



JÉSSICA DE CASTRO E ANDRADE

**ANÁLISE DO GENE *OsGLR3.1* NA
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM
TABACO**

**LAVRAS - MG
2016**

JÉSSICA DE CASTRO E ANDRADE

**ANÁLISE DO GENE *OsGLR3.1* NA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT
HÍDRICO EM TABACO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Jéssica de castro e.

Análise do gene *OsGLR3.1* na tolerância ao déficit hídrico em
tabaco / Jéssica de Castro e Andrade. – Lavras: UFLA, 2016.

60 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras,
2016.

Orientador(a): Leandro Eugenio Cardamone Diniz.

Bibliografia.

1. Transformação genética. 2. Receptores de glutamato. 3. Déficit
hídrico. 4. Expressão gênica. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada dia que guiou meus passos, pela proteção, pelo dom da vida e pela minha fé constante.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelas experiências, exemplos e ensinamentos transmitidos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Rosemeiry e Edeilton, e irmãs Joyce e Jeisa, pela preocupação constante, inesgotável paciência, apoio diário e alegria que me impulsionava cada dia. Tudo se tornou mais leve graças a vocês!

Aos meus avós e, em especial, a minha Vó Zita, que me ajudou a me manter em Lavras e me fazer chegar até aqui.

Ao André, pela compreensão, paciência e amor. Obrigada por deixar meus dias mais felizes.

Aos companheiros de Laboratório, pela ajuda na condução do trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela enorme paciência. Vocês tornaram meus dias mais alegres.

À Natália, Luana, Flávia, Marlúcia, Chaiane, Fabiana e Tatiane, pela ajuda inexplicável e apoio sem limites. Não tenho palavras para demonstrar tanto carinho.

Às amigas de república, que foram as melhores companheiras para se conviver e que sempre me incentivarem. Só tenho a agradecer a vocês pelos momentos em que me aguentaram.

Aos meus amigos, que sempre estiveram na torcida. Vocês são sempre especiais.

Ao orientador Dr. Leandro, por tornar possível a realização deste projeto, pelos valiosos ensinamentos, pela preocupação, paciência e confiança.

Ao coorientador Dr. Luciano, pela preocupação constante, pelas sugestões de experimentos, pelos ensinamentos e pela confiança. Obrigada pela ajuda e aprendizado.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Anderson Tadeu, Dr. Leonardo Zebal e Dr. Leandro Cardamone, por aceitarem o convite da defesa do projeto e pela contribuição na correção do mesmo.

A todos não mencionados que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

DEDICO

Ao meu primo Lorenzo,
que sempre torceu por mim.
Acredito que, onde ele estiver,
seu sorriso está estampado no rosto.
Saudades eternas.

RESUMO

A transformação genética possibilita a inserção de genes de interesse no genoma da planta, tornando possível também desde a caracterização funcional do gene inserido até a aquisição de plantas geneticamente modificadas mais tolerantes ao déficit hídrico. A partir da transformação genética de *N. tabacum*, no presente trabalho buscou-se analisar a expressão do gene *OsGLR3.1*, que foi identificado como sendo diferencialmente expresso em plantas de *Oryza sativa* quando submetidas ao déficit hídrico. GLR é uma família de genes receptores de glutamato em plantas, sendo assim chamada devido à similaridade na sequência de aminoácidos que codifica e pela estrutura secundária aos receptores de glutamato ionotrópicos de animais (iGluRs). Explantes foliares de tabaco passaram pelo processo de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Após o cocultivo, os explantes foliares foram inoculados em meio MS + Timentin e agente seletivo PPT. Os brotos vindos do explante e selecionados pelo PPT foram subcultivados *in vitro* até a formação das plântulas. A confirmação das plantas transformadas foi realizada por PCR convencional que amplificou para um amplicon de 413pb. Dos eventos confirmados com a inserção do transgene, dois eventos apresentaram uma única cópia no genoma da planta pela análise em PCR quantitativa. Plantas desses dois eventos de cópia única e plantas controle, que não passaram pelo processo de transformação, foram submetidas ao experimento de déficit hídrico, induzido por PEG6000 (polietilenoglicol). Para verificar a expressão do transgene, as folhas foram coletadas no tempo 0h, 6h e 24h para extração do RNA. Após a extração e a síntese do cDNA, foi realizada a PCR quantitativa para avaliar o perfil de expressão do transgene e de outros genes (*NtDREB2A*, *NtPYR1* e *NtGLR3.4*), determinado pela fórmula de Pfaffl. O perfil de expressão do transgene demonstrou ser constante nas plantas transformadas em condição normal e em condição de estresse induzido e a inserção do gene *OsGLR3.1* afetou moderadamente a expressão dos outros genes avaliados, tornando-se inconclusiva a resposta desse gene à tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Transformação genética. Receptores de glutamato. Déficit hídrico. Expressão gênica.

ABSTRACT

The genetic transformation allows the insertion of genes of interest in the plant genome, making it possible, the functional characterization of the inserted gene until the acquisition of genetically modified plants more tolerant to drought. From the genetic transformation of *Nicotiana tabacum*, this study aimed to analyze the expression of *OsGLR3.1* gene, which was identified as differentially expressed in *Oryza sativa* when submitted to drought. GLR is a family of glutamate receptor genes in plants are so-called because of the similarity in amino acid sequence encoding by the secondary structure and to ionotropic glutamate receptors animals (iGluRs). Tobacco leaf explants underwent the genetic transformation process via *Agrobacterium tumefaciens*. After cocultivation, the leaf explants were cultured on MS medium + Timentin and PPT selection agent. The coming of the explant shoots and selected by PPT were subcultured *in vitro* until the formation of seedlings. Confirmation of transformed plants was performed by standard PCR amplified amplicon for 413pb. The plants confirmed with the insertion of the transgene, two events had a single copy in the genome of the plant by quantitative PCR analysis. These plants and control plants, which have not undergone the transformation process were subjected to water stress experiment induced by PEG6000 (polyethylene glycol). Order to verify the expression of the transgene, the leaves was collected at time 0h, 6h and 24h for RNA extraction. After extraction and cDNA synthesis was performed quantitative PCR to assess the transgene expression profile and other genes (*NtDREB2A*, *NtPYR1* and *NtGLR3.4*) determined by the formula Pfaffl. The transgene expression profile proved to be constant in transformed plants under normal condition and induced stress condition and the insertion of the gene *OsGLR3.1* moderately affected the expression of other genes evaluated and became inconclusive this gene in response tolerance deficit water.

Keywords: Genetic transformation. glutamate receptors. water deficit. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração de uma integração teórica do receptor de glutamato de *A. thaliana* AtGLR3.7 em bicamada lipídica. S1 e S2 compõem os dois locais de ligação ao ligante extracelular, juntamente com o domínio N-Terminal, e M1, M2, M3 e M4 compõem os quatro domínios transmembranares ligados ao domínio C-terminal intracelular. Adaptado de Weiland, Mancuso e Baluska (2015). 19
- Figura 2 - Esquema representativo da sinalização ABA-dependente. Após a biossíntese de ABA, este se liga ao complexo PYR/PYL/RCAR, induzindo uma mudança conformacional destas moléculas. As proteínas inativadoras PP2C reconhecem PYR/PYL/RCAR + ABA, diminuindo a afinidade com as proteínas SnRK2. Assim, as SnRK2 são capazes de ativar outras proteínas ou fatores de transcrição *downstream* e, assim, continuar com a resposta ao estresse hídrico. Adaptado de Kuromori et al. (2014). 24
- Figura 3 - Esquema ilustrativo do cassete gênico inserido no vetor binário p7i2x, demonstrando o gene marcador de seleção (amarelo), flanqueado pelo promotor 35S (cinza) e terminador E9 (vermelho) e o gene de interesse *OsGLR3.1* (azul), flanqueado pelo promotor da Ubiquitina (verde) e terminador NOS-T (vinho). 27
- Figura 4 - Etapas do processo de transformação de tabaco. (A) Folhas de tabaco da planta controle e (B) folhas de tabaco transformadas em meio MS com agente seletivo (herbicida fosfinotricina PPT – 2 mg.L-1); (C) estágios iniciais da formação de brotos no meio de seleção; (D) desenvolvimento da parte aérea e (E) plântula de tabaco enraizando *in vitro*. 38
- Figura 5 - Fragmentos amplificados por PCR para o gene de interesse das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com a construção de interesse. M - 1 kb (Invitrogen), 1 a 16 - plantas regeneradas da transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, C+: controle positivo (plasmídeo), C-: controle negativo (água) e PC- (planta de tabaco selvagem). As setas indicam o tamanho do fragmento amplificado. 40
- Figura 6 - Plantas de tabaco em meio líquido com PEG e vermiculita. 42
- Figura 7 - Análise visual das plantas controle e transformadas (E13 e E14), em condições de estresse induzido por PEG 6000, nos três tempos analisados (0, 6 e 24 horas). 43
- Figura 8 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *OsGLR3.1*. As barras azuis correspondem às

- amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.....46
- Figura 9 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *NtDREB2A*. As barras amarelas correspondem às amostras controle, as barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.48
- Figura 10 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *NtPYR1*. As barras amarelas correspondem às amostras controle, as barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.50
- Figura 11 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *NtGLR3.4*. As barras amarelas correspondem às amostras controle, as barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estimativas do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em linhagens T0 de tabaco.....41
- Tabela 2 - Informações gerais sobre os genes analisados e os genes de referências utilizados para a normalização.....45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	A espécie <i>Nicotiana tabacum</i> L.	15
2.2	Transformação genética via <i>agrobacterium</i>	16
2.3	Família GLR e o gene <i>OsGLR3.1</i>	18
2.4	Déficit hídrico	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Material vegetal.....	26
3.2	Descrição do plasmídeo.....	26
3.2.1	Confirmação do vetor em <i>A. tumefaciens</i>	27
3.3	Transformação genética e regeneração	28
3.4	Extração do DNA genômico	30
3.5	Confirmação das plantas transformadas via PCR e análise do número de cópias	31
3.6	Multiplicação e enraizamento	32
3.7	Experimento de estresse induzido.....	33
3.8	Expressão gênica.....	33
3.8.1	Extração de RNA total.....	33
3.8.2	Tratamento com DNase e síntese de cDNA	34
3.8.3	Busca de sequências homólogas e desenho de <i>primers</i>	35
3.8.4	RT-qPCR.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Transformação genética e seleção dos transformantes	37
4.2	Confirmação da transformação	39
4.3	Análise do número de cópias	40
4.4	Estresse induzido por PEG 6000.....	42
4.5	Análise da expressão gênica por RT-qPCR	44
4.5.1	Eficiência dos <i>primers</i>	44
4.5.2	Expressão do gene <i>OsGLR3.1</i>	46
4.5.3	Expressão do gene <i>NtDREB2A</i>	47
4.5.4	Expressão do gene <i>NtPYR1</i>	49
4.5.5	Expressão do gene <i>NtGLR3.4</i>	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O grande desafio da era pós-genômica no estudo da biologia vegetal é a elucidação da função gênica, seja para identificar novos genes alvos ou para desenvolver estratégias eficientes para manipulação genética de plantas mais resistentes a estresses ambientais ou que apresentem características novas e de interesse biotecnológico.

Os métodos de análise genômica, como sequenciamento, banco de dados e mapeamento gênico, são utilizados para produzir, em prazos cada vez mais curtos, uma grande quantidade de informações que levem à predição de genes. Entre elas, outras estratégias são empregadas para esse fim, como a transferência genética e a análise da expressão gênica, que apresentam vantagens importantes em termos de eficiência para a análise funcional.

A técnica de inserção de um gene por transferência genética em uma planta modelo, como o tabaco (*Nicotiana tabacum*), é vantajosa, pois apresenta ciclo de vida curto, em torno de seis meses, métodos de transformação bem estabelecidos, fácil propagação e regeneração e tem genoma bem estudado.

O estudo de genes da família GLR, denominada receptores de glutamato, se torna imprescindível devido à escassez de informações acerca da função e da composição da estrutura de alguns genes de culturas economicamente importantes, como o arroz, sendo mais elucidado na literatura informações dos genes em *Arabidopsis thaliana*. Estudos referem-se a eles, primeiramente, pela similaridade das sequências de aminoácidos e pela estrutura secundária aos receptores de glutamato ionotrópicos de mamíferos. São proteínas de membrana responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} nas células, ativado por glutamato.

Isto posto, a partir da transformação genética de *N. tabacum*, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a expressão do gene

OsGLR3.1, que foi identificado como sendo diferencialmente expresso em plantas de *Oryza sativa* submetidas ao déficit hídrico em estudos prévios (dados não publicados).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie *Nicotiana tabacum* L.

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) é uma planta herbácea pertencente à família *Solanaceae*. É considerado um híbrido provável entre *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis* (GOODSPEED, 1956), constituindo um alotetraploide ($2n = 4x = 48$). Essa dicotiledônea tropical tem como origem provável a América do Sul, mais precisamente o noroeste da Argentina e a região dos Andes (WEBSTER, 1982).

Esta planta é utilizada como modelo para vários estudos, devido ao seu ciclo de vida curto, em torno de seis meses, facilidade de cultivo *in vitro*, e facilidade de transformação e regeneração das plantas transgênicas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). Ela produz em torno de 1.000 sementes por lóculo (HUANG; RUSSEL, 1992), tem órgãos florais grandes e de fácil manuseio, além de estar bem adaptada a climas tropicais.

Em estudos anteriores, novos genes oriundos de outras plantas foram transferidos para o tabaco para investigação de sua função. Xiao et al. (2015) estudaram a função do gene *CaPAO* isolado de *Capsicum annuum* L. em plantas transgênicas de tabaco, para a caracterização de *PAO* na senescência foliar.

A utilização de plantas de tabaco transgênicas superexpressando o gene *TaCRT1* de *Triticum aestivum* foi feita com sucesso para a compreensão desse gene em resposta ao estresse salino (XIANG et al., 2015). Lubini (2012) caracterizou, em plantas de tabaco transformadas geneticamente, o gene *CDKG2* de *Arabidopsis*, em que a proteína CDK em interação com a proteína SC11 inibiu a proliferação celular do estilete/estigma no desenvolvimento floral.

O genoma de *N. tabacum*, bem como os genomas de *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*, foi sequenciado pelo Project Management Institute (PMI)

(SIERRO et al., 2014) e está disponível em banco de dados como o GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e o *SOLanaceae Genomics Network* (SOL).

2.2 Transformação genética via *agrobacterium*

A transformação genética surgiu como uma ferramenta para o melhoramento genético clássico que permite a introdução de genes de interesse em genótipos elite. Dessa forma, é possível não somente a obtenção de variedades superiores em um menor espaço de tempo, como também transmitir características de espécies que, normalmente, são sexualmente incompatíveis. É particularmente importante em culturas perenes e espécies em que o desenvolvimento de novas cultivares é, muitas vezes, difícil, devido ao seu tempo de geração (VALDETARO et al., 2011).

A transferência de genes para espécies vegetais tem sido possível graças à manipulação genética de células, utilizando métodos diretos ou indiretos de transformação. Os métodos diretos não requerem a utilização de vetores biológicos, podem ser realizados por métodos físicos e químicos, ressaltando a técnica da biobalística. O método indireto é aquele no qual se utiliza um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* (SANTARÉM, 2000) ou *A. rhizogenes* (BRASILEIRO; DUSI, 1999), intermediando a transferência de genes.

Agrobacterium é encontrada no solo e causa patologia em plantas, sendo importante para os estudos de transformação de plantas pela sua capacidade natural de introduzir DNA em plantas hospedeiras. Esse DNA é integrado e passa a ser expresso como parte do genoma da planta (HOHN, 1992).

A. tumefaciens é uma das cinco espécies do gênero *Agrobacterium* que podem penetrar em plantas, principalmente nas dicotiledôneas, causando a galha-da-coroa. Esta bactéria tem um plasmídeo indutor de tumor denominado

Ti, o qual contém as regiões necessárias para a translocação e a inserção do T-DNA nas células da planta hospedeira, que passa a produzir hormônios vegetais e opinas (compostos sintetizados para a nutrição da bactéria) (VALDETARO et al., 2011). Nessa região existem genes, entre eles os oncogenes, responsáveis pela patogenicidade da bactéria (GASSER; FRALEY, 1989). Estes são, então, excluídos, obtendo-se uma linhagem “desarmada” e o segmento de DNA de interesse é inserido entre as extremidades da região-T ou, então, é utilizado um vetor binário contendo esse segmento flanqueado pelas bordas esquerda e direita, indispensáveis para o procedimento de infecção (BRASILEIRO, 2002; SARTORETTO et al., 2008).

Para uma eficiência na técnica de transformação genética são necessários alguns pré-requisitos, como, por exemplo, a construção de um vetor contendo o gene de interesse, o método de infecção empregado, incluindo condições de cocultivo, o tipo de cepa bacteriana, a seleção do tecido transgênico e um eficiente protocolo de regeneração de plantas (GIRIJASHANKAR, 2011).

A transformação por meio de *Agrobacterium* tem vantagens, como a possibilidade da transferência de uma ou poucas cópias de um fragmento de DNA contendo o gene de interesse, com maior eficácia e menores custos, quando comparado com os métodos de transferência direta de genes, como a biobalística e a eletroporação (ANDRADE, 2001).

Em vários estudos utiliza-se a técnica de transformação genética para a caracterização de promotores, genes e proteínas que foram isolados de culturas agronomicamente importantes, introduzindo-os em plantas modelo, como *A. thaliana* e *N. tabacum*. Lambret-Frotté et al. (2016) utilizaram a transformação genética de *Arabidopsis* para a caracterização da região promotora de GhAO-like1 isolada de *Gossypium hirsutum*, que tem um padrão de expressão específico de flor e fruto.

2.3 Família GLR e o gene *OsGLR3.1*

GLR é uma família de genes receptores de glutamato em plantas, sendo assim chamada devido à similaridade na sequência de aminoácidos que codifica e pela estrutura secundária aos receptores de glutamato ionotrópicos de animais (iGluRs) (LAM et al., 1998). Em cérebros de animais, esses receptores de glutamato funcionam como canais iônicos não seletivos de íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} ativados por glutamato na transmissão rápida de sinapse (DINGLELINE et al., 1999).

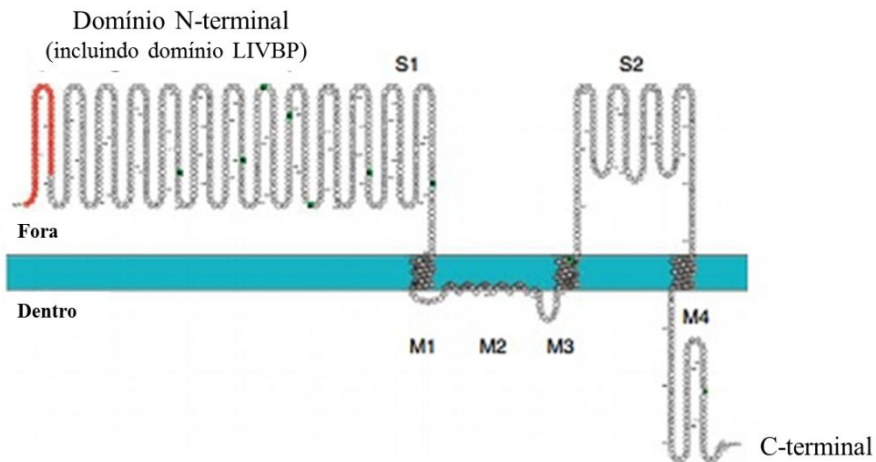
Pelo sequenciamento do genoma de *A. thaliana* foi encontrado um total de 20 genes que codificam para as subunidades de receptores de glutamato (LACOMBE; BECKER; HEDRICH, 2001; LAM et al., 1998). Os genes *AtGLRs* receptores de glutamato agem como sensores e mediadores para uma multiplicidade de sinais exógenos e endógenos em plantas (WEILAND; MANCUSO; BALUSKA, 2015).

A estrutura destes genes funciona como proteínas integrais de membrana. GLRs de planta mediam os primeiros fluxos de Ca^{2+} através de membranas, após a sua ativação por ligantes e controlam um grande número de eventos fisiológicos e de desenvolvimento a jusante da sinalização de cálcio (SINGH et al., 2014). Completa compreensão da sinalização de glutamato e GLRs em plantas é de importância eminente para explicar várias funções da planta, abrangendo a sinalização de longa distância, o desenvolvimento e a nutrição, a adaptação ao estresse, a fotossíntese e o metabolismo de carbono, bem como reações de defesa simbióticas e imunológicas (WEILAND; MANCUSO; BALUSKA, 2015).

AtGLRs contém seis domínios conservados que são encontrados também em animais de iGluR (LAM et al., 1998). Estes domínios podem ser funcionalmente divididos em dois locais de ligação ao ligante extracelular (S1,

S2) e quatro domínios transmembranares (M1, M2, M3 e M4) que permitem a ligação e a passagem de íons (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração de uma integração teórica do receptor de glutamato de *A. thaliana* AtGLR3.7 em bicamada lipídica. S1 e S2 compõem os dois locais de ligação ao ligante extracelular, juntamente com o domínio N-Terminal, e M1, M2, M3 e M4 compõem os quatro domínios transmembranares ligados ao domínio C-terminal intracelular. Adaptado de Weiland, Mancuso e Baluska (2015).



É muito provável que GLRs de plantas sejam capazes de se conectar a ligantes diferentes, dependendo da composição das duas subunidades do complexo receptor. Tendo em vista que 20 GLRs existem em *A. thaliana*, enquanto cada uma das subunidades é capaz de vincular dois ligantes (particulares), o número de possibilidades de composições complexas para cada receptor é enorme e ajuda explicar o envolvimento de GLRs em muitos aspectos fisiológicos diferentes, tais como metabolismo de carbono, sinalização do ácido abscísico e arquitetura da raiz, entre outros (WEILAND; MANCUSO; BALUSKA, 2015).

Um dos domínios de conexão ao ligante localiza-se perto da extremidade N-terminal e apresenta similaridade com a proteína de ligação leucina/isoleucina/valina (LIVBP) do domínio. Este domínio pode cumprir uma função moduladora do complexo receptor em se ligar a uma segunda molécula. Potenciais ligantes adicionais são a proteína LIVBP ou agentes completamente diferentes (ACHER; BERTRAND, 2005).

Estudos dos padrões de expressão da família *AtGLR* têm mostrado que os seus transcritos estão amplamente distribuídos ao longo das plantas e que todos os 20 genes são expressos também nas raízes de *A. thaliana*. Alguns genes parecem mostrar uma preferência para a expressão de raiz, com cinco de nove genes sendo expressos especificamente nas raízes com oito semanas de idade (CHIU et al., 2002).

Oryza sativa L. é outra espécie de planta em que GLRs são caracterizados. O genoma do arroz codifica 24 receptores de glutamato diferentes (*OsGLR*) (LI; ZHU; SONG, 2006; SINGH et al., 2014). Eles se agrupam em quatro grupos, sendo que os grupos I, II e III parecem ter um ancestral comum com *A. thaliana*. No entanto, o grupo IV é específico de arroz e surgiu, provavelmente, por duplicação gênica e uma mutação na sequência de um destes genes (SINGH et al., 2014).

Todos os receptores encontrados em arroz contêm os seis domínios conservados, bem como todos os aminoácidos invariantes da família de genes *AtGLR*, mostrando sua relação com *Arabidopsis* ou de um antepassado comum a ambos (LI; ZHU; SONG, 2006). O domínio M2 é muito semelhante a uma subunidade de receptor de cainato, mas a região do poro de arroz GLR contém um quinto domínio transmembranar adicional (LI; ZHU; SONG, 2006; SINGH et al., 2014). Sua função é até agora desconhecida, mas ele poderia mudar, melhorar ou medir a seletividade de íons do complexo receptor formado (LI; ZHU; SONG, 2006).

A genética reversa de superexpressão ou nocaute tem sido adotada para investigar o papel de genes específicos, como *AtGLRs*. Como exemplo desses estudos, demonstraram que GLRs 3.2 e 3.4 são capazes de interagir fisicamente um com o outro no floema e que inserção de T-DNA mutante de ambos, *glr3.2* e *glr3.4*, exibiu um aumento substancial nos primórdios de raízes laterais em plântulas de *Arabidopsis* (VINCILL et al., 2013).

O nocaute de *OsGLR3.1* foi associado com o rompimento da coifa em desenvolvimento, a redução do tamanho do centro quiescente, o declínio na expansão radial, a cessação da atividade meristemática da raiz e, em última análise, a morte celular no ápice da raiz (LI; ZHU; SONG, 2006).

Em outros estudos, os mutantes de dois genes de *Arabidopsis*, *GLR3.3* e *GLR3.4*, exibiam despolarização da membrana e concentração de Ca^{2+} prejudicadas em respostas ao glutamato extracelular e outros aminoácidos, em comparação com o tipo selvagem, sugerindo que estes genes estão direta ou indiretamente envolvidos na percepção de aminoácidos extracelular (QI; STEPHENS; SPALDING, 2006).

Kim et al. (2001) superexpressaram constitutivamente *AtGLR3.2*, o que levou a sinais de deficiência de Ca^{2+} e a uma hipersensibilidade a K^+ e Na^+ . Na base destes resultados, *AtGLR3.2*, que é o mais abundante expresso em tecidos vasculares, tem um papel proposto na distribuição de Ca^{2+} dentro da planta.

Experimentos sobre a adaptação do estresse da planta demonstraram rápida resposta a este estímulo na forma de uma expressão genética alterada de vários *AtGLRs* (MEYERHOFF et al., 2005). A tolerância à seca é uma característica importante de plantas, pois a maioria delas encontrou a falta de água regularmente. As consequências para as plantas são graves, considerando os distúrbios osmóticos e iônicos dentro dos organismos que, entre outros, levam a uma perda da função da proteína (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).

GLRs como canais de Ca^{2+} são potencialmente esperados para cumprir um papel pivô na mediação de sinais de estresse de seca. Uma superexpressão dos dois receptores de glutamato *OsGLR1* e de *OsGLR2* de *O. sativa* foi encontrada para aumentar a tolerância à seca, não só em arroz, mas também quando estes receptores são expressos heterogeneamente em *Arabidopsis* (LU et al., 2014).

2.4 Déficit hídrico

Em condições naturais, as plantas são, muitas vezes, expostas a vários estresses ambientais. A seca é um dos mais importantes e prevalentes fatores de estresse para plantas em muitas partes do mundo, especialmente nas zonas áridas e semiáridas (MADHAVA et al., 2006).

O estresse pode afetar negativamente a quantidade e a qualidade do crescimento das plantas e a produtividade (NEZHADAHMADI; FARUQ, 2013), o crescimento, a integridade da membrana, o conteúdo de pigmentos, a relação hídrica e a atividade fotossintética da planta, sendo estas respostas fisiológicas de curto ou longo prazo (TAIZ; ZEIGER, 2013) e, geralmente, levam a mudanças fisiológicas, morfológicas, ecológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas (BHARGAVA; SAWANT, 2013).

No déficit hídrico as respostas das plantas dependem da duração e da gravidade da deficiência de água, da espécie vegetal, da idade e do estágio de desenvolvimento (NOGUEIRA et al., 2001). Há várias razões para o déficit de água nas plantas, incluindo baixa pluviosidade, salinidade, temperaturas altas e baixas, e alta intensidade de luz, entre outros.

Muitas plantas desenvolveram mecanismos de resistência para tolerar o déficit hídrico, sendo estes mecanismos variados e dependentes das espécies de cada planta. Existem várias formas de tolerância à seca em plantas, incluindo

fisiológica, morfológica, ecológica, bioquímica, e mecanismos moleculares. Normalmente, os mecanismos envolvidos na planta tolerante à seca seguem um plano geral: manutenção da homeostase de água da célula em condições de seca. Isso é possível, principalmente, ao bloqueio à perda de água e ao aumento da entrada de água para as células, o que, eventualmente, leva para as funções celulares normais (ASHRAF; OZTURK; ATHAR, 2009).

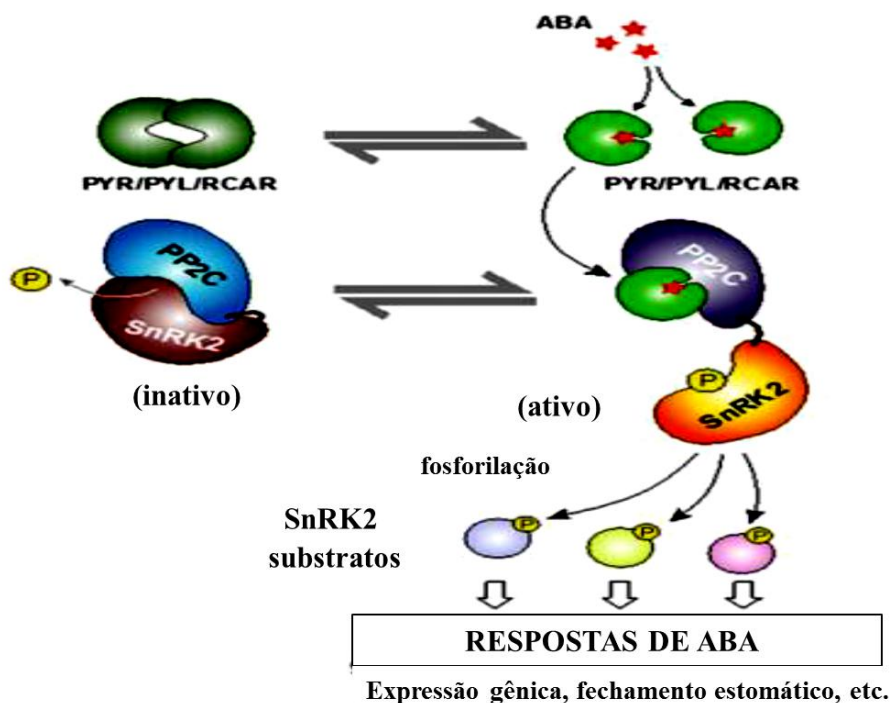
Uma das respostas mais conhecidas contra o déficit hídrico é a síntese do ABA (ácido abscísico) e a sua sinalização. Este hormônio, além de ser essencial para respostas de curto e longo prazo contra estresses ambientais, como o controle da abertura estomática, redução da área foliar, crescimento radicular e mudança da arquitetura da raiz, atua também na dormência de sementes e maturação de frutos (ZHANG et al., 2014).

A biossíntese do ABA inicia-se com a epoxidação dos compostos zeaxantina e anteraxatina para violaxatina, sendo essa reação catalisada pela zeaxantina epoxidase (ZEP) (CHRISTMANN et al., 2006).

Após sua biossíntese, o ABA liga-se ao complexo proteico PYR/PYL/RCAR [*Pyrabactin Resistance1* (Pyr1)/PYR1-Like (PYL)/*Regulatory Components of ABA Receptors* (RCAR)], o qual apresenta domínios hidrofóbicos que reconhecem este fito-hormônio, mudando sua conformação para um estado mais compacto (Figura 2) (NISHIMURA et al., 2013). Nesta etapa, inicia-se a cascata responsiva ABA-dependente. Por meio de análises de interação de proteínas, foi verificado que as proteínas PYR/PYL/RCAR, após o reconhecimento e a ligação com o ABA, interage com proteínas da família PP2C (*2C-type Protein Phosphatases*) (PARK et al., 2009). Em virtude da sua função de defosforilação, PP2C apresenta uma interação negativa com proteínas kinase da subclasse III da família SnRK2 (*SNF1-related protein kinase 2*). No entanto, ao se ligar com as proteínas PYR/PYL/RCAR, a PP2C diminui a interação,

ativando a função cinase das proteínas SnRK2 (ZHANG et al., 2014), tornando possível a cascata responsiva ABA-dependente (Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo da sinalização ABA-dependente. Após a biossíntese de ABA, este se liga ao complexo PYR/PYL/RCAR, induzindo uma mudança conformacional destas moléculas. As proteínas inativadoras PP2C reconhecem PYR/PYL/RCAR + ABA, diminuindo a afinidade com as proteínas SnRK2. Assim, as SnRK2 são capazes de ativar outras proteínas ou fatores de transcrição *downstream* e, assim, continuar com a resposta ao estresse hídrico. Adaptado de Kuromori et al. (2014).



Apesar de a cascata ABA-dependente ser crucial para a resposta da planta ao estresse hídrico, alguns genes se expressam em mutantes cuja sinalização de ABA foi comprometida, sugerindo uma rota ABA-independente (AGARWAL; JHA, 2010). Após a percepção do estresse, fatores de transcrição são expressos e

desempenham uma função regulatória em genes denominados funcionais. Alguns destes fatores de transcrição reconhecem a sequência DRE (*Dehydration-Responsive Element* - TACCGACAT) presente em vários genes induzidos por desidratação (ROYCHOUDHURY; PAUL; BASU, 2013). Vários membros pertencentes à família DREB/CRT (*DRE-Binding Protein/CRT-Binding fator*) já foram caracterizados em diversas espécies, tais como *A. thaliana* (LIU et al., 2000), *Glycine max* (MIZOI et al., 2013) e *O. sativa* (MATSUKURA et al., 2010), entre outras, demonstrando ter alta expressão em plantas sob estresse hídrico, além de aumentar a tolerância em plantas geneticamente modificadas (CHEN et al., 2007; KASUGA et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular, localizado na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

3.1 Material vegetal

Sementes de *N. tabacum* cv. SRI foram esterilizadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% acrescido de Tween-20 0,01%, por 15 minutos e lavadas seis vezes em água estéril. As sementes foram semeadas em frascos de vidro contendo 50 mL de meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose. As culturas foram mantidas a 28 °C, sob fotoperíodo de 16 horas por quatro semanas.

As folhas das plântulas foram removidas após o período descrito e cortadas em segmentos de 1 cm² com o auxílio de lâmina de bisturi estéril, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril para manter os explantes hidratados, os quais foram utilizados nos experimentos de transformação genética.

3.2 Descrição do plasmídeo

O vetor binário utilizado foi o p7i2x, cujo cassete gênico inserido contém um promotor da Ubiquitina, o gene *OsGLR3.1*, um terminador NOS-T e o gene marcador de seleção de plantas *Bar*, o qual confere resistência ao herbicida fosfinotricina (PPT), flanqueado pelo promotor constitutivo 35-S e o terminador E9 (Figura 3). Este vetor binário também contém o gene de resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina utilizados para a seleção das bactérias transformadas.

Figura 3 - Esquema ilustrativo do cassete gênico inserido no vetor binário p7i2x, demonstrando o gene marcador de seleção (amarelo), flanqueado pelo promotor 35S (cinza) e terminador E9 (vermelho) e o gene de interesse *OsGLR3.1* (azul), flanqueado pelo promotor da Ubiquitina (verde) e terminador NOS-T (vinho).



3.2.1 Confirmação do vetor em *A. tumefaciens*

Foram utilizadas para este trabalho cepas de *A. tumefaciens* LBA 4404 transformadas com o gene *OsGLR3.1*, mantidas em estoque de glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA. Para confirmar a presença do vetor nestas bactérias, foi realizada uma PCR utilizando o *primer* para o gene alvo. Cerca de $10\text{ }\mu\text{L}$ do estoque da *Agrobacterium* foram inoculados em 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos espectinomomicina $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ e estreptomomicina $300\text{ }\mu\text{g/mL}$ e crescidos, a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 horas, sob agitação a 200 rpm . Após este período, foi realizada a extração do DNA plasmidial a partir do protocolo de lise alcalina utilizado nas extrações dos plasmídeos de *E. coli*.

Para o protocolo de lise alcalina foram retirados 2 mL e transferidos para microtubos, centrifugados a 16.000 g , durante 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com $200\text{ }\mu\text{L}$ de uma primeira solução (50 mM TRIS , 10 mM EDTA , $0,1\text{ g/L RNase A}$, a um pH de $8,0$), utilizando vórtex. Para a lise celular foram adicionados $200\text{ }\mu\text{L}$ de uma segunda solução alcalina (200 mM NaOH e 1% p/v SDS) e, sucessivamente, mais $200\text{ }\mu\text{L}$ de uma terceira solução ($3\text{M acetato de potássio}$ pH $5,5$).

As amostras permaneceram 10 minutos em gelo e foram centrifugadas, a 16.000 g, durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, contendo 450 μ L de isopropanol, para a precipitação do DNA plasmidial. Os microtubos permaneceram em temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugados, novamente, a 16.000 g, durante 10 minutos, para a formação do pellet contendo o plasmídeo. O álcool isopropílico foi retirado para acrescentar o etanol 70%, no intuito de lavar o pellet. O etanol foi descartado e o pellet ressuscitado com 20 μ L do tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH de 8,0). Em seguida, o DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000).

A amplificação do gene de interesse foi feita em um volume final de 25 μ L, utilizando 1 U da GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 μ L tampão 5X, 0,6 mM dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 1 μ M de *primer forward* TGCGGACAGTTGGCTATTGG e reverse ATATCCCCTATTGCTGCGTC do gene, 5% de DMSO e 10 ng/ μ L de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 15 minutos; 40 ciclos de amplificação compostos de três etapas: 94 °C, por 30 segundos; 55 °C por 1min30; 72 °C, por 1min30, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE sob uma voltagem de 80 V, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

3.3 Transformação genética e regeneração

Após confirmação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo os antibióticos espectinomicina (100 mg.L⁻¹) e estreptomicina (300 mg.L⁻¹), sendo mantidas a 28 °C, por 48 horas. Colônias isoladas foram

cultivadas em 5 mL de meio de cultura líquido LB acrescido dos mesmos antibióticos, a 28 °C, em agitador rotativo com 300 rpm por 6 horas. Após 6 horas de incubação, 3 mL desse pré-inóculo foram transferidos para 7 mL de meio LB contendo os mesmos antibióticos para crescimento a 28 °C (300 rpm) até atingir OD 600 = 0,6 (aproximadamente 16 horas).

As células bacterianas foram precipitadas a 2.300 g, por 10 minutos e ressuspendidas para OD600 = 0,2 em meio LB suplementado com 200 µM de acetoseringona previamente aquecida a 37 °C, por 10 minutos.

Foi adicionado 1 mL de cultura diluída de *A. tumefaciens* em 10 mL de LB. Os explantes foliares de *N. tabacum* cv. SRI foram cortados de forma a desprezar a nervura central e as extremidades, tendo o cuidado de evitar ferimentos na folha. Foram, então, imersos no inóculo e mantidos em cocultivo, à temperatura ambiente, por 5 minutos, sob leve agitação manual. Os explantes foram transferidos para placas de Petri com papel filtro estéril para retirar o excesso de bactérias e, posteriormente, inoculados, mantendo a face adaxial dos explantes em contato com o meio, em placas contendo meio MS sólido suplementado com 3% de sacarose e BAP (1,13 mg.L⁻¹), por 48 horas, a 28 °C, no escuro. Para controle foram imersos explantes em meio LB sem cultura bacteriana.

Após o cocultivo, os explantes foram transferidos para meio de regeneração, constituído por meio basal MS suplementado com 3% de sacarose, BAP (2,25 mg.L⁻¹), Timentin® (300 mg.L⁻¹) e agente seletivo PPT (2 mg.L⁻¹), e mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 28 °C, por duas semanas.

Os brotos formados a partir dos explantes transformados foram excisados e transferidos para o meio MS sólido, suplementado com 3% de sacarose, Timentin® (300 mg.L⁻¹) e suplementado com PPT (2 mg.L⁻¹), para seleção e multiplicação das plantas transformadas. Uma vez que as amostras de

folha foram coletadas, elas foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o dia da extração.

3.4 Extração do DNA genômico

O DNA genômico de folhas de *N. tabacum* foi extraído pelo método de Doyle e Doyle (1987) com modificações. As amostras congeladas foram maceradas (200 mg de tecido) utilizando um cadinho contendo nitrogênio líquido e o material macerado foi, posteriormente, transferido para um tubo de 2 mL, dentro da capela, para o acréscimo de 750 µL do tampão CTAB (2% p/v CTAB; 2,5% p/v de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0), juntamente com 3 µL de β-mercaptoetanol e homogeneizado por 30 segundos com vórtex. As amostras foram incubadas em Thermomixer Confort (*Eppendorf*), durante 60 minutos, a 65 °C, sendo homogeneizadas por inversão a cada 10 minutos.

Após este período foi adicionado um volume (753 µL) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) mantendo a agitação por vórtex. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas, por 10 minutos, a 9.300 g, a 4 °C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para novo tubo. Foi adicionado, novamente, 1 volume (na mesma proporção do sobrenadante que foi retirado) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v), mantendo sob agitação. Após esse processo, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo previamente identificado em que foram adicionados 3 µL de RNase (10 mg.L⁻¹). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas em banho seco, a 37 °C, por 30 minutos.

Para a precipitação do DNA, a cada amostra foi adicionado 0,6 do volume (450 µL) de álcool isopropílico, sendo homogeneizado por inversão em torno de 30 vezes e incubado, a -20 °C, por 60 minutos. Após esta etapa, uma

nova centrifugação, por 20 minutos, a 16.100 g, a 4 °C, foi realizada e, desta vez, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado, por 3 minutos, a 16.100 g. Após a retirada do etanol e a secagem do pellet, este foi ressuspensionado com 30 µL do tampão TE ou água Milli-Q. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000).

3.5 Confirmação das plantas transformadas via PCR e análise do número de cópias

A confirmação da presença do gene *OsGLR3.1* foi realizada por análise de PCR, utilizando 1 U da GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 µL tampão 5X, 0,6 mM de dNTP mix, 1,75 mM de MgCl₂, 2 µL de *primer forward* TGCGGACAGTTGGCTATTGG e *reverse* ATATCCCCTATTGCTGCGTC do gene *OsGLR3.1* e 10 ng/µL de DNA, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 25 µL. Com esta reação obteve-se a amplificação de um fragmento de 413 pb nas plantas transformadas.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf® Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 15 minutos, 40 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 94 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 1 minuto e 30 segundos; 72 °C, por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m.v⁻¹), corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), sob corrente elétrica de 110 V em tampão TAE (0,001 M EDTA pH 8,0; 0,04 M TRIS pH 8,0; 0,02 M ácido acético), por um período de, aproximadamente, 90 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador (EDAS 290, Kodak®).

Com o DNA das plantas confirmadas pela PCR para o gene *OsGLR3.1* foi realizada uma nova PCR, nas mesmas condições descritas anteriormente, porém, com os *primers* para amplificação do gene da estreptomicina. Essa etapa é importante para confirmar que não houve contaminação com DNA plasmidial na extração do DNA genômico, comprovando, assim, que as plantas estão realmente transformadas. Após confirmação dos eventos via PCR, foi avaliado o número de cópias inserido no genoma da planta. Reações de PCR quantitativa foram conduzidas no equipamento *ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)* com três réplicas técnicas. Para a amplificação, cada reação continha um volume total de 10 µL com 50 ng de DNA, 5 µL 1X SYBR® Green (*Applied Biosystems*) e 0,6 µM dos *primers* específicos de cada gene. As condições das reações ocorreram durante 2 minutos, a 50 °C; 10 minutos, a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 10 minutos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizadas por 15 segundos a 95 °C. As eficiências de amplificação para cada par de *primers* (E) foram determinadas pelo programa *LinRegPCR* versão 11.0 (<http://LinRegPCR.nl>). Como referência de cópia única foram utilizados os *primers* para o gene *Axi1* (SUBR; NOVÁKOVÁ; DRAHOVSKÁ, 2006) de tabaco e para o transgene, *primers* do gene *bar* (marcador de seleção no cassete de transformação).

3.6 Multiplicação e enraizamento

As plantas de *N. tabacum* cv. SRI contendo uma única cópia do gene *OsGLR3.1* foram multiplicadas e enraizadas em meio MS suplementado com 3% de sacarose e Timentin® (300 mg.L⁻¹), sob ação do agente seletivo.

3.7 Experimento de estresse induzido

A partir do resultado da PCR e da análise do número de cópias, dois eventos transformantes foram selecionados para o experimento de estresse induzido por polietilenoglicol 6000. Para tal, plantas que não passaram pelo processo de infecção (Controle) e os eventos transformantes foram micropropagados *in vitro* em meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,7 g L⁻¹ de phytigel como agente gelificante, até atingirem 60 plantas de cada evento.

Posteriormente, metade das plantas, tanto controle como transformadas, foi cultivada em condições normais, somente com meio MS basal, e a outra parte sob condição de estresse induzido, com meio MS basal acrescido de 200 g.L⁻¹ de PEG6000, a 27 °C, mimetizando um potencial hídrico de -0,5MPa. Em ambas as condições, as amostras foram representadas em triplicata biológica, coletadas em três tempos diferentes (0; 6 e 24 horas). O tempo 0 foi o mesmo para as amostras sob condições normais e estresse induzido. Cada triplicata biológica foi representada por duas plantas. Todos os meios de cultura ficaram imersos em vermiculita. Após a coleta, as plantas foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração do RNA.

3.8 Expressão gênica

3.8.1 Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando-se 200 mg de tecido macerado de folhas e de raízes em N₂ líquido, seguida da adição de 1 mL de TRI Reagent® (Ludwig). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 60 segundos e centrifugadas, a 12.000 g, por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa

superior foi transferida para um novo tubo e incubada, em temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio em cada tubo, misturados por inversão e posterior incubação em temperatura ambiente, por 3 minutos.

As amostras foram centrifugadas, a 12.000 g, por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa foi transferida para novo tubo com 500 μ L de isopropanol. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente, por 10 minutos e centrifugadas, a 12.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado ao tubo 1 mL de etanol 70%, para lavagem das amostras.

Os tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos, 7.500 g, a 4 °C. O líquido foi descartado e foi realizada a secagem do *pellet* a 37 °C. Os RNAs foram ressuspensos em 50 μ L de H₂O deionizada e armazenados, a -80 °C, até o momento de sua utilização.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *Nanodrop*® ND-1000 pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm, para garantir alto grau de pureza das amostras ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ equivalentes a 1,8 – 2,2). A avaliação da integridade dos RNAs extraídos foi realizada pela visualização das bandas individuais de RNA ribossomal (26S e 18S) em gel de agarose 1%.

3.8.2 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Todas as amostras foram tratadas com o *Turbo DNA-free Kit* (Ambion) para a remoção total de DNA genômico, seguidas pela confirmação de sua ausência mediante PCR convencional com o *primer* do gene *OsGLR3.1*. A síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi realizada a

partir de 1.000 ng de RNA, utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante.

3.8.3 Busca de sequências homólogas e desenho de *primers*

Sequências ortólogas aos genes *AtGLR3.4*, *PYR1* e *DREB2* foram identificadas na plataforma que tem sequências do genoma de *N. tabacum* - *Sol Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>). A busca foi realizada por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search* (BLAST), utilizando-se as sequências dos genes em estudo disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os *primers* foram desenhados em regiões fora do domínio conservado dos genes pelo OligoPerfect™ Designer, seguindo parâmetros específicos para *primers* de qPCR e a qualidade foi realizada pelo OligoAnalyser (Integrated DNA Technologies).

3.8.4 RT-qPCR

Os ensaios de qPCR foram realizadas no equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Para cada reação, foram utilizados 200 ng de cDNA, 0,2 µM dos *primers forward* e *reverse*, 5 µL *IX SYBR® Green* (Applied Biosystems) e 3,6 µL de água ultrapura para totalizar o volume final de reação de 10 µL. As condições das reações ocorreram durante 2 minutos, a 50 °C; 10 minutos, a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 10 minutos, a 95 °C e 1 minuto, a 60 °C, finalizadas por 15 segundos a 95 °C. A análise foi realizada com triplicata biológica e técnica, incluindo amostras interensaio para assegurar a reprodutibilidade técnica entre as placas e amostras controles negativo (NTC no *template control*) para cada par de *primers*.

Os níveis de expressão de cada gene alvo foram determinados pela fórmula de Pfaffl (2001). Para isso, valores Cq (Ciclo de quantificação) de cada amostra foram obtidos utilizando-se o programa 7.500 (*Applied Biosystems*) e os dados foram normalizados com genes de referências previamente estabelecidos. A ferramenta *RefFinder* (<http://fulxie.0fees.us>) foi utilizada para avaliar a estabilidade de expressão de cinco candidatos a genes de referência descritos na literatura: PP2A, Actin, L25, EF-1 α e 18S (SCHMIDT; DELANEY, 2010). O número ideal de genes de referências a serem utilizados na normalização dos dados de expressão foi determinado pelo algoritmo *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002).

As eficiências de amplificação para cada par de *primers* (E) foram determinadas pelo programa *LinRegPCR* versão 11.0 (<http://LinRegPCR.nl>).

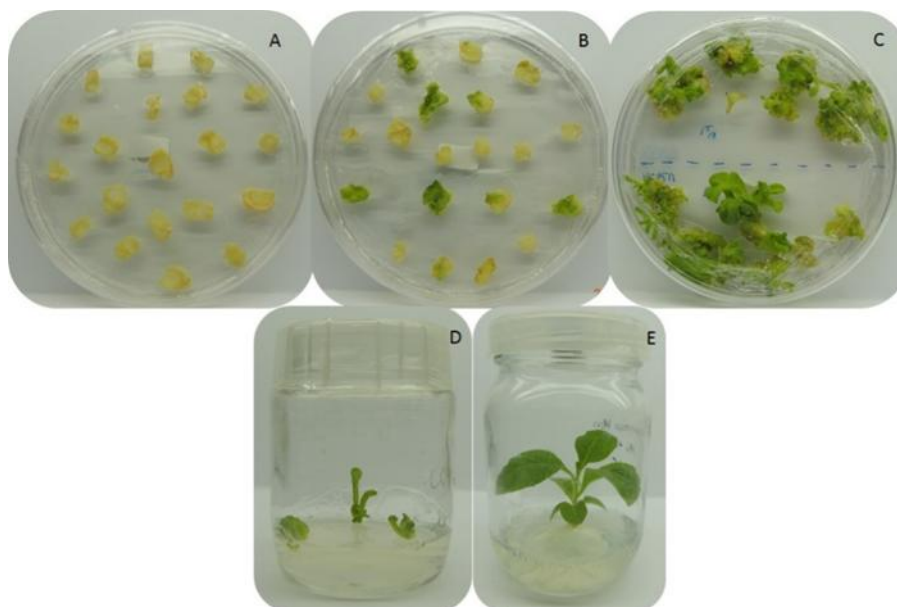
A análise estatística foi realizada pelo teste de médias de Tukey's HSD, com significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação genética e seleção dos transformantes

Realizada a transformação dos explantes foliares a partir de plântulas de tabaco cultivadas *in vitro*, tanto planta controle (Figura 4A) como planta transformada (Figura 4B) passaram pela etapa de seleção com herbicida fosfinotricina (PPT), para selecionar as folhas resistentes. Conforme pode ser observado na Figura 4C, os brotos resistentes exibem coloração esverdeada, enquanto os susceptíveis ao agente seletivo apresentam clorose. O subcultivo dos explantes foi feito até o aparecimento dos brotos e diferenciação das folhas (Figura 4D). As plântulas foram isoladas e transferidas para um novo meio MS, até a formação de raiz (Figura 4E).

Figura 4 - Etapas do processo de transformação de tabaco. (A) Folhas de tabaco da planta controle e (B) folhas de tabaco transformadas em meio MS com agente seletivo (herbicida fosfinotricina PPT – 2 mg.L-1); (C) estágios iniciais da formação de brotos no meio de seleção; (D) desenvolvimento da parte aérea e (E) plântula de tabaco enraizando *in vitro*.



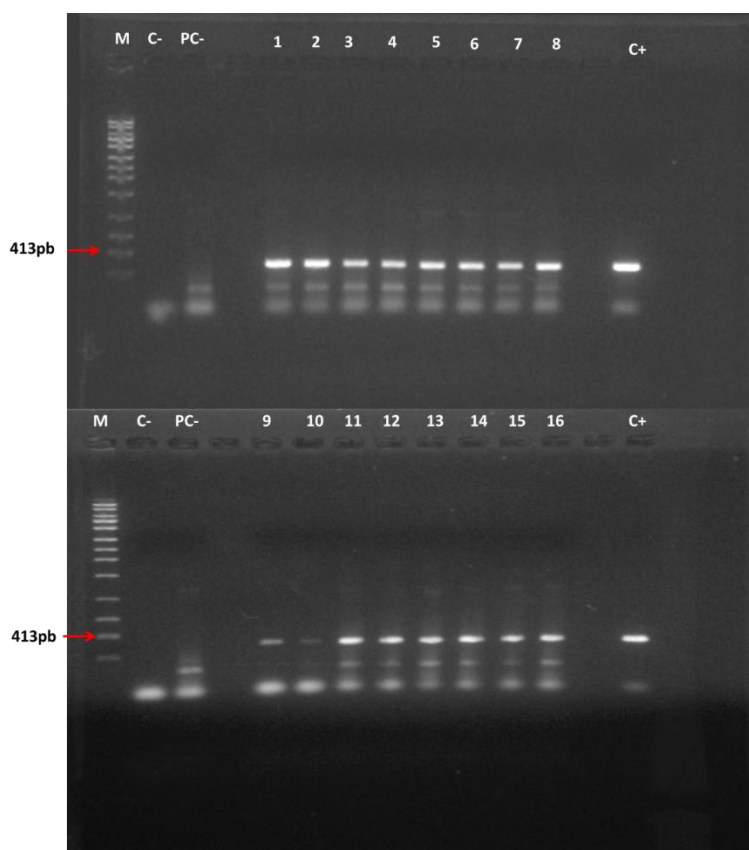
As plantas não transformadas (controle) passaram pela etapa de seleção com herbicida fosfinotricina (PPT), para confirmação de que elas não foram selecionadas, pois não apresentam o cassete gênico inserido com o gene marcador de seleção de plantas *Bar*, apresentando, então, clorose total dos explantes.

As plantas transformadas passaram pela etapa de seleção com herbicida fosfinotricina (PPT) no meio de cultura; os explantes que sobreviveram à seleção passaram para um novo meio para desenvolvimento. O herbicida fosfinotricina foi ainda adicionado ao meio seguinte para que não houvesse escape de falsos transformantes, dando início à formação dos brotos.

4.2 Confirmação da transformação

As plantas selecionadas *in vitro* com herbicida PPT foram testadas quanto à inserção do gene de interesse por PCR. Para a presença do inserto do gene específico *OsGLR3.1* (Fig. 5), foram obtidas dezesseis plantas positivas de dezesseis avaliadas, devido à amplificação de um fragmento específico de 413 pb.

Figura 5 - Fragmentos amplificados por PCR para o gene de interesse das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com a construção de interesse. M - 1 kb (Invitrogen), 1 a 16 - plantas regeneradas da transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, C+: controle positivo (plasmídeo), C-: controle negativo (água) e PC- (planta de tabaco selvagem). As setas indicam o tamanho do fragmento amplificado.



4.3 Análise do número de cópias

O número de cópias do transgene foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, comparando-se cada amostra desconhecida com o DNA da amostra calibradora, que continha uma única cópia do transgene. Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *bar*. Eventos

transformados (Evento 13 e Evento 14) apresentaram inserção de uma a três cópias do transgene, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Estimativas do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ em linhagens T0 de tabaco.

<i>Amostras</i>	Nº de cópias ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Amostra calibradora
<i>Planta controle</i>	0,00	
<i>Evento 1</i>	0,38	
<i>Evento 2</i>	0,35	
<i>Evento 3</i>	3,09	
<i>Evento 7</i>	1,52	
<i>Evento 8</i>	0,25	
<i>Evento 9</i>	0,43	
<i>Evento 10</i>	3,02	
<i>Evento 11</i>	2,92	
<i>Evento 12</i>	2,29	
<i>Evento 13</i>	0,83	
<i>Evento 14</i>	0,51	
<i>Evento 15</i>	2,87	
<i>Evento 16</i>	1,50	

A partir dos valores da Tabela 1, pode-se observar que o número de cópias é bem variável. Foram considerados como cópia única os valores de 0,5 a 1,0, segundo os resultados obtidos com o teste de segregação (3:1) da amostra calibradora. O número de cópias pode influenciar os níveis de expressão e a estabilidade genética dos genes exógenos e endógenos. Portanto, a inserção de uma cópia do transgene é desejável, pois eventos com cópia única são considerados geneticamente mais estáveis (GADELETA et al., 2011). Resultados semelhantes com transformação mediada por *A. tumefaciens* foram encontrados em duas linhagens transgênicas de *N. tabacum* cv. Xanthi com inserção de uma cópia do transgene *AtWBC* (*A. thaliana* ATP binding cassette (ABC) transporter) (YUAN et al., 2007) e em 92 linhagens T0 de algodão com inserção de uma a quatro cópias do gene *nptII* (*neomycin phosphotransferase tip II*) (YANG et al., 2013). Em comparação com a transformação mediada por *A.*

tumefaciens, na transformação por biobalística ocorre integração de um grande número de cópias do transgene no genoma vegetal, o que pode levar ao silenciamento do transgene (VYACHESLAVOVA et al., 2012).

4.4 Estresse induzido por PEG 6000

O experimento de déficit hídrico induzido por PEG6000 foi realizado com os dois eventos (E13 e E14) que apresentaram uma única cópia do transgene no experimento descrito no item 4.3 (Figura 6).

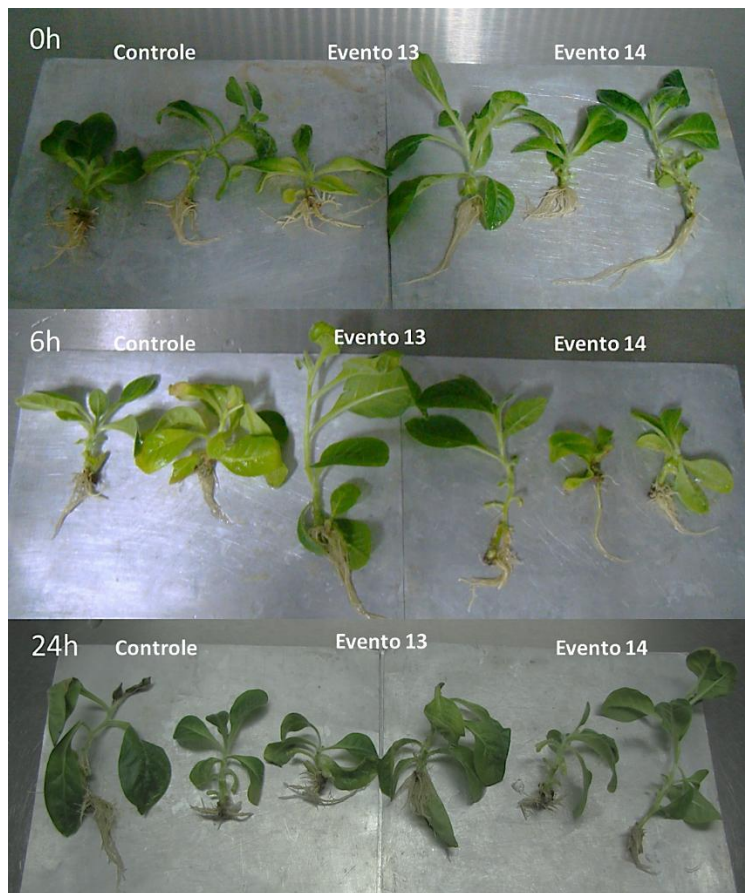
Figura 6 - Plantas de tabaco em meio líquido com PEG e vermiculita.



O polietilenoglicol (PEG) tem sido utilizado com sucesso em trabalhos de pesquisa para simular os efeitos do déficit hídrico nas plantas, em razão da capacidade do PEG 6000 diminuir o potencial hídrico do meio, levando à menor absorção de água pela planta. Na literatura são encontrados estudos de identificação de genes diferentemente expressos (LIU et al., 2014), estudos fisiológicos (TENG et al., 2014) e de germinação de sementes (MARAGHNI; GORAI; NEFFATI, 2010), os quais utilizam PEG6000 para avaliar o impacto do déficit hídrico nas plantas. As plantas controle e as plantas transformadas apresentaram leve sintoma de murcha após 24 horas do início do tratamento em

meio com PEG e vermiculita. Não foi possível perceber diferenças visuais nos sintomas entre as plantas transformadas e as plantas controle (Figura 7).

Figura 7 - Análise visual das plantas controle e transformadas (E13 e E14), em condições de estresse induzido por PEG 6000, nos três tempos analisados (0, 6 e 24 horas).



As plantas não apresentaram uniformidade de tamanho, apesar de terem a mesma idade, o que seria ideal, mas pelo número insuficiente de plantas, todas foram avaliadas.

4.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

4.5.1 Eficiência dos *primers*

As eficiências de amplificação para cada par de *primers* (E), tanto dos genes alvo como os genes de referência, foram determinadas pelo programa *LinRegPCR* e os valores obtidos variaram de 80% a 100% (Tabela 2).

Tabela 2 - Informações gerais sobre os genes analisados e os genes de referências utilizados para a normalização.

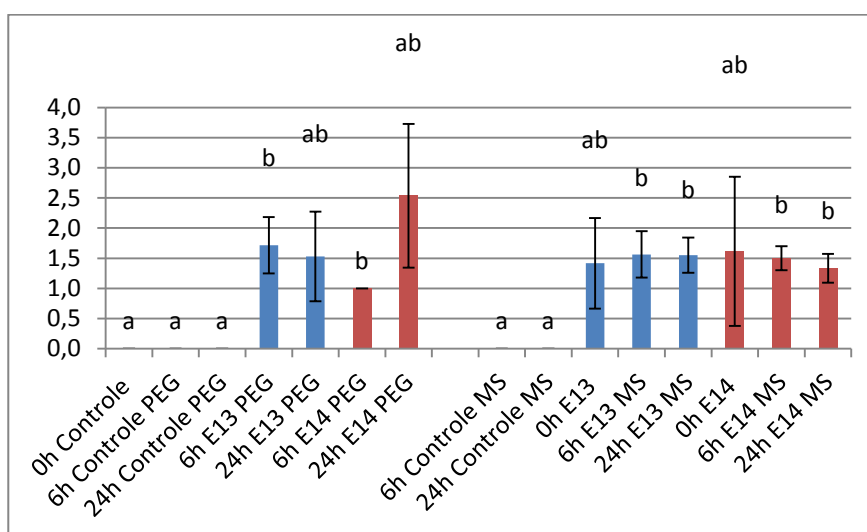
Gene	Definição	Sequência do primer (5' – 3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)	E (%)
<i>OsGLR3.1</i>	<i>Glutamate-like receptor</i>	F:AGATCCAACACCTCGTCCAG R:CAAGGACCGCTTCTTCTTTG	60,11	142	96
			59,99		
<i>NtDREB2</i>	<i>DRE-Binding Protein 2</i>	F:TTCAGCAGCAGAATGTGGAC R:TGCAAGGTCATCCAAACTGA	59,99	143	97,9
			60,24		
<i>NtPYRI</i>	<i>Pyrabactin Resistance1</i>	F:CATCAAACACGACCCATCAC R:GAAGAGCATGTGTGGCTGA	59,81	124	92,6
			59,99		
<i>NtGLR3.4</i>	<i>Glutamate-like receptor 3.4</i>	F:AACCTCCAAACACTTCAACCA R:GCAGAGGCTTTCCATTATGC	59,48	81	87,8
			59,81		
<i>PP2A</i>	<i>Protein phosphatase 2A</i>	F:CTCAAGTGCCCCAGAGATGT R:TAGCAGCAAACCTTCCCCAAG	60,26	80	91,5
			60,38		
18S	<i>Ribosomal protein S18</i>	F:GATTGACCTTGAAACAACAACG R:CTAGCGGTCGACTCGGTCT	59,52	118	90,5
			61,86		

4.5.2 Expressão do gene *OsGLR3.1*

A função do gene *OsGLR3.1* está caracterizada por ser o gene responsável à manutenção da divisão celular do meristema apical da raiz na fase inicial da plântula (LI; ZHU; SONG, 2006).

O perfil de expressão do transgene *OsGLR3.1*, em ambos os eventos transformantes, foi semelhante em todas as condições analisadas (Figura 8).

Figura 8 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *OsGLR3.1*. As barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.



Não houve amplificação do gene nas plantas controle (que não passaram pelo processo de transformação), assim como esperado. Em meio MS + PEG para o evento 14, houve um pequeno aumento de expressão do tempo 6h para o tempo 24h, mas os valores não são significativos estatisticamente. Quando se

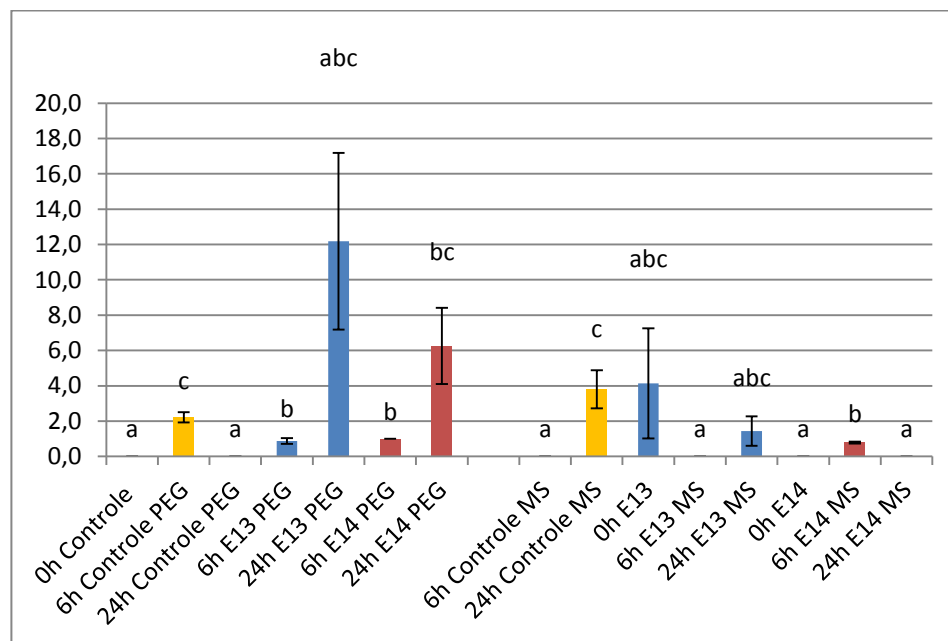
conclui que uma diferença não é estatisticamente significativa, isso não indica, propriamente, que as médias sejam iguais, ou que não exista um efeito substantivo. Indica apenas que não houve evidência suficientemente forte para provar que a hipótese nula era falsa (RUMSEY, 2009).

Essa expressão semelhante dos eventos transformantes em condições diferentes, tanto no meio MS basal como no estresse induzido por PEG, pode ser dada pela função do promotor constitutivo presente no cassete gênico. O promotor constitutivo promove a mesma expressão em condições diferentes e em tecidos diferentes.

4.5.3 Expressão do gene *NtDREB2A*

Nos tratamentos em que as plantas transformadas e controle permaneceram em meio MS basal, o padrão de expressão do gene *NtDREB2A* foi semelhante na metade das amostras, e com expressão inexistente na outra metade (Figura 9). Já nos tratamentos em presença de PEG, as plantas controle apresentaram uma expressão maior em 6h, decaindo em 24h, enquanto nas plantas transformadas foi observado o oposto, uma menor expressão do gene em 6h e um aumento elevado em 24h.

Figura 9 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *NtDREB2A*. As barras amarelas correspondem às amostras controle, as barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.



Os fatores de transcrição DREB, pertencentes à família ERF (*Ethylene Responsive Element Binding Factors*), são conhecidos por reconhecer sequências cis-elementos DRE (*Dehydration responsive element*) nas regiões promotoras e induzir a expressão de genes estresse-responsivos, como os genes LEA, deidrinas, biossíntese de osmoprotetores e enzimas antioxidantes (KHAN, 2011; MATSUKURA et al., 2010). Alguns destes fatores de transcrição participam das rotas independentes da sinalização do ABA, como o DREB2A. A expressão desse gene é induzida, principalmente, devido à percepção do estresse osmótico. Contudo, em estudos recentes foi demonstrado que a concentração de Ca^{2+} interfere na atividade destes fatores de transcrição, inferindo sobre a

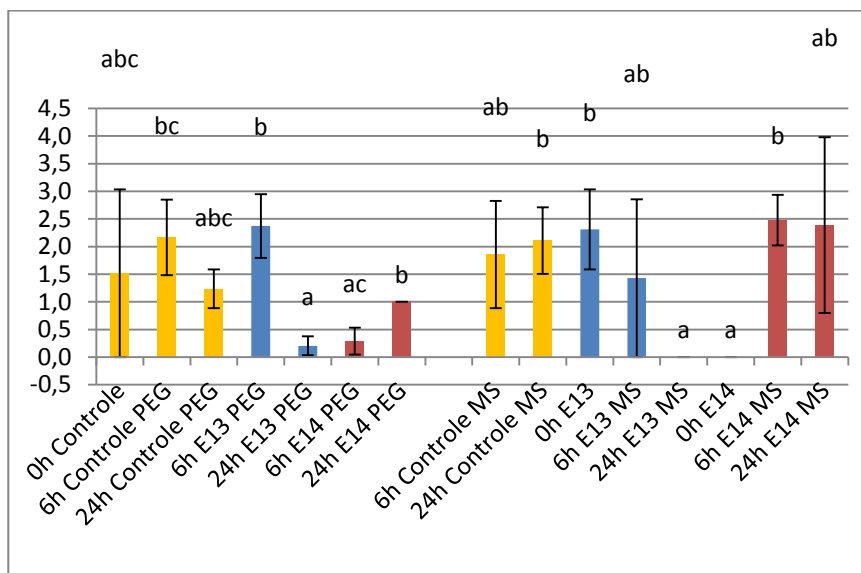
indução de modificações conformacionais nas proteínas (WHALLEY et al., 2011).

Em razão do aumento de expressão do gene *NtDREB2A* nas plantas transformadas e o decréscimo nas plantas controle, infere-se que, com a atividade do gene inserido *OsGLR3.1* no influxo de Ca^{2+} na célula, o aumento deste íon no citosol e no núcleo interferiu na expressão e na atividade do gene *NtDREB2A*.

4.5.4 Expressão do gene *NtPYR1*

O ABA, ao ser sintetizado pela planta, em condições de déficit hídrico, é reconhecido pelo complexo PYR/PYL/RCAR (*Pyrabactin Resistance/PYR1-like/Regulatory Component of ABA Receptor*). Após se ligar ao ABA, este complexo possibilita a ativação da cascata ABA-dependente e a ativação de genes estresse-responsivos. O gene *NtPYR1* é ortólogo do *AtPYR1* em *A. thaliana*, o qual codifica uma proteína integrante do complexo receptor do ABA (MEHROTRA et al., 2014; YANG et al., 2013; YOSHIDA et al., 2015). As plantas controle apresentaram uma expressão constante tanto em meio MS basal como em meio com PEG, e, em PEG a expressão foi mais elevada do que a expressão das plantas transformadas (Figura 10). Isso sugere que a expressão do gene endógeno é alterada pelo estresse, mas não é capaz de aumentar a expressão do gene *NtPYR1*, aumentando, consequentemente, a síntese de ABA na planta.

Figura 10 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *NtPYR1*. As barras amarelas correspondem às amostras controle, as barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.



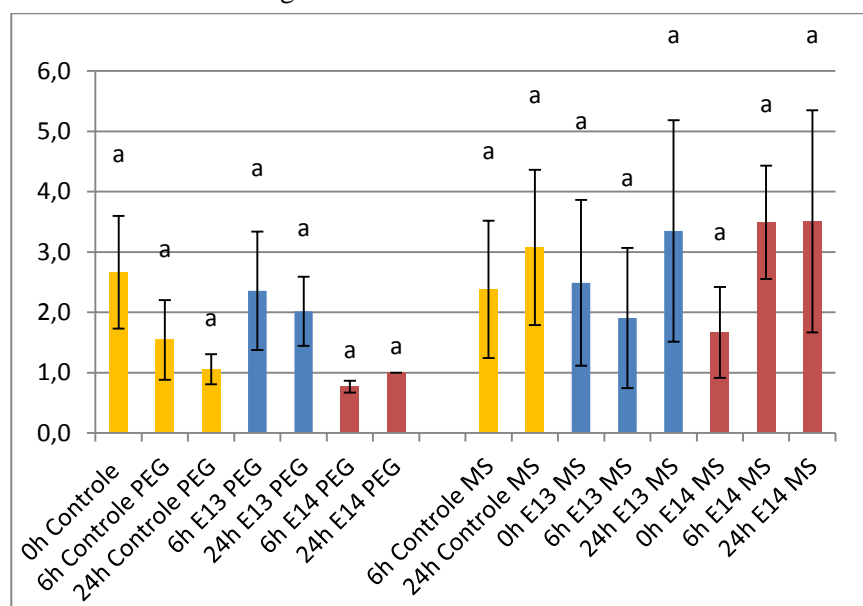
As plantas transformadas apresentaram expressões opostas. O evento 13 apresentou maior expressão no tempo 6h, decaindo substancialmente às 24h e o evento 14 teve um baixo aumento da expressão do tempo 6h para o 24h. Esse resultado pode estar relacionado com o local de inserção do gene no genoma da planta, o que evidencia comportamentos tão distintos de dois eventos transformantes. A inserção do gene *OsGLR3.1* demonstrou um efeito mais elevado na expressão do gene *NtPYR1* nos tratamentos sem estresse induzido.

4.5.5 Expressão do gene *NtGLR3.4*

O gene *GLR3.4* é homólogo em *Arabidopsis* ao gene *OsGLR3.1* usado na transformação genética. *AtGLR3.4* é expresso ubiquamente em *Arabidopsis*, incluindo raízes, feixes vasculares, células do mesofilo e as células guarda. Estresses abióticos, tais como estresse osmótico ou frio, estimulam a expressão de *AtGLR3.4* (MEYERHOFF et al., 2005).

O perfil de expressão do gene *NtGLR3.4* em ambos os eventos transformantes foi semelhante em todas as condições analisadas (Figura 11).

Figura 11 - Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do gene *NtGLR3.4*. As barras amarelas correspondem às amostras controle, as barras azuis correspondem às amostras do Evento 13 e as barras vermelhas correspondem às amostras do Evento 14, nas condições (MS ou PEG) e o período da coleta (0, 6 e 24 horas). Controle endógeno: PP2A e 18S.



Pode-se observar uma maior expressão no evento 13 nos tempos 6h e 24h, decaindo no evento 14, em ambos os tempos. Este gene não altera sua expressão em condições de estresse induzido tanto nas plantas controle quanto nas plantas transformadas nos diferentes tempos analisados e demonstra maior expressão em condições normais. A inserção do transgene *OsGLR3.1* não influencia a expressão do homólogo *NtGLR3.4*. Apesar de *NtGLR3.4* responder a estresses abióticos, o déficit hídrico não altera seu padrão de expressão. Genes homólogos podem ou não ter a mesma função. Visto que o objetivo, neste trabalho, foi estudar a hipótese de que o transgene *OsGLR3.1* responde ao déficit hídrico e baseado no padrão de expressão do homólogo, essa hipótese torna-se inconclusiva.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da transformação genética, via *A. tumefaciens*, de explantes foliares de *Nicotiana tabacum*, foi possível inserir com sucesso o gene *OsGLR3.1*, obtendo plantas transgênicas e com a inserção de uma única cópia no genoma.

A presença do gene exógeno demonstrou expressão homogênea tanto em condição normal como em estresse induzido e demonstrou alterar parcialmente a expressão dos genes relacionados à seca e minimamente a expressão do seu gene homólogo, tornando inconclusiva a hipótese de que o transgene tenha tolerância ao déficit hídrico. Novos estudos são necessários para verificar a função do gene na tolerância ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ACHER, F. C.; BERTRAND, H. O. Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. **Biopolymers**, New York, v. 80, n. 2/3, p. 357-366, 2005.
- AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.
- ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética de E. grandis via Agrobacterium**. 2001. 123 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Piracicaba, 2001.
- ASHRAF, M.; OZTURK, M.; ATHAR, H. R. **Salinity and water stress, improving crop efficiency**. Wageningen: Springer, 2009. 244 p.
- BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, Berlin, v. 132, n. 1, p. 21-32, Feb. 2013.
- BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant cell selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brasília, DF, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2002.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenargen, 1998. 309 p.
- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. **Transformação genética de plantas: a cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1999. 14 p.
- CHEN, M. et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 353, n. 2, p. 299-305, 2007.

CHIU, J. C. et al. Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 19, n. 7, p. 1066-1082, 2002.

CHRISTMANN, A. et al. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, p. 314-325, 2006.

DINGLELINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 51, p. 7-61, 1999.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 12, p. 13-15, 1987.

GADELETA, A. et al. Realtime PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Berlin, v. 16, p. 652-688, 2011.

GASSER, C. S.; FRALEY, R. T. Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**, New York, v. 244, p. 1293-1299, 1989.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology Molecular Biology Plants**, New York, v. 17, n. 1, p. 9-12, 2011.

GOODSPEED, T. H. The genus *Nicotiana*. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, New York, v. 45, n. 3, p. 193-194, Mar. 1956.

HOHN, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: RUSSO, V. E. A. et al. (Ed.). **Development: the molecular genetic approach**. Berlin: Springer Verlag, 1992. p. 206-216.

HUANG, B. Q.; RUSSEL, S. D. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 5, p. 151-155, 1992.

KASUGA, M. et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 3, p. 346-350, 2004.

KHAN, M. S. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 25, n. 3, p. 2433-2442, 2011.

KIM, S. A. et al. Overexpression of the AtGluR2 gene encoding an Arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 74-84, 2001.

KUROMORI, T. et al. Drought stress signaling network. In: HOWELL, S. H. (Ed.). **Molecular biology**. New York. Springer, 2014. p. 383-409.

LACOMBE, B.; BECKER, D.; HEDRICH, R. The identity of plant glutamate receptors. **Science**, New York, v. 292, p. 1486-1487, 2001.

LAM, H. M. et al. Glutamate-receptor genes in plants. **Nature**, London, v. 396, n. 6707, p. 125-126, 1998.

LAMBRET-FROTTE, J. et al. Promoter isolation and characterization of *GhAO-like1*, a *Gossypium hirsutum* gene similar to multicopper oxidases that is highly expressed in reproductive organs. **Genome**, Ottawa, v. 59, n. 1, p. 23-36, 2016.

LI, J.; ZHU, S.; SONG, X. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 340-349, 2006.

LIU, C. et al. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 19-36, 2014.

LIU, Q. et al. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 45, n. 11, p. 970-975, 2000.

LU, G. et al. Application of T-DNA activation tagging to identify glutamate receptor-like genes that enhance drought tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 33, n. 4, p. 617-631, Mar. 2014.

LUBINI, G. **Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L.** 2012. 140 p. Tese (Doutorado em Genética Geral)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MADHAVA, K. V. et al. **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Wageningen: Springer, 2006. 345 p.

- MARAGHNI, M.; GORAI, M.; NEFFATI, M. Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Ziziphus lotus*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 76, n. 3, p. 453-459, 2010.
- MATSUKURA, S. et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 283, n. 2, p. 185-196, 2010.
- MEHROTRA, R. et al. Abscisic acid and abiotic stress tolerance-different tiers of regulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 7, p. 486-496, 2014.
- MEYERHOFF, O. et al. AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. **Planta**, Berlin, v. 222, n. 3, p. 418-427, Apr. 2005.
- MIZOI, J. et al. GmDREB2A; 2, a canonical DREB2-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates DRE-dependent gene expression. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 161, n. 1, p. 346-361, Jan. 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NEZHADAHMADIA, H.; FARUQ, G. Drought tolerance in wheat. **Scientific World Journal**, Cairo, v. 2013, n. 9, p. 1-12, Sept. 2013.
- NISHIMURA, N. et al. PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 290-299, 2013.
- NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relação hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, p. 66-74, 2001.
- PARK, S. Y. et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, New York, v. 324, n. 5930, p. 1068-1071, 2009.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 39-45, May 2001.

QI, Z.; STEPHENS, N. R.; SPALDING, E. P. Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 142, n. 3, p. 963-971, 2006.

ROYCHOUDHURY, A.; PAUL, S.; BASU, S. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 7, p. 985-1006, 2013.

RUMSEY, D. **Estatística para leigos**. Rio de Janeiro: Alta Books, 2009. 368 p.

SANTARÉM, E. R. **Laboratório de cultura de tecidos vegetais**. Cruz Alta: Universidade de Cruz Alta, 2000. 11 p.

SARTORETTO, L. M. et al. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 861-871, 2008.

SCHMIDT, G. W.; DELANEY, S. K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 283, n. 3, p. 233-241, Jan. 2010.

SIERRO, N. et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, London, v. 5, p. 1-15, May 2014.

SINGH, A. et al. Genome-wide expression and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. **FEBS Journal**, Amsterdam, v. 281, n. 3, p. 894-915, Jan. 2014.

ŠUBR, Z.; NOVÁKOVÁ, S.; DRAHOVSKÁ, H. Detection of transgene copy number by analysis of the T1 generation of tobacco plants with introduced P3 gene of potato virus A. **Actavirologica**, Bratislava, v. 50, p. 135-138, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.

TENG, K. et al. Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II during PEG stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 2219-2227, 2014.

VALDETARO, E. B. et al. Árvores geneticamente modificadas: técnicas, aplicações, riscos e os potenciais impactos associados a sua utilização. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 65, p. 51-61, 2011.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-11, 2002.

VINCILL, E. D. et al. Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 4, p. 1304-1313, Apr. 2013.

VYACHESLAVOVA, A. O. et al. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 11, n. 48, p. 1067-1079, 2012.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 1-14, 2003.

WEBSTER, C. C. Tobacco. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 18, n. 3, p. 330-331, 1982.

WEILAND, M.; MANCUSO, S.; BALUSKA, F. Signalling via glutamate and GLRs in Arabidopsis thaliana. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 43, n. 1, p. 327-345, Nov. 2015.

WHALLEY, H. J. et al. Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 11, p. 4079-4095, 2011.

XIANG, Y. et al. Overexpression of a Triticum aestivum Calreticulin gene (TaCRT1) improves salinity tolerance in tobacco. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-15, Oct. 2015.

XIAO, H. J. et al. Cloning and characterization of the pepper CaPAO gene for defense responses to salt-induced leaf senescence. **BMC Biotechnology**, London, v. 15, n. 1, p. 327-345, Oct. 2015.

YANG, X. et al. Integration and characterization of T-DNA insertion in upland cotton. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, Praha, v. 49, n. 2, p. 51-57, 2013.

YANG, X. et al. Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 56, n. 6, p. 1043-1052, 2015.

YOSHIDA, T. et al. Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 56, n. 6, p. 1043-1052, 2015.

YUAN, J. S. et al. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. **BMC Bioinformatics**, London, v. 8, n. 7, p. 6-15, Nov. 2007.

ZHANG, M. et al. Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of proteomics**, New York, v. 109, n. 8, p. 290-308, Sept. 2014.