 2007. Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. *Plant Mol. Biol.* 64:305-318.

Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., and King, J. 2009. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J. Exp. Bot.* 60:509-521.

Bromfield, K.R. 1984. *Soybean Rust*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.

Bromfield, K.R., and Hartwig, E.E. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop. Sci.* 20, 254–255.

Carvalho, C.M., 2008. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*. 55, 869–880.

Chang, Y.C., Nair, M.G., and Nitiss, J.L. 1995. Metabolites of diadzein and genistein and their biological activities. *J Nat Prod* 58:1901– 1905

Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., and Zhu, T. 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*. 14:559–574

Chen, W.Q., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., and Zhu, T. 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*. 14:559–574

Chern, M. S., Eiben, H. G., and Bustos, M. M. 1996. The developmentally regulated bZIP factor ROM1 modulates transcription from lectin and storage protein genes in bean embryos. *Plant J*. 10:135-148.

Choi, J.J., Alkharouf, N.W., Schneider, K.T., Matthews, B.F., and Frederick, R.D. 2008. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. *Funct Integr Genomics*. 8:341–359

Chuang, C. F., Running, M. P., Williams, R. W., and Meyerowitz, E. M. 1999. The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the

determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 13:334-344.

Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, K., and Wu, C. 1990. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell.* 30;63(5):1085-97.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., and Posada, D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics.* 27:1164-1165.

Dietrich, K., Weltmeier, F., Ehlert, A., Weiste, C, Stahl, M., Harter, K., and Dröge-Laser, W. 2011. Heterodimers of the *Arabidopsis* transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell.* 23(1):381-95.

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

Dunham, C.M., Dioum, E.M., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Scott, W.G., and Gilles-Gonzalez, M.A. 2003. A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. *Biochemistry.* 1;42(25):7701-8.

Freitas, R.L., Carvalho, C.M., Fietto, L.G., Loureiro, M.E., Almeida, A.M., and Fontes, E.P. 2007. Distinct repressing modules on the distal region of the SBP2 promoter contribute to its vascular tissue-specific expression in different vegetative organs. *Plant Mol Biol.* 65(5):603-14.

Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y., and Takahashi, Y. 2000. Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional

activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*. 12:901-915.

Garcia, A., Calvo, E.S., de Souza, Kiihl, R.A., Harada, A., Hiromoto, D.M., and Vieira, L.G. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theor Appl Genet*. 117: 545–553

Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., Koch, E., and Schaffrath, U. 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol Plant Pathol*. 11: 169–177.

Halbach, T., Scheer, N., and Werr, W. 2000. Transcriptional activation by the PHD finger is inhibited through an adjacent leucine zipper that binds 14-3-3 proteins. *Nucleic Acids Res*. 15;28(18):3542-50.

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

Hartwig, E.E. and Bromfield, K.R. 1983. Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop. Sci*. 23, 237–239.

Hoefle, C., Loehrer, M., Schaffrath, U., Frank, M., Schultheiss, H., and Hüchelhoven, R. 2009. Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. *Phytopathology*. 99: 220–226.

Huang, J., Wang, J., and Zhang, H. 2005. Rice ZFP15 gene encoding for a novel C2H2-type zinc finger protein lacking DLN box, is regulated by spike development but not by abiotic stresses. *Mol Biol Rep*. 32(3):177–183.

Hyten, D.L., Hartman, G.L., Nelson, R.L., Frederick, R.D., Concibido, V.C., Narvel, J.M. and Cregan, P.B. 2007. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. *Crop. Sci*. 47, 837–838.

Jakoby, M., Weisshaar, M.J.B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F. 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 7, 106–111.

Jones, D.T., Taylor, W.R. and Thornton, J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences.* 8: 275-282.

Katagiri, F., Lain, E., and Chua, N-H. 1989. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature.* 340:727–30.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Res.*, 30:3059-3066.

Kim, K.S., Unfried, J.R., Hyten, D.L., Frederick, R.D., Hartman, G.L., Nelson, R.L., Song, Q., and Diers, B.W. 2012. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the Rpp1 region in diverse germplasm. *Theor Appl Genet.* 125(6):1339-52.

Kuhlmann, M., Horvay, K., Stathmann, A., Heinekamp, T., Fischer, U., Böttner, S., and 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.

Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Oh, S.K., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G., and Harn, C.H. 2002. PPI1: A novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 540–548.

Liao, Y., Zou, H.F., Wei, W., Hao, Y.J., Tian, A.G., Huang, J., Liu, Y.F., Zhang, J.S., and Chen, S.Y. 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

Loake, G.J., Faktor, O., Lamb, C.J., and Dixon, R.A. 1992. Combination of H-box [CCTACC(N),CT] 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*. 89, 9230-9234.

Mackey, D. and McFall, A.J. 2006. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol. Microbiol.* 61,1365–1371.

Miao, Z.H., Liu, X., and Lam, E. 1994. TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol.* 25:1–11.

Miles, M.R., Levy, C., Morel, W., Mueller, T., Steinlage, T., van Rij, N., Frederick, R.D., and Hartman, G.L. 2007. International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. *Plant Disease*. 91: 1450-1458.

Monteros, M.J., Missaoui, A.M., Phillips, D.V., Walker, D.R., Boerma, and H.R. 2007. Mapping and confirmation of the 'Hyuuga' red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. *Crop Sci.* 47: 829–834.

Morceli, T.G.S., Trevisoli, S.H.U., Morceli, J.A.A., Kiih, E.S., di Mauro, A.O. and Garcia, A. 2008. Identification and validation of microsatellite markers linked to the Rpp5 gene conferring resistance to Asian soybean rust. *Pesq.Agropec.Bras.* 43, 1533–1541.

Nakagawa, H., Ohmiya, K., and Hattori, T. 1996. A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J.* 9:217- 227.

Nakashima, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol Plant.* 126:62–71.

Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., and Casaretto, J.A. 2010. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant Cell Environ.* 33, 2191–2208.

Oyama, T., Shimura, Y., and Okada, K. 1997. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 11:2983-2995.

Pandey, A.K., Yang, C., Zhang, C., Graham, M.A., Horstman, H.D., Lee, Y., Zobotina, O.A., Hill, J.H., Pedley, K.F., and Whitham, S.A. 2011. Functional analysis of the Asian soybean rust resistance pathway mediated by Rpp2. *Mol Plant Microbe Interact.* 24(2):194-206.

Panthee, D., Marois, J., Wright, D., Narváez, D., Yuan, J. and Stewart, C. 2009. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. *Theor. Appl. Genet.* 118, 359–370.

Patil, V.S., Wuike, R.V., Thakare, C.S., and Chirame, B.B. 1997. Viability of uredospores of *Phakopsora pachyrhizi* Syd.at different storage conditions. *J Maharashtra Agric Univ.* 22: 260–261.

Ponting, C.P., and Aravind, L. 1999. START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci.* 24(4):130-2.

Reymond, P., and Farmer, E. E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr.Opin. Plant Biol.* 1:404-411.

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

Schindler, U., Beckman, H., and Cashmore, A.R. 1992. TGA I and G-box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-box like element TGACGTGG. *Plant Cell*. 4:1309–19.

Schneider, K.T., van de Mortel, M., Bancroft, T.J., Braun, E., Nettleton, D., Nelson, R.T., Frederick, R.D., Baum, T.J., Graham, M.A., and Whitham, S.A. 2011. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. *Plant Physiol*. 157(1):355-71.

Singh, K., Foley, R.C., and Oñate-Sánchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol*. 5, 430–436.

Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., and Durbin, R. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*, 28:405-20.

Soria-Guerra, R.E., Rosales-Mendoza, S., Chang, S., Haudenschild, J.S., Padmanaban, A., Rodriguez-Zas, S., Hartman, G.L., Ghabrial, S.A., and Korban, S.S. 2010. Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of *Glycine tomentella* during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes. *Theor Appl Genet*. 120(7):1315-33.

Sukumaran, J., and Holder, M.T. 2010. DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26:1569–71.

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

Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamauchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol* 17:113–122.

van de Mortel, M., Recknor, J. C., Graham, M. A., Nettleton, D., Dittman, J. D., Nelson, R. T., Godoy, C. V., Abdelnoor, R. V., Almeida, A. M. R., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2007. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:887-899.

Vance, C. P., Kirk, T. K., and Sherwood, R. T. 1980 .Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:259-288.

Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., and Hahlbrock, K. 1991. Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* 10, 1777-1786.

Xia, N., Zhang, G., Liu, X.Y., Deng, L., Cai, G.L., Zhang, Y., Wang, X.J., Zhao, J., Huang, L.L., and Kang, Z.S. 2010. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Mol Biol Rep.* 37(8):3703-12.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10:88–94.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol.* 57:781–803.

Yang, P.Z., Chen, C.H., Wang, Z.P., Fan, B.F., and Chen, Z.X. 1999. A pathogen and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* 18:141–149

Yin, Y., Zhu, Q., Dai, S., Lamb, C., and Beachy, R. N. 1997. RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus

promoter, functions in vascular development. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16:5247-5259.

Zhang, Y., Zhang, G., Xia, N., Wang, X.J., Huang, L.L., and Kang, Z.S. 2009. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 73, 88–94.

Zwickl, D. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. The University of Texas, Austin, TX.