

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DO GENE AT1G52200
(AtPLAC8-11.1) DE Arabidopsis thaliana

FERNANDA VALANDRO

Porto Alegre, 2018

FERNANDA VALANDRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DO GENE AT1G52200
(*AtPLAC8-11.1*) DE *Arabidopsis thaliana***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandro Cagliari

Colaboradora: Dra. Paloma Koprovski Menguer

Porto Alegre, Junho de 2018

Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Vegetal, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para o desenvolvimento do mesmo, contou-se com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) e recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, agradeço aos meus pais, Delcio (*in memorian*) e Teresinha por terem me dado o maior amor que eu poderia receber. Se cheguei até aqui, foi por vocês. Aos meus irmãos Gustavo e Gilson, por sempre me apoiarem e nunca duvidarem de mim. À minha sobrinha Antonella, por ser a luz da nossa família.

Ao meu namorado, Guilherme Dill, por ser simplesmente um pessoa incrível: determinado, correto, estudioso, sempre preocupado comigo. Você é o meu maior incentivador!

À minha orientadora, professora Dra. Márcia Pinheiro Margis, pela confiança, ensinamentos, orientação e por servir como exemplo na carreira acadêmica e na vida.

Ao meu co-orientador, Dr. Alexandro Cagliari, por sua orientação, paciência, incentivo, aulas particulares e entusiasmo ao longo deste mestrado.

À minha colaboradora Dr. Paloma Koprovski Menguer. Paloma, não existem palavras pra descrever o quanto tu foste importante para mim, tu é o meu anjo da guarda, és a melhor pessoa do mundo. Todo o bem que fizestes para mim, a vida irá lhe retribuir da melhor maneira possível.

A TODOS os meus colegas de laboratório, por me acolherem tão bem e por ceder parte do seu tempo para me ajudar nos momentos em que eu mais precisava. Compartilhamos dúvidas, risadas, momentos e esperança. Vocês foram extremamente importantes para que eu seguisse meus trabalhos nessa jornada de forma tranquila e feliz.

Às colaboradoras deste projeto, Dra. Ana Korbes e Dra. Fernanda Lazarotto.

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES, pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento deste projeto.

Enfim, a todos os demais, que de alguma forma colaboraram para este trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Morte Celular Programada (PCD) em Plantas.....	13
1.1.1 Morte Celular Semelhante à Apoptose	13
1.1.2 Morte Associada à Senescência.....	16
1.1.3 Morte Celular Mediada por Vacúolos	18
1.2 Reguladores da Morte Celular Programada.....	20
1.3 Família Gênica PLAC8.....	23
1.3.1 PLAC8 em Plantas.....	24
1.4 <i>AtPLAC8-11.1</i>	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO.....	28
3.1.1 Amplificação das sequências codificantes do gene <i>AtPLAC8-11.1</i> e do <i>splicing</i> alternativo <i>AtPLAC8-11.2</i>	28
3.1.2 Clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO.....	30
3.1.2.1 Análise por PCR das colônias transformantes contendo o vetor de entrada	30
3.1.2.2 Isolamento de plasmídeo (Miniprep) das colônias transformantes	31
3.1.2.4 Sequenciamento de DNA.....	32
3.1.3 Recombinação com os vetores de destino pEarleyGate	32
3.1.3.1 Análise por PCR das colônias transformantes nas recombinações entre os vetores de entrada e vetores de destino e isolamento de plasmídeo (Miniprep).....	34
3.1.3.2 Confirmação das recombinações por restrição enzimática.....	34
3.1.4 Transformação de <i>Agrobacterim tumefaciens</i> EHA105 com os vetores pEarleyGate recombinados.	34
3.1.5 Floral Dipping.....	35
3.1.6 Seleção de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i>	36

3.1.7 Estudos de localização em planta	37
3.1.8 Reações de PCR quantitativa RT-qPCR: análise da expressão de <i>AtPLAC8-11.1</i> e <i>AtPLAC8-11.2</i>	37
3.1.8.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA	37
3.1.8.2 RT-qPCR	38
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES.....	39
3.2.1 Material vegetal: Obtenção de sementes com inserção de T-DNA	39
3.2.2 Assepsia e cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.2.3 Genotipagem de plantas mutantes	40
3.2.3.1 Extração de DNA genômico	40
3.2.3.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR)	41
3.2.4 Análise de segregação.....	42
3.2.5 Reações de PCR quantitativa RT-qPCR com as linhagens mutantes	43
3.2.6 Análises Morfológicas	43
3.2.6.1 Avaliação do crescimento das raízes	43
3.2.6.2 Teste de Germinação	44
4 RESULTADOS	45
4.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>.....	45
4.1.2 Estrutura do gene <i>AtPLAC8-11.1</i> e da forma variante de <i>splicing AtPLAC8-11.2</i>	45
4.1.3 Padrão de expressão frente a estresses abióticos	47
4.2 CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO	48
4.2.1 Amplificação do gene <i>AtPLAC8-11.1</i> e do produto do <i>splicing</i> alternativo <i>AtPLAC8-11.2</i> a partir de cDNA de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
4.2.2 Clonagem do <i>AtPLAC8-11.1</i> e <i>AtPLAC8-11.2</i> no vetor de entrada pENTR/D-TOPO..	49
4.2.3. Recombinação com os vetores de destino	52
4.2.4 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EH105.....	54
4.2.5 Seleção das sementes transformantes	55
4.2.6 Localização subcelular de <i>PLAC8-11</i>	58
4.2.7 Nível de expressão do gene <i>PLAC8-11</i> e <i>PLAC8-11.2</i> em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES.....	60
4.3.1 Obtenção de sementes com inserção de T-DNA	60
4.3.2. Genotipagem de mutantes.....	61

4.3.4 Análise da segregação.....	63
4.3.5 Análise da expressão do gene <i>AtPLAC8-11.1</i> nos mutantes CS852038 e CS378853	64
4.3.6 Análise morfológica do comprimento de raiz do mutante <i>knockout plac8-11.1</i>	65
4.3.7 Experimento de Germinação	67
5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CURRICULUM VITÆ resumido.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro(s)

Basta - Glufosinato de amônio (do inglês, *glufosinate ammonium*)

cDNA - DNA complementar

CLPs - *Caspase-Like Proteases*

CTAB - *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTP - Desoxirribonucleosídeo Trifosfatado

Fig – Figura

g - gravidade

h - hora(s)

HR - Resposta de Hipersensibilidade

Kb - mil pares de bases

LB - Luria-Bertani

LSD1- *Lesion Simulating Disease 1*

min - minuto(s)

mL - mililitro(s)

mM - milimolar

o/n – overnight

PAR - Radiação Fotossinteticamente Ativa (do inglês, *Photosynthetically Active Radiation*)

pb - par(es) de bases

PCD – Morte Celular Programada (do inglês, *Programmed Cell Death*)

PCDPs - *Plant Cell Death Proteases*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

PLAC8 - *Placent specific 8*

QTL - *Quantitative Trait Locus*

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

rpm - Rotações Por Minuto

RT-qPCR - Transcrição Reversa seguida da Reação Quantitativa da DNA Polimerase em Cadeia (do inglês, *Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

SAR - Resistência Sistêmica Adquirida (do inglês, *Systemic Acquired Resistance*)

TAIR - The Arabidopsis Information Resource

T-DNA - DNA de Transferência

UR - Umidade Relativa

UV - Radiação Ultravioleta

VCD - Morte Celular Vacuolar (do inglês, *Vacuolar Cell Death*)

VPEs - Enzimas de Processamento Vacuolar (do inglês, *Vacuolar Processing Enzyme*)

WT - Wild Type (tipo selvagem)

YFP - Proteína Fluorescente Amarela (do inglês, *Yellow Fluorescent Protein*)

RESUMO

A morte celular programada (do inglês, *Programmed Cell Death*) é um processo geneticamente controlado que provoca o suicídio celular em organismos eucarióticos e procarióticos. A PCD ocorre em plantas durante seu desenvolvimento e quando expostas a diferentes condições de estresses caracterizados por estresses abióticos e bióticos. Diversos estudos foram realizados para entender os mecanismos relacionados à PCD em plantas, utilizando principalmente *Arabidopsis thaliana*. Recentemente, uma rede chamada "deathosome LSD1" foi sugerida em *Arabidopsis* e mostra as interações entre os reguladores de morte celular conhecidos, como o LSD1 (*Lesion Simulating Disease 1*), um gene central nessa rede, e seus parceiros de interação. O gene At1g52200 que codifica uma proteína do motivo PLAC8 (*placent specific 8*) foi descrito como componente dessa rede, mas sua função não foi estudada até o momento. O objetivo geral deste trabalho é estudar *AtPLAC8-11.1* e verificar a existência do transcrito alternativo *AtPLAC8-11.2* previsto *in silico*. Para isso, os insertos amplificados a partir de cDNA de *A. thaliana*, *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* foram clonados no vector de entrada pENTR/D-TOPO, e o *AtPLAC8-11.1* foi subclonado em vetores binários de destino. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *AtPLAC8-11.1* foram geradas via *floral dipping*. Além disso, via banco de sementes *Arabidopsis* Stock Center (ABRC), linhagens mutantes *knockdown* e *knockout* para *AtPLAC8-11.1*, com inserção de T-DNA no promotor e primeiro éxon do gene, respectivamente foram adquiridas e genotipadas. As plantas *knockout plac8-11.1* apresentaram maior comprimento de raiz, quando comparado ao tipo selvagem, indicando um possível papel deste gene no desenvolvimento radicular. Nossos resultados mostraram a existência de *AtPLAC8-11.2*, no entanto, o nível de transcritos é baixo na parte aérea de *Arabidopsis*, quando comparado ao *AtPLAC8-11.1*. Estudos preliminares indicam a localização subcelular de *AtPLAC8-11.1* na membrana plasmática e eventual reciclagem por vesículas secretoras. Dificuldades na fase de seleção de plantas de *Arabidopsis* transformadas contendo a construção para super-expressão de *AtPLAC8-11.1* indicam a possibilidade de que altos níveis transcricionais de *AtPLAC8-11.1* possam ser prejudiciais à planta, especialmente em condições de estresse. Estes resultados indicam o envolvimento de *AtPLAC8-11.1* no processo de PCD em *Arabidopsis*.

ABSTRACT

Programmed Cell Death (PCD) is a genetically controlled process triggering cellular suicide in both eukaryotic and prokaryotic organisms. PCD occurs in plants during their development and when exposed to different stress conditions characterized by abiotic and biotic stresses. Several studies were performed to understand the mechanisms related to PCD in plants, mainly using *Arabidopsis thaliana*. Recently, a network called deathosome LSD1 has been suggested in *Arabidopsis* and it shows the interactions between known cell death regulators such as LSD1 (*Lesion Simulating Disease 1*), a central gene in this network, and their interaction partners. The At1g52200 gene encoding a PLAC8 (*placent specific 8*) motif was described as a component of this network, but its function has not yet been characterized. The general objective of this work is to study *AtPLAC8-11.1* and verify the existence of the alternative transcript *AtPLAC8-11.2* predicted *in silico*. For this, the inserts amplified from *A. thaliana* cDNA, *AtPLAC8-11.1* and *AtPLAC8-11.2*, were cloned into the pENTR/D-TOPO entry vector, and *AtPLAC8-11.1* was subcloned into binary destination vectors. *Arabidopsis* transgenic plants overexpressing *AtPLAC8-11.1* were generated via floral dipping. In addition, via the *Arabidopsis* Stock Center (ABRC) seed bank, mutant knockdown and knockout for *AtPLAC8-11.1*, with insertion of T-DNA into the promoter and the first exon of the gene, were respectively acquired and genotyped. The *plac8-11.1 knockout* plants presented increased root length, when compared to wild type, indicating a possible role of this gene in root development. Our results showed the existence of *AtPLAC8-11.2*, however, the level of transcripts are low in *Arabidopsis* shoots, when compared to *AtPLAC8-11.1*. Preliminary studies indicate the subcellular localization of *AtPLAC8-11.1* in the plasma membrane and with possible recycling by secretory vesicles. Difficulties in the selection phase of transformed *Arabidopsis* plants containing the construct for overexpression of *AtPLAC8-11.1* indicate the possibility that high transcriptional levels of *AtPLAC8-11.1* may be detrimental to the plant, especially under stress conditions. These results indicate the involvement of *AtPLAC8-11.1* in the PCD process in *Arabidopsis*.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são organismos eucariontes, multicelulares, autotróficos e de natureza sésstil, sendo as duas últimas características responsáveis pela vulnerabilidade a diversos estresses ambientais quando cultivadas em ambiente aberto (ZHANG et al., 2018; KHAN et al., 2018). Os estresses enfrentados pelas plantas podem ser classificados em abióticos - como seca, alagamento, elevada salinidade, condições de luz variáveis, temperaturas extremas, calor, congelamento, resfriamento, metais pesados e falta de nutrientes - e em bióticos, causados principalmente pela exposição a patógenos microbianos e insetos herbívoros (THALMANN; SANTELIA, 2017; VASHISTH et al., 2018; YOU et al., 2018; JALMI et al., 2018). O crescimento e a produtividade das plantas são significativamente desafiados por esses diferentes estresses ambientais, em muitas regiões do mundo, acarretando em prejuízos sócio-econômicos (FOYER et al., 2016; MARQUES et al., 2017). Nesse sentido, o entendimento da sinalização e das respostas das plantas frente aos diferentes tipos de estresses é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas úteis para o melhoramento vegetal visando a resistência/tolerância das plantas aos estresses ambientais (ZHU, 2016).

As plantas desenvolveram estratégias que permitem que elas possam superar as condições adversas, principalmente quando a intensidade desses fatores prejudiciais é alta. As células vegetais utilizam um conjunto de vias regulatórias para programar a morte das células como parte do mecanismo de defesa (KUMAR; MOHANAPRIYA; SATHISHKUMAR, 2016). A morte celular pode ser conduzida por uma via de sinalização ativa, conservada e geneticamente programada, conhecida como morte celular programada (*Programmed Cell Death* - PCD) (MAIZEL, 2015; KABBAGE et al., 2017).

A PCD direciona a eliminação seletiva de células durante o desenvolvimento vegetal, e/ou em resposta a patógenos e sinais de estresse, de maneira a controlar o número de células, eliminando células danificadas ou desnecessárias, de modo a atingir e manter a homeostase celular (DICKMAN et al., 2017; WATANABE et al., 2005; AMBASTHA et al., 2015; PETROV et al., 2015; GILCHRIST, 1998). Inversamente ao profundo conhecimento das formas de PCD em animais (por exemplo, a apoptose), o estudo sobre a regulação da PCD em plantas é limitado, e as complexas redes moleculares que direcionam e controlam as diferentes

formas de PCD em plantas recém estão sendo estabelecidas (DANEVA et al., 2016).

1.1 Morte Celular Programada (PCD) em Plantas

A morte celular programada é parte integrante do ciclo de vida das plantas, sendo observada em diferentes etapas durante o desenvolvimento vegetal, como na formação de xilema, maturação de sementes, senescência foliar e vários processos reprodutivos das plantas, além de estar envolvida durante as interações planta-patógeno e estresses ambientais. De maneira geral, nas plantas, a PCD desempenha papéis indispensáveis no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, assim como nas respostas a estresses ambientais (VAN HAUTEGEM et al., 2015; DICKMAN et al., 2017; DANEVA et al., 2016).

PCD em plantas e animais assemelham-se em várias características morfológicas e bioquímicas: encolhimento de células, condensação de cromatina, fragmentação nuclear, liberação de endonucleases e inibidores comuns, sugerindo que tanto as vias de PCD em plantas quanto em animais podem compartilhar um mecanismo conservado que desencadeia e regula o processo (ZHAO et al., 2018). De acordo com Dickman et al. (2017), as semelhanças nos marcadores característicos de apoptose animal e vegetal foram utilizadas para classificar as diferentes categorias de PCD em plantas: (1) morte celular semelhante a apoptose, (2) morte celular associada à senescência e (3) morte celular mediada por vacúolos. Nas diferentes formas de PCD nas plantas ocorre ativação de proteases, lipases, nucleases e transportadores, que atuam em importantes eventos como vias de sinalização, mobilização de nutrientes, maturação de proteínas, síntese e degradação de hormônios (ROCHA et al., 2017).

1.1.1 Morte Celular Semelhante a Apoptose

Apoptose é um tipo de PCD que ocorre em animais e é acompanhada por eventos bioquímicos que levam a mudanças características na morfologia e morte celular (DANEVA et al., 2016). O final da apoptose nos animais é marcada pela formação de corpos apoptóticos que serão posteriormente fagocitados. Os corpos apoptóticos estão ausentes na PCD em plantas devido a inexistência de um sistema fagocitário e presença de uma parede celular rígida. Nesse sentido, o termo morte celular semelhante à apoptose deve ser utilizado em plantas (DANON

et al., 2000; DICKMAN et al., 2017). Assim como em animais, as principais características morfológicas resultantes da apoptose em plantas são o encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, síntese intensiva de DNA mitocondrial e degradação do DNA (VANYUSHIN et al., 2004; REAPE; MCCABE, 2008).

Nos animais, a maioria das alterações morfológicas que ocorrem durante a apoptose e todas as diferentes vias de sinalização pode ser atribuída às ações das caspases: uma família de proteases aspárticas dependentes da cisteína, que realizam clivagens após um resíduo de ácido aspártico (Asp) (DICKMAN et al., 2017). As caspases possuem papéis essenciais em vários tipos de PCD em animais, sendo que a ativação de proteases ocorre através de uma cascata proteolítica, iniciada por caspases iniciadoras que ativam as caspases executoras, que por sua vez degradam uma infinidade de proteínas vitais (VANYUSHIN et al., 2004; VAN HAUTEGEM et al., 2015).

A via "mediada por mitocôndrias" é possivelmente a mais bem sucedida cascata bioquímica de ativação de caspases. Quando as células sofrem exposição a diversos estímulos indutores de morte celular, ocorre a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, na fase de sinalização. No citosol, o citocromo c liga-se à proteína Apaf-1 (fator de ativação da protease apoptótica 1) e, na presença de ATP/dATP, ativa a caspase-9. Tal evento desencadeia a ativação de uma cascata de caspases, na fase de execução, que leva à proteólise rápida e irreversível que se manifesta por mudanças morfológicas e bioquímicas caracterizadas como apoptose. Os mecanismos que regulam a PCD em plantas e em animais são similares: a apoptose de núcleos hepáticos de camundongos induzidos no citosol de células de cenoura pelo citocromo c, foi capaz de ativar proteases semelhantes a caspase de plantas (VANYUSHIN et al., 2004; ZHAO et al., 1999).

O papel das proteases tipo caspases na PCD em plantas foi estabelecido pela primeira vez através da identificação e caracterização de metacaspases: proteases de cisteína arginina /lisina-específica que são distantemente relacionadas às caspases, sendo encontradas em plantas, fungos e alguns protistas, mas não em animais (AMBASTHA et al., 2015; DANEVA et al., 2016). Por exemplo, a metacaspase-8 (AtMC8), um membro da família dos genes metacaspase em *Arabidopsis thaliana*, é fortemente regulada positivamente por UV-C, H₂O₂ e pelo herbicida metil-viologênio (HE et al., 2007).

A Figura 1 traz uma representação esquemática do envolvimento das metacaspases no processo de morte celular programada em plantas. Uma vez desencadeada a morte celular, ocorre a ativação das CLPs (capase-like proteases). O papel dos CLPs pode ser na ativação proteolítica de outras metacaspases PCDPs (*plant cell death proteases*) ou fatores transcrionais envolvidos em sua expressão, inativação de proteínas inibidoras endógenas de proteinase (PIs) ou o processamento direto de proteínas envolvidas na quebra e degradação ordenada das células, levando a morte celular (WOLTERING, 2002).

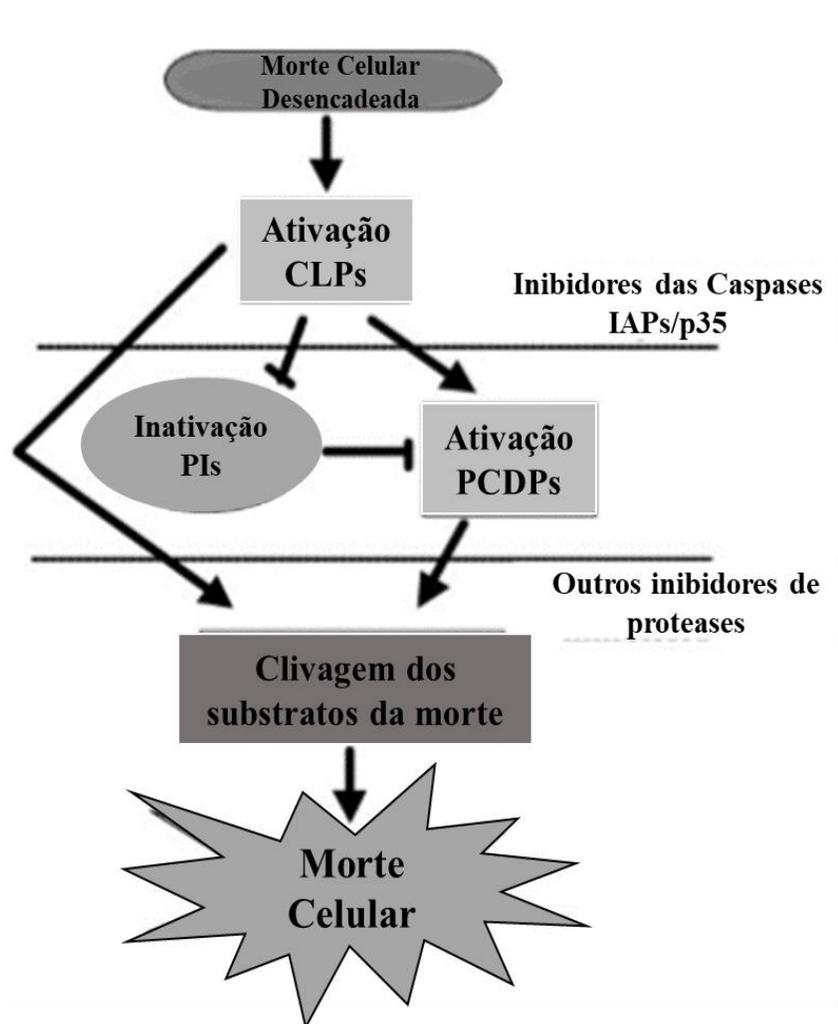


Figura 1. Representação esquemática do envolvimento das metacaspases (CLPs - proteases semelhantes a caspases), proteases de morte de células vegetais (PCDPs) e inibidores endógenos de proteinase (PIs) na morte de células vegetais (apoptóticas). Adaptado de Woltering (2002).

1.1.2 Morte Associada à Senescência

O envelhecimento natural das plantas e os estresses ambientais por elas enfrentados podem desencadear o processo de senescência (MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2004). A senescência é um componente essencial do desenvolvimento das plantas, permitindo a remobilização e a reciclagem de nutrientes de órgãos que não são mais úteis ou que estão de alguma maneira comprometidos (ROGERS, 2015). Análises ultraestruturais indicaram que as primeiras organelas a serem desmontadas durante o processo de senescência são os cloroplastos, proporcionando a reciclagem de grande parte dos lipídios e proteínas foliares, representando uma importante fonte de nitrogênio (N) para as plantas (SCHIPPERS et al., 2015). A morte celular marca o estágio final da senescência das plantas e ocorre quando a maioria dos nutrientes é recuperada, de forma temporalmente coordenada (DANEVA et al., 2016; WOO; MASCLAUX-DAUBRESSE; LIM, 2018).

Durante o seu desenvolvimento, as plantas passam por senescência de dois tipos: senescência sequencial, no qual o programa de recuperação de nutrientes começa com as folhas mais antigas, seguindo o gradiente de idade dentro da planta; e pela senescência reprodutiva, ocorrendo ao nível da planta inteira com praticamente total desmantelamento das folhas, de maneira a suportar o enchimento de grãos (SCHIPPERS et al., 2015). Após a iniciação da senescência, as organelas e seus constituintes bioquímicos são desmontados, degradados e remobilizados em órgãos vegetativos para suportar o crescimento de brotos e raízes recém-emergentes e o desenvolvimento de frutos e sementes (KIM; CHO; YOO, 2017). Exemplo de senescência ao nível de toda a planta pode ser verificado em arroz, milho, soja e trigo na época da colheita (WOO et al., 2013).

Sob condições ambientais adversas, o processo de senescência é iniciado como parte da resposta de aclimação. Durante estresse salino, por exemplo, o acúmulo de íon sódio (Na⁺) nas folhas mais velhas pode promover a sobrevivência de tecidos jovens para garantir o sucesso reprodutivo (SCHIPPERS et al., 2015). O amarelecimento das folhas, decorrente da perda da cloforila é normalmente utilizado como indicador da senescência das plantas. Nesse sentido, plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) que sofreram tratamento durante três semanas sob alta salinidade (NaCl 100 mM) tiveram os parâmetros foliares relacionados à senescência

fortemente afetados, como teor de clorofila, teor de proteína e oxidação lipídica (GHANEM et al., 2008).

Ao sofrerem estresse hídrico, as plantas utilizam a senescência foliar como forma de adaptação fisiológica (Figura 2). Durante o estresse hídrico, pode ocorrer remobilização de nutrientes, possibilitando que as folhas, frutas ou flores mais jovens se beneficiem dos nutrientes que foram acumulados ao longo da vida útil da folha. A senescência foliar induzida pela seca, seguida de abscisão foliar, evita perdas significativas de água por meio da transpiração, auxiliando na manutenção de um balanço hídrico favorável na planta inteira.

A senescência acontece gradativamente nas folhas, sendo caracterizada por três fases: a fase de iniciação, a fase de reorganização e a fase terminal. Inicialmente, as cascatas de sinalização desencadeiam o processo de senescência via alterações na expressão gênica, que culminam em alterações nas concentrações de citocinas, ABA, e outros reguladores, como espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes podem regular a expressão dos genes associados à senescência (SAGs), propiciando a progressão da senescência foliar durante a fase de reorganização. É na fase reorganizacional que grandes alterações metabólicas e ultraestruturais são vistas, como por exemplo, degradação da clorofila, redução da atividade fotossintética e perda da integridade celular, sendo todas alterações ligadas à remobilização de nutrientes. Por fim, considera-se que o término da senescência foliar ocorra somente quando a fase de reorganização estiver concluída e a remobilização de nutrientes for realizada (MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2004; PETROV et al., 2015).

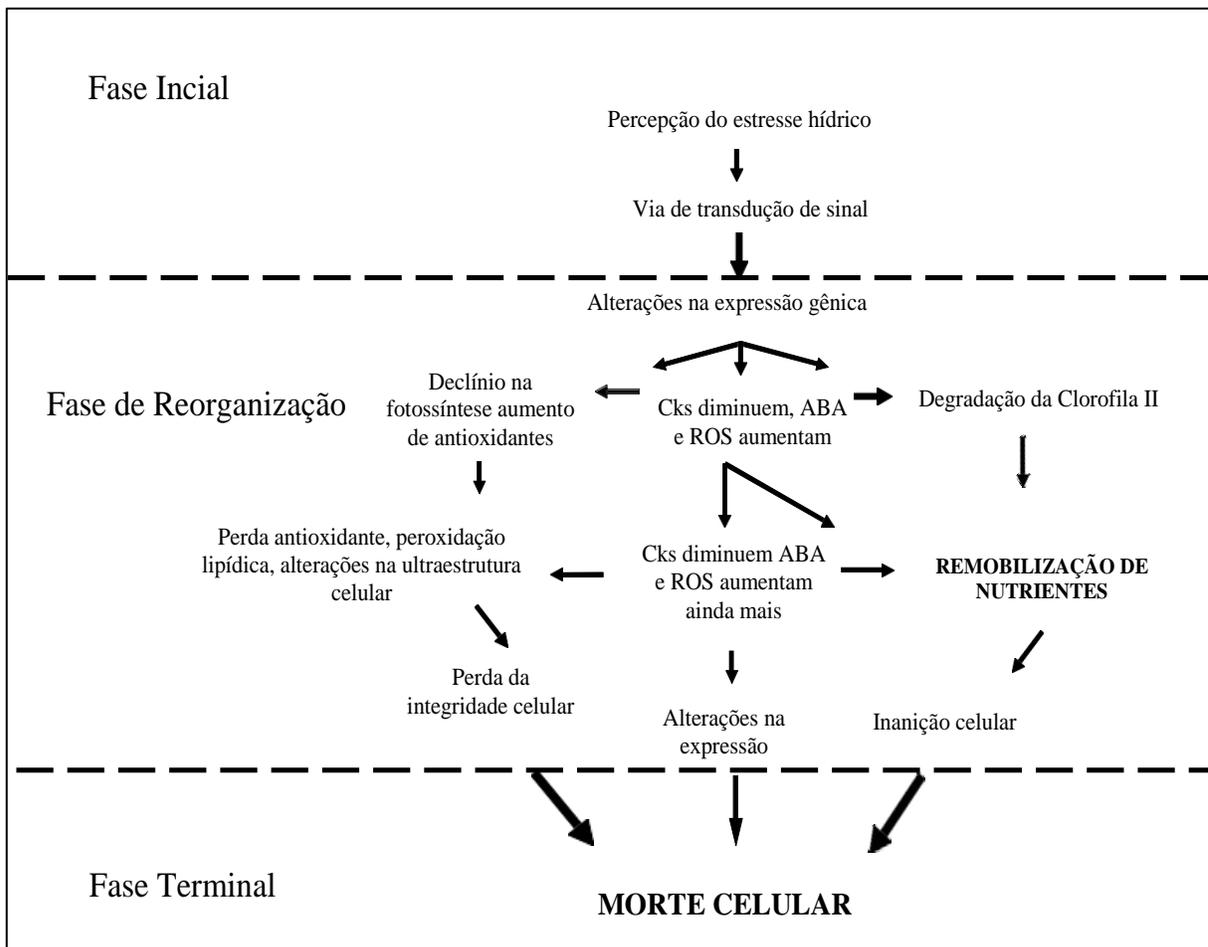


Figura 2. Diagrama que descreve as mudanças ocorridas durante as fases de iniciação, reorganização e terminal da senescência foliar induzida pela seca. A fase de iniciação é o resultado de cascatas de sinalização precoces que levam a mudanças na expressão gênica e desencadeiam a indução do processo de senescência. As alterações na expressão gênica levam a mudanças nas concentrações endógenas de reguladores de plantas determinando a progressão da senescência foliar durante a fase de reorganização. A fase terminal da senescência foliar ocorre devido ao acúmulo de fatores indutores de morte celular levando a perda completa da integridade celular e, finalmente, à morte. CKs: citocininas; ROS: espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Munné-bosch e Alegre (2004)

1.1.3 Morte Celular Mediada por Vacúolos

As plantas utilizam vacúolos e os conteúdos vacuolares para a PCD. Os vacúolos vegetais executam papel fundamental na eliminação de células vegetais indesejadas ou desnecessárias na ausência de um sistema fagocitário (HATSUGAI; HARA-NISHIMURA, 2010). O englobamento do material citoplasmático pelo vacúolo está associado à morte celular vacuolar (VCD), levando os pesquisadores a descrever essa forma de morte celular como o

equivalente da autofagia animal (DICKMAN et al., 2017). A autofagia realiza a morte celular "formativa" vacuolar, impedindo a necrose destrutiva em células que estão terminalmente diferenciadas (MININA; BOZHKOV; HOFIUS, 2014).

As principais características citológicas da morte celular vacuolar são o alargamento do vacúolo através da fusão de vesículas transportando carga citoplasmática e ruptura vacuolar liberando enzimas líticas para o citoplasma. O conteúdo citoplasmático de células submetidas a morte vacuolar é distribuído em vacúolos líticos para degradação, através da fusão dos vacúolos, resultando na formação de um enorme compartimento lítico. Por fim, o rompimento de uma membrana vacuolar leva a uma rápida acidificação intracelular e à hidrólise do conteúdo celular residual (MININA; SMERTENKO; BOZHKOV, 2014; HATSUGAI; HARA-NISHIMURA, 2010).

As enzimas de processamento vacuolar (VPEs), identificadas como proteinases responsáveis pela maturação e ativação de proteínas vacuolares em plantas, provocam a ruptura vacuolar, iniciando a cascata proteolítica levando à PCD na resposta imune da planta. Além disso, a via da PCD dependente de VPE está envolvida não apenas na resposta imune, mas também ocorre em quase todas as células e tecidos vegetais, nas respostas a uma diversidade de indutores de estresse e no desenvolvimento de vários tecidos (ROGERS, 2015; HATSUGAI et al., 2015). As VPEs desempenham um papel único na regulação do sistema lítico das plantas durante os processos de defesa e desenvolvimento (HARA-NISHIMURA et al., 2005).

Um modelo hipotético da via da PCD vacuolar é apresentado na Figura 3. Na presença de um sinal indicativo de PCD, ocorre a indução do auto-processamento da metacaspase do tipo II, propiciando o início de sua atividade proteolítica. A metacaspase uma vez ativa, atua inibindo um repressor da autofagia ao clivá-lo ou interagindo com o mesmo. Isso, por sua vez, faz com que o fluxo autofágico aumente, levando à liberação do conteúdo citoplasmático no vacúolo lítico e à auto-desmontagem gradual da célula terminalmente diferenciada (MININA; SMERTENKO; BOZHKOV, 2014). Assim sendo, a indução de autofagia e o colapso da membrana vacuolar são características conhecidas da morte celular vacuolar, sendo desenvolvida pelas plantas como uma estratégia de suicídio celular regulada, mediada pelas VPEs e pelos vacúolos (HARA-NISHIMURA et al., 2005; UENO et al., 2016).

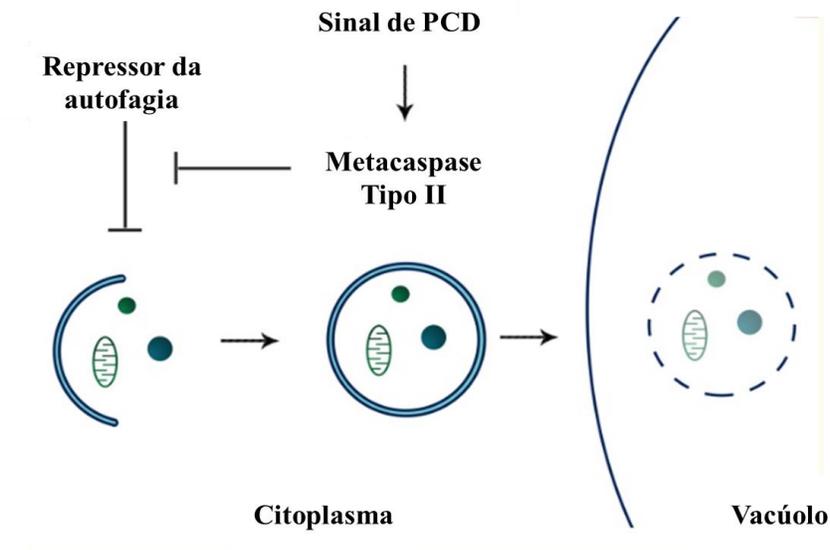


Figura 3. Modelo proposto para a morte celular mediada por vacúolos. A autofagia é essencial para a vacuolização de células submetidas a desenvolvimento de PCD, sendo ativada pela metacaspase tipo II. O conteúdo citoplasmático é liberado e degradado no vacúolo lítico. Adaptado de Minina, Smertenko e Bozhkov (2014)

1.2 Reguladores da Morte Celular Programada

Uma maneira de obter informações sobre os mecanismos genéticos, moleculares e fisiológicos da PCD em plantas, em diferentes níveis de complexidade (celular ou organismo), dá-se através da identificação de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que exibam morte celular de maneira desregulada (CZARNOCKA et al., 2017). Um dos mutantes mais bem estudados, em termos de PCD, é o *lsd1* (LESION SIMULATING DISEASE 1) (DIETRICH et al., 1997). O fenótipo *lsd1* é caracterizado pela chamada morte celular descontrolada, que se manifesta como uma incapacidade de restringir a propagação da PCD, após a mesma ter sido iniciada (MATUSZKIEWICZ et al., 2018). Assim sendo, tal classe fenotípica exibe lesões que simulam a resposta de resistência a doenças mesmo na ausência de patógenos, sendo útil para identificação de genes com importantes papéis nas vias de transdução de sinal para o reconhecimento de patógenos, morte celular programada ou na resistência sistêmica adquirida (*Systemic acquired resistance* – SAR) (DIETRICH et al., 1997).

Os genes *LSD* codificam uma família de proteínas contendo motivos dedo de zinco que são caracterizadas por desempenhar papéis importantes em uma ampla gama de funções celulares: regulação transcricional, controle de apoptose e interações proteína-proteína. A

proteína LSD1 possui três domínios conservados de dedos de zinco, definidos por CxxCxRxxLMYxxGASxVxCxxC. Como exemplos de proteínas de *Arabidopsis* que contêm um ou mais domínios de dedo de zinco do tipo LSD1, temos: as proteínas LOL1 (At1g32540) e LOL2 (At4g21610), as metacaspases AtMC1 (At1g02170), AtMC2 (At4g25110) e AtMC3 (At5g64240; embora o motivo do zinco não seja canônico) e LOL6 (At1g79350) (DIETRICH et al., 1997; CABREIRA et al., 2013; COLL; EPPLE; DANGL, 2011). É considerado que o LSD1 atue como uma proteína “*scaffold*” no citoplasma, realizando o sequestro de reguladores positivos da morte celular (LOL1, AtMC1, AtbZIP10) e impedindo dessa maneira suas funções e inibindo, portanto, a PCD (COLL; EPPLE; DANGL, 2011; CZARNOCKA et al., 2017; LI et al., 2013; WITUSZYŃSKA et al., 2014).

Pesquisadores propuseram em seu trabalho uma rede denominada “AtLSD1 - deathsome”, composta por vários genes relacionados ao controle da PCD em plantas (Figura 4). Com os resultados obtidos através de duplo-híbrido em levedura foi apresentado um diagrama que descreve as interações entre os principais reguladores de morte celular conhecidos com seus parceiros de interação. A interação entre AtLSD1 e AtMC1 ocorre através dos seus respectivos domínios dedo de zinco, ocorrendo a retenção de AtMC1 no citoplasma, impossibilitando a propagação da PCD. Tal interação não acontece com AtMC2, a qual regula negativamente AtMC1, resultando em uma regulação negativa da PCD, analogamente ao AtLSD1. A interação de AtLSD1 com AtbZIP10 (*basic leucine zipper 10*), um regulador positivo de PCD, ocorre também via retenção da mesma no citoplasma, impedindo seu deslocamento para o núcleo da célula (COLL; EPPLE; DANGL, 2011).

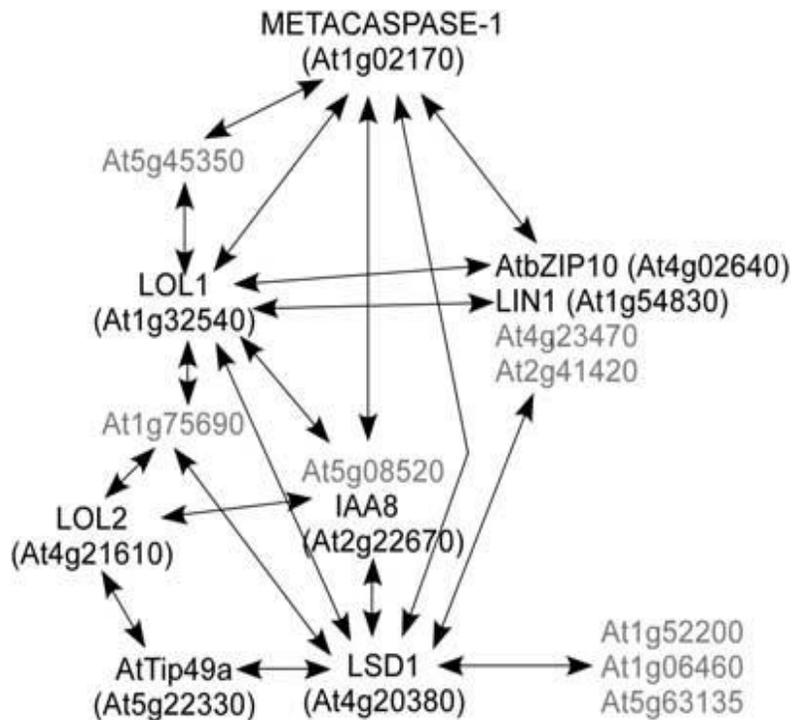


Figura 4: Rede denominada "deathosome": Diagrama que descreve as interações entre os reguladores de morte celular conhecidos e seus parceiros de interações através de um duplo híbrido em levedura. Os genes sem função anotada são mostrados em cinza. Coll, Epple e Dangl (2011)

LOL1 é considerado um regulador positivo da PCD de plantas mediante comprovação em três contextos. Primeiramente, *LOL1* é necessário para que *lsd1* mantenha seu fenótipo de morte celular descontrolada. Em segundo lugar, a superexpressão muito modesta dos níveis de *LOL1* em plantas WT aumenta a resposta de hipersensibilidade (HR) induzida por patógenos. Terceiro, a superexpressão condicional de *LOL1* em altos níveis é suficiente para induzir a morte celular em plantas selvagens e mutantes *lsd1* (EPPLE et al., 2003). Nesse sentido, *LOL1* e *LSD1* podem funcionar como reguladores ou *scaffolds* transcricionais antagônicos, competindo pelos mesmos elementos promotores e/ou fatores de transcrição acessórios em genes de execução de morte celular (EPPLE et al., 2003).

Dois genes que codificam proteínas com motivo PLAC8 (*Placenta-specific 8*), *At1g52200* e *At4g23470*, interagem com *LSD1* e foram descritos como componentes "LSD1-deathosome". As proteínas contendo motivos PLAC8 formam uma grande família cujos membros podem ser encontrados em fungos, algas, plantas superiores e animais (SONG et al., 2011).

1.3 Família Gênica PLAC8

Mediante os resultados obtidos a partir de microarranjos de RNAs placentários e embrionários de aproximadamente 15.000 genes de camundongos, Galaviz-hernandez *et al.* (2003) identificaram o primeiro gene PLAC8, associado ao espongiotrofoblasto. Dessa maneira, surgiu a denominação PLAC, *Placenta-specific genes*. Em camundongos, PLAC8 é uma proteína de 112 aminoácidos rica em cisteína, com 12,5 kDa, codificada por um gene localizado no cromossomo 5 (GALAVIZ-HERNANDEZ *et al.*, 2003). Os genes PLAC8 são caracterizados por codificarem proteínas que possuem regiões N-terminal conservadas ao longo da evolução: CCXXXXCPC ou CLXXXXCPC (SONG *et al.*, 2011).

Recentemente, através de análises *in silico*, utilizando o domínio rico em cisteína que caracteriza as proteínas PLAC8 (Pfam PF04749), foram recuperadas 445 sequências semelhantes à proteína codificada pelo primeiro gene PLAC8 caracterizado. Essas sequências permitiram a classificação desses genes em três tipos: tipo I (337 genes), II (48 genes), III (71 genes). Os genes do tipo I são encontrados em mamíferos, fungos, plantas e algas, enquanto os tipos II e III são restritos das plantas (CABREIRA *et al.* no prelo). As proteínas contendo motivos PLAC8 variam em tamanho de 108 a 557 aminoácidos, sendo a maioria relativamente curta e inferior a 200 aminoácidos. Os três tipos de genes PLAC8 codificam proteínas começando em um resíduo de triptofano (W): no resíduo 15 nos tipos I e II, e no resíduo 16 no tipo III. Os genes PLAC8 do tipo I são os mais bem caracterizados até o momento, enquanto que os genes classificados como tipo III não foram caracterizados funcionalmente. Genes de cópia única são encontrados exclusivamente nos tipos II e III (SONG *et al.*, 2011; CABREIRA C. *et al.*, no prelo).

A Figura 5 mostra um alinhamento entre as proteínas PLAC8 dos tipos I, II e III, codificada pelos 17 membros da família PLAC8 encontrados em *Arabidopsis thaliana*. Os genes que interagem com LSD1, At1g52200 e At4g23470 são representados em tal alinhamento pelos números 11 e 16 respectivamente, pertencendo, portanto, aos genes PLAC8 do tipo I e III. O gene At1g52200 apresenta maior modulação frente a condições de estresses abióticos em comparação com o gene At4g23470 via análises *in silico* através do browser ePlant (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>). Tal gene é denominado a partir de agora como *AtPLAC8-11.1*.

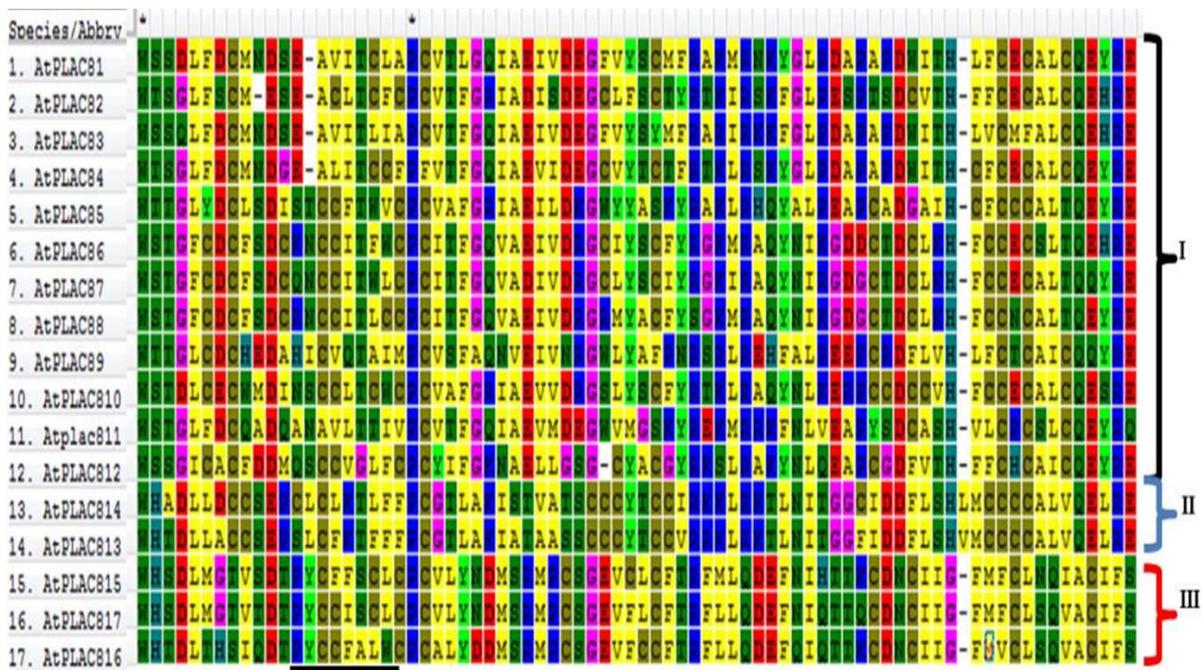


Figura 5: Alinhamento das dezessete proteínas PLAC8 encontradas em *Arabidopsis thaliana*, sendo separadas em proteínas dos tipos I, II e III. A barra preta indica a região rica em cisteína conservada ao longo da evolução. (Cabreira C. et al. no prelo)

As proteínas contendo motivos PLAC8 foram relatadas como tendo funções variadas nos diferentes organismos nos quais são expressas (SONG et al., 2011). Em plantas, por exemplo, as proteínas contendo o domínio PLAC8 são componentes importantes como reguladores da divisão celular e a organogênese (LIBAULT; STACEY, 2010). Ademais, em humanos, PLAC8 é fundamental para a progressão do câncer de pâncreas, promoção da conversão tumorigênica e a superexpressão de PLAC8 nos fibroblastos murinos levou ao aumento na resistência a estímulos apoptóticos e a perda do controle do ciclo celular (KINSEY et al., 2014; CABREIRA et al., no prelo; ROGULSKI et al., 2005).

1.3.1 PLAC8 em Plantas

De acordo com Song et al. (2011), em plantas, as proteínas contendo o motivo PLAC8 atuam em diferentes processos biológicos como:

I) Regulação do tamanho do fruto e número de células: Em tomate, um importante *locus* de característica quantitativa (*Quantitative Trait Locus* - QTL), FW 2.2, é responsável por regular o peso e tamanho do fruto do tomateiro, respondendo por até 30% do tamanho do fruto. FW2.2 atua como regulador negativo da divisão celular durante os estágios iniciais do desenvolvimento dos frutos. FW2.2 mostrou conter um domínio PLAC8 (tipo I), estruturas terciárias e funções bioquímicas potencialmente similares. Nesse sentido, os genes *FWL* e *PLAC8* compartilham um ancestral comum antes da divergência entre plantas e animais, atuando como reguladores celulares para controlar o processo de divisão das células e a organogênese. Os genes denominados *CNR* foram retratados como ortólogos de *fw2.2* em milho (*Zea mays*). A proteína codificada pelo gene *CNR1* possui o domínio CLXXXXCPC e atua para reduzir o tamanho total da planta quando superexpresso ectopicamente. As diferenças no tamanho das plantas e órgãos ocorreram por alterações no número de células, ao invés de alterações no tamanho das células (FRARY, 2000; CONG; LIU; TANKSLEY, 2002; LIBAULT; STACEY, 2010).

II) Resistência ao Cádmiio (Cd) e Detoxificação de Zinco (Zn): Os membros da família de proteínas PCR (*Plant Cadmium Resistance*) contêm o domínio CCXXXXCPC característico das proteínas PLAC8. Dois membros desta família, *AtPCR1* (segundo Fig.5 *AtPLAC8-8*) e *AtPCR2* (segundo Fig. 5 *AtPLAC8-6*) desempenham um papel importante no transporte de metais pesados, como Cd e Zn. O tratamento de plântulas de *A. thaliana* com Cd induz a expressão de *AtPCR1* e *AtPCR2* e a expressão heteróloga de PCR1 e PCR2 em levedura restaura a tolerância ao Cd na cepa de levedura sensível ao Cd (*ycf1*). Plantas com perda de função (*atpcr2*) foram expostas a diferentes metais pesados essenciais e não essenciais. Na presença de Zn, Cu e Cd, o crescimento de plantas mutantes foi altamente prejudicado. As raízes das plantas *atpcr2* acumulavam mais Zn do que as plantas controle, enquanto as raízes de plantas superexpressando *AtPCR2* continham menos Zn, indicando que *AtPCR2* remove o Zn das raízes, atuando como um transportador de Zn essencial em *Arabidopsis* (SONG et.al 2004; SONG et al. 2010; SONG et al. 2011).

III) Influxo de Cálcio: O íon Ca^{2+} é de extrema importância para as plantas, atuando na formação da parede celular bem como na regulação de eventos fisiológicos intracelulares. A

proteína da membrana plasmática MCA1 (*Mid1-complementing activity*, segundo Fig. 5 *AtPLAC8-13*) está envolvida na captação de Ca^{2+} em *Arabidopsis thaliana*. A superexpressão de MCA1 aumentou a captação de Ca^{2+} nas raízes. O estudo dos domínios MCA1 indicou que a metade C-terminal possui dois a quatro segmentos transmembrana putativos e um domínio rico em cisteína de função desconhecida, chamado de motivo PLAC8 (NAKAGAWA et al., 2007; YAMANAKA et al., 2010).

1.4 *AtPLAC8-11.1*

O gene *AtPLAC8-11.1* (At1g52200), pertencente à família PLAC8, localiza-se no cromossomo 1 e codifica uma proteína de 190 aminoácidos. Sua função molecular é desconhecida, porém, predições indicam envolvimento em resposta a estresses oxidativos. De acordo com o banco de informações TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), a localização subcelular predita da proteína é na membrana plasmática. Ainda de acordo com o TAIR, verifica-se que *AtPLAC8-11.1* é expresso em diversas estruturas da planta, como os cotilédones, célula guarda, hipocótilo, meristema de inflorescência, raiz, caule e folha.

Análises *in silico* com o auxílio da base de dados Phytozome apresentam o gene estruturado em quatro éxons e três íntrons. As sequências correspondentes a esse locus gênico são: sequência genômica (1462 pb), sequência transcrita (898 pb), sequência codificante (573 pb), bem como a sequência peptídica (190 resíduos de aminoácidos). No trabalho de Theologis et al. (2000), referente ao sequenciamento do cromossomo 1 de *Arabidopsis thaliana*, houve o depósito de uma sequência predita variante de *splicing* para o gene At1g52200, designada At1g52200.2. Entretanto, a existência da forma variante de *splicing* At1g52200.2 não foi demonstrada experimentalmente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho de mestrado tem por objetivo estudar o gene *AtPLAC8-11.1* e seu papel em relação à morte celular programada em plantas.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- a) Obter e genotipar linhagens mutantes de *Arabidopsis thaliana* com inserção de T-DNA para o gene *AtPLAC8-11.1*;
- b) Amplificar a partir de cDNA de *A. thaliana*, as sequências codificadoras (CDS) do gene *AtPLAC8-11.1* e do produto de seu *splicing* alternativo *AtPLAC8-11.2*;
- c) Realizar a clonagem da sequência CDS de *AtPLAC8-11.1* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen®), para posterior recombinação com os vetores de destino binários pEarleyGate100, pEarleyGate101 e pEarleyGate302;
- d) Gerar plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *AtPLAC8-11.1*, via método de Floral Dipping (Zhang et al. 2006);
- e) Investigar a localização subcelular da proteína em microscópio de fluorescência.
- f) Realizar experimentos de indução de senescência com as plantas superexpressando o gene *AtPLAC8-11.1* e com as plantas mutantes para verificar o papel de *AtPLAC8-11.1* na morte celular programada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais, reagentes, equipamentos e a metodologia utilizada neste trabalho estão descritos nesta seção separados por metodologias referentes às etapas de clonagem e transformação, bem como metodologias utilizadas para os experimentos com os mutantes de T-DNA.

3.1 CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO

3.1.1 Amplificação das sequências codificantes do gene *AtPLAC8-11.1* e do *splicing* alternativo *AtPLAC8-11.2*

Em virtude da existência predita de um *splicing* alternativo para o gene *AtPLAC8-11.1*, buscou-se desenhar oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificação de ambas versões codificantes do gene em estudo. Os *primers* foram desenhados com auxílio do site <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. A Tabela 1 lista os *primers* que foram utilizados nas reações em cadeia da polimerase usando como molde cDNA de folha de *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0) pré-existente no laboratório. Alguns desses primers foram desenhados de maneira a remover o codon de término (*stop*) - necessário para o seguimento da síntese proteica e fusão à proteína YFP (*yellow fluorescent protein*) na recombinação com os vetores de destino.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de RT-PCR

Nome	Sequência	Produto
<i>AtPLAC8-11.1</i>	F: CACCATGGGTCGTGTC ACTACTCCAT R_no stop: CTTAGACATATATTGATTTGTAGGAGCAAA R_stop: TTAGACATATATTGATTTGTAGGAGCA	573 pb
<i>AtPLAC8-11.2</i>	F: CACCATGGGTCGTGTC ACTACTCCAT R_stop: TCACCACACTTGAACACTTATATCAA	564 pb

F: Forward; R: Reverse. * Em vermelho está destacado a sequência de 4 pares de bases (CACC) necessária para clonagem direcional do gene de interesse no vetor de entrada pENTRD-TOPO (Invitrogen®).

As reações de PCR foram realizadas em aparelho Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®) conforme descrição a seguir. Para ambos os genes, as reações foram composta por 1 µL de cDNA de folha de *Arabidopsis thaliana*; 1 µL de cada *primer* (Forward e Reverse) ambos na concentração de 10 µM; 5 µL do tampão 5X Q5 Reaction Buffer; 0,5 µL de dNTPs 10 mM; 0,25 µL da enzima Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polimerase (New England Biolabs); 5 µL 5X Q5 High GC Enhancer e água ultrapura (Milli-Q) para completar o volume em 25 µL.

As condições durante as reações de amplificação divergiram entre os *primers* utilizados. A temperatura de anelamento do conjunto de primers necessários para amplificação do gene *AtPLAC8-11.1* foi de 64 °C, enquanto que, para o conjunto de *primers* necessários para amplificação do gene *AtPLAC8-11.2*, foi de 59°C.

As reações de PCR foram realizadas conforme condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições utilizadas nas reações de PCR (Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polimerase)

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	98°C	30 segundos
*Desnaturação	98°C	10 segundos
*Anelamento	64°C/59°C	20 segundos
*Extensão	72°C	20 segundos
Repetição das etapas */N° de ciclos	-	35 vezes
Final da Extensão	72°C	2 minutos

A visualização dos resultados obtidos nas reações de PCR foi realizada através da eletroforese em cuba horizontal com tampão TBE 0.5X a 90 V e 100 mA, com emprego do volume total da reação em gel de agarose a 1.2 % corado com GelRed® 1:500 (Biotium), o qual foi em seguida visualizado através de um fotodocumentador para gel de eletroforese (Loccus Biotecnologia). O marcador de peso molecular utilizado foi DNA Ladder 100pb (Ludwig Biotecnologia).

3.1.2 Clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO

Os fragmentos amplificados foram clonados em vetores pENTR/D-TOPO® (Invitrogen®) de 2580 pb, de maneira a gerar clones de entrada para o sistema *Gateway* (Invitrogen®). Para tal, utilizou-se o kit pENTR Directional TOPO® Cloning (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Nas reações de clonagem, utilizou-se 1,0 µL (20 ng/µL) do produto fresco da PCR obtido a partir da purificação da banda do gel de agarose, utilizando o Kit de Extração de Gel GenElute™ (Sigma-Aldrich); 1,0 µL de Solução Salina; 1,0 µL do vetor pENTR/D-TOPO e água ultrapura (Milli-Q) completando o volume final da reação em 6,0 µL. A reação foi preparada e permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o produto recombinado foi inserido em células bacterianas termocompetentes de *E. coli* OmniMAX, mediante choque térmico. Para isso, utilizou-se 50 µL de células termocompetentes e 3 µL da reação do produto recombinado. Esta mistura foi incubada em gelo durante 20 minutos e, em seguida, prosseguiu-se com o choque térmico em banho-maria a 42 °C por 30 segundos, retornando ao gelo por mais dois minutos. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de meio Luria-Bertani (LB - Invitrogen) às células transformadas, e as mesmas foram incubadas a 37 °C com agitação de 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific) durante 1 hora. Após a recuperação, as células bacterianas transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar (Invitrogen) seletivo contendo antibiótico canamicina (50 mg/L). As placas foram mantidas por 18 horas em estufa à 37 °C.

3.1.2.1 Análise por PCR das colônias transformantes contendo o vetor de entrada

Para seleção de colônias de bactérias transformadas com o vetor de entrada pENTR/D-TOPO clonado com os genes *AtPLAC8.11* e *AtPLAC811.2*, separadamente, foram realizadas PCRs com os *primers* descritos na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas com a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®). Cada reação foi composta por 1,5 µL de cada *primer* ambos na concentração de 10 µM, 2,5 µL 10X PCR Buffer Minus Mg, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 0,1 µL de Taq Platinum DNA Polimerase 5U/µL e água ultrapura (Milli-Q) para completar os volumes das reações para 25 µL. A metade de cada colônia crescida no meio seletivo foi incluída à reação de PCR com auxílio de uma ponteira

(p200) estéril, sob capela de fluxo laminar.

As condições utilizadas no termociclador foram as mesmas para os dois genes e estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições utilizadas nas reações de PCR (Taq Platinum DNA Polimerase)

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	2 minutos
*Desnaturação	94°C	30 segundos
*Anelamento	55°C	1 minuto
*Extensão	72°C	1 minuto
Repetição das etapas */Nº de ciclos	-	35 vezes
Final da Extensão	72°C	5 minutos

A visualização dos produtos obtidos com a PCR ocorreu conforme 3.1.1.

3.1.2.2 Isolamento de plasmídeo (Miniprep) das colônias transformantes

Colônias de bactérias transformantes contendo o vetor de entrada pENTR/D-TOPO clonado com os genes *AtPLAC8.11* e *AtPLAC811.2*, separadamente, foram inoculadas isoladamente em tubos falcon de 15 mL contendo 2 mL de meio LB líquido e 2 µL do antibiótico canamicina (50mg/L) como marca de seleção plasmidial. As culturas bacterianas foram incubadas por 18 horas em shaker com agitação (Cienlab) à 37 °C. As extrações do DNA plasmidial foram realizadas com o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega), conforme recomendação do fabricante, sendo ao final quantificadas em NanoDrop Lite (Thermo Scientific™).

3.1.2.3 Confirmação das clonagens em pENTR/D-TOPO por restrição enzimática

Foram realizadas clivagens com endonucleases específicas para confirmação da presença dos genes *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em pENTR/D-TOPO. Com auxílio da ferramenta NEBCutter foram escolhidas duas enzimas para as reações de digestão: EcoRV e NcoI (New England Biolabs®), ambas com 100% de atividade no buffer NEBuffer 3.1.

As reações foram realizadas com 500 ng de DNA plasmidial, 0,5 µL de cada endonuclease (10 U); 1 µL do Buffer 1X NEBuffer™ 3.1; 1 µL de BSA 1:10 (200 µg/mL) e água ultrapura para completar um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas em termociclador a 37 °C por 3 horas, ocorrendo posteriormente inativação da enzima a 80 °C por 20 minutos. A visualização das reações de clivagens ocorreu conforme descrito no item 3.1.1.

3.1.2.4 Sequenciamento de DNA

As amostras de plasmídeo contendo *AtPLAC8-11.1* que obtiveram padrões corretos de digestão, conforme descrito no item acima, foram enviadas para sequenciamento na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nestes sequenciamentos os *primers* utilizados foram M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Para o variante de splicing *AtPLAC8-11.2*, os *primers* utilizados para o sequenciamento são os descritos na tabela 1, que amplificam a região codificante da forma variante de *splicing AtPLAC8-11.2* de 564 pb.

Os alinhamentos das seqüências obtidas nos sequenciamentos versus a seqüência do pENTR/D-TOPO-*AtPLAC8-11.1/AtPLAC8-11.2* foram realizados utilizando os softwares Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA.7), Chromas (Consensus-based colouring of multiple alignments) e transferidas para o software GeneDoc para melhor visualização

3.1.3 Recombinação com os vetores de destino pEarleyGate

As reações de recombinação entre o vetor de entrada e os vetores de destino binários pEarleyGate (EARLEY et al. 2006), escolhidos para utilização neste trabalho, foram realizadas somente para o gene *AtPLAC8-11.1*. As reações de recombinação entre o plasmídeo pENTR/D-

TOPO-*AtPLAC8-11.1* e os vetores de destino pEarleyGate 100 (superexpressão), 101 (superexpressão + localização subcelular) e 302 (superexpressão + flag de histidina) mostrados na Figura 6, foram realizadas por meio da enzima LR clonase com o uso do kit LR Clonase II (Invitrogen).

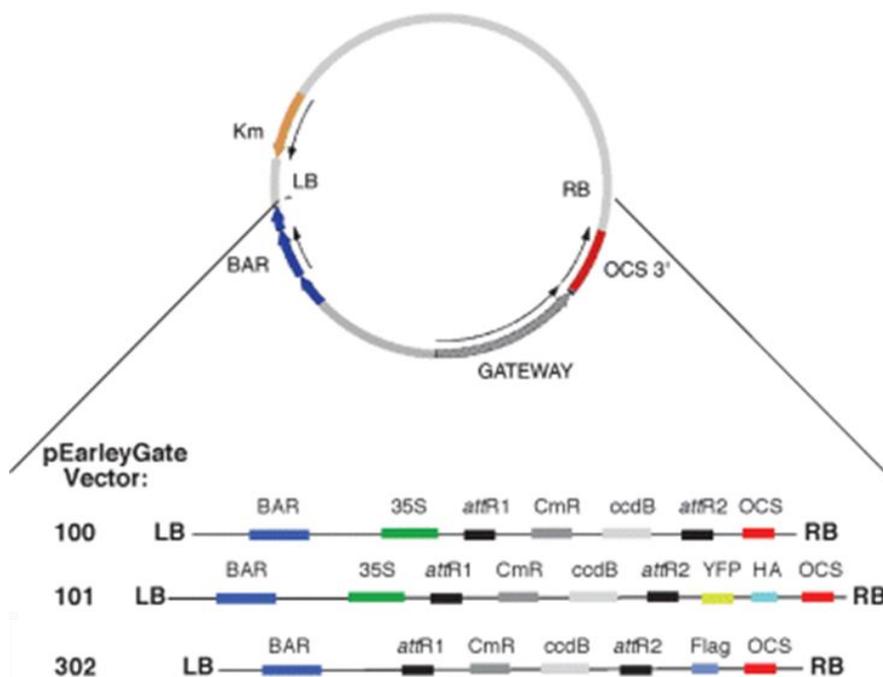


Figura 6. Vetores de transformação de plantas pEarleyGate. Todos os plasmídeos pEarleyGate são vetores binários e têm as sequências LB (left border) e RB (right border) para transferência de T-DNA mediada por *Agrobacterium*. Os cassetes Gateway em cada vetor incluem locais de recombinação attR1 e attR2; gene de resistência ao cloranfenicol (CmR); gene *codB* que é letal para a maioria das cepas de *Escherichia coli*; BAR, o gene de resistência a herbicida Basta para seleção de plantas transgênicas; 35S, o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e seu *enhancer* a montante. Vetores pEarleyGate diferentes permitem a engenharia e a expressão de proteínas fusionadas com tags de HA, FLAG, e/ou proteínas fluorescentes amarelas (YFP) Earley et al. (2006).

Antes da realização das reações de recombinação, o vetor de entrada pENTR/D-TOPO-*AtPLAC8-11.1* sofreu uma restrição para linearização com enzima *ApaI* (New England Biolabs®), visto que ambos vetores (entrada e destino) possuem a mesma marca de seleção: resistência ao antibiótico canamicina. O protocolo de restrição foi conforme o item 3.1.2.3, porém com algumas alterações: aumento do tempo de incubação da reação para 16 horas visando a completa clivagem do material; o buffer utilizado, no qual a enzima apresenta 100% de atividade foi o CutSmart® Buffer e a quantidade de DNA utilizado na reação foi 2000 ng do

vetor de entrada.

Para cada reação de recombinação, 125 ng do vetor de entrada linearizado e purificado (pENTR/D-TOPO-*AtPLAC8-11.1*), e 125 ng dos vetores de destinos (pEarleyGate 100,101 e 302) e água ultrapura (Milli-Q) em quantidade suficiente para completar o volume final de 8 µL foram adicionados em tubos individuais de 0,2 mL sob temperatura ambiente. Em seguida, foram executados os passos descritos no protocolo do fabricante.

A mistura enzimática LR Clonase II foi descongelada em gelo por 2 minutos sendo agitada em vortex cuidadosamente duas vezes por dois segundos cada vez. Após, 2 µL da mistura enzimática LR Clonase II foram adicionados à reação, que foi agitada em vortex e centrifugada brevemente. A reação foi incubada a 25 °C por 12 horas em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Por fim, adicionou-se 1 µL da solução de Proteinase K para interromper a reação, e incubou-se a amostra a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, 2 µL da reação de recombinação foram utilizados na transformação de *E. coli* OmniMAX, por choque térmico, conforme protocolo descrito no item 3.1.2.

3.1.3.1 Análise por PCR das colônias transformantes nas recombinações entre os vetores de entrada e vetores de destino e isolamento de plasmídeo (Miniprep)

As análises por PCR foram realizadas conforme descrito no item 3.1.2.1. e indicado na tabela 3. Seguiu-se com o protocolo de isolamento de plasmídeos positivos para PCR de colônia conforme item 3.1.2.2.

3.1.3.2 Confirmação das recombinações por restrição enzimática

As clivagens foram realizadas conforme item 3.1.2.3.

3.1.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 com os vetores pEarleyGate recombinados.

Células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 foram submetidas a transformações através do protocolo de eletroporação. Para cada transformação, utilizou-se 150 µL de células

eletrocompetentes e 100 ng de cada produto de recombinação descrita no item 3.1.3.

Células de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 eletrocompetentes foram descongeladas em gelo e o DNA de interesse foi adicionado a esta alíquota de bactérias em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Após, a reação de transformação foi incubada em gelo por cinco minutos, bem como a cubeta vazia. A reação foi transferida para cubeta, sendo então inserida no eletroporador, onde um pulso elétrico (2500V) foi aplicado. Adicionou-se 0.5 ml de meio LB líquido nas células transformadas e a reação foi incubada a 28 °C por 1 hora para recuperação das células bacterianas. Por fim, a suspensão bacteriana eletrotransformada foi plaqueada em meio LB sólido contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) e canamicina (50 mg/L). Estas placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 28 °C para a formação de colônias.

3.1.5 Floral Dipping

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia Col-0, foram transformadas geneticamente através do método de floral dipping (Zhang et al. 2006). Para cada vetor de destino utilizado nesse trabalho, realizaram-se os seguintes passos: a partir de uma colônia isolada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo de interesse foi produzido um pré-inóculo de 5 mL com meio LB líquido em tubo falcon estéril de 15 mL, contendo os antibióticos de seleção: rifampicina (100 mg/L) e canamicina (50 mg/L). O pré-inóculo foi incubado por 48 horas a 28°C e 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). Após esse período, houve a passagem do pré-inóculo para um Erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL de meio LB líquido e os antibióticos de seleção: rifampicina (100 mg/L) e canamicina (50 mg/L), durante 24 horas sobre as mesmas condições de incubação do pré-inóculo.

Transcorridas as 24 horas de incubação do inóculo, adicionou-se 0,5 mL de acetoseringona (100 mM) e a cultura de células foi novamente incubada nas mesmas condições por mais 3 horas. Após, a cultura foi centrifugada a 4560 x g durante 15 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em uma solução fresca de sacarose (5%). Por fim, adicionou-se 100 µL do surfactante de silicone Silwet L-77 (Momentive) e houve a imersão de inflorescências (“Floral dip”) de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 de 3-4 semanas nessa

suspensão de agrobactérias por 15 segundos.

As plantas foram cobertas com sacos plásticos e posicionadas na horizontal, permanecendo assim por 24 horas, de modo a manter um ambiente úmido adequado para a ocorrência da infecção por *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Depois desse período, a cobertura plástica foi removida, as plantas foram colocadas na posição vertical e cultivadas por aproximadamente 20 dias, período de tempo necessário para a maturação das sementes. Transcorrido esse período, não houve mais adição de água nas plantas, de modo a ocorrer a dessecação total das mesmas, facilitando assim, o procedimento de coleta das sementes. Foram submetidas ao procedimento de transformação genética seis plantas para cada uma das construções citadas.

3.1.6 Seleção de plantas transgênicas de *A. thaliana*

As sementes T1 das plantas utilizadas no processo de transformação genética pelo método de floral dipping foram submetidas à assepsia adicionando-se 1 mL de etanol 70% por 1 min, e em seguida hipoclorito 50% por 10 minutos, sob constante agitação. As sementes foram lavadas 5 vezes com água destilada estéril, sendo ressuspendidas em solução estéril de agarose 0,1%. As sementes transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio MS meia-força (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture - Sigma-Aldrich) com 1% (m/v) de sacarose e 0,5% de fitagel (m/v). O pH da solução nutritiva foi ajustado para 5,8 pela adição de KOH. As placas foram suplementadas com o antifúngico nistatina (50 µg/mL) e o antibiótico carbenicilina (250 µg/mL), ambos empregados para evitar contaminação pelo crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*. Para a seleção das sementes transgênicas foi utilizado o herbicida glufosinato de amônio (10 mg/L). As sementes foram estratificadas no escuro a 4 °C por 72h antes de serem transferidas para sala de cultivo sob condições de dia longo com 16h de luz/8h escuro, 24°C, 130 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e 34% de umidade relativa (UR). Após a visualização de plântulas transgênicas resistentes em placa, as mesmas foram passadas para meio MS meia-força sem antibióticos e antifúngicos. As plântulas desenvolvidas foram transferidas para uma mistura de 1:2 solo e vermiculita expandida, e crescidas na sala de cultivo conforme descrição anterior. Alternativamente, as sementes foram germinadas diretamente em

uma mistura de 1:2 solo e vermiculita expandidas e crescidas em sala de cultivo. As plantas estabelecidas em solo foram pulverizadas com solução de Basta (1 mL de basta na concentração de 120 mg/mL + 999 mL de H₂O + 500 µL de Silwet) para seleção das plantas transformantes.

3.1.7 Estudos de localização em planta

Plântulas transformadas com Pro35S::*AtPLAC8-11.1*::YFP foram crescidas em placa com meio MS meia-força, 1% de sacarose e 0.5% de fitigel. A localização de YFP foi realizada com o uso do microscópio de fluoescência Axio Imager. D2 (Zeiss). A YFP foi excitada em 490 nm e a emissão foi detectada na faixa de 530 nm.

3.1.8 Reações de PCR quantitativa RT-qPCR: análise da expressão de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2*

Para verificar os níveis de expressão do gene *AtPLAC8-11.1* e da forma variante de *splicing AtPLAC8-11.2* na parte aérea de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, foram realizadas reações de RT-qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e quadruplicatas experimentais.

3.1.8.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As partes aéreas de três plantas do tipo selvagem Col-0 foram coletadas para extração de RNA e síntese de cDNA. O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo TRIzol™ Reagent (Invitrogen). Aproximadamente 100 mg de tecido vegetal das amostras em análise foram maceradas em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL com nitrogênio líquido. Após, 1 mL do reagente TRIzol foi adicionado e as amostras foram homogeneizadas por agitação intensa e incubadas por 5 minutos para permitir a dissociação completa do complexo de nucleoproteínas. Em seguida, 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados a cada amostra e os tubos foram então submetidos a agitação por 15 segundos, sendo posteriormente incubados em temperatura ambiente por três minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 × g a 4°C e a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, no qual adicionou-se 0,5

mL de isopropanol. As amostras foram agitadas cuidadosamente, incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma micropipeta e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de etanol 75% (-20°C). As amostras foram brevemente agitadas, centrifugadas por 5 minutos a $7500 \times g$ a 4°C , e o sobrenadante foi descartado. O excesso de EtOH foi removido delicadamente com auxílio de uma micropipeta e o precipitado foi ressuspensionado em 50 μL de água isenta de RNase. O RNA foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1.2% com gel red, sendo estocado a -80°C até a síntese do DNA complementar (cDNA). O kit comercial RQ1 RNase-Free DNase (Promega) foi utilizado para remoção de possível contaminação com DNA genômico, através do seguinte protocolo: 1 μg de RNA total em 8 μL de H_2O foi adicionado juntamente com 1 μL de RQ1 10X Reaction Buffer e 1 μL de RQ1 RNase-Free DNase. As amostras foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 μL de RQ1 DNase Stop Solution, realizando nova incubação a 65°C em termociclador durante 10 minutos para inativar a enzima. A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados a cada amostra (no gelo) 1 μL de primer oligo(dT) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 μL do RNA total purificado (1 μg) na etapa acima descrita e 1 μL de dNTP Mix, 10 mM. As amostras foram incubadas por cinco minutos a 65°C em termociclador e em seguida incubadas no gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados 4 μL 5X First-Strand Buffer e 2 μL 0,1 M DTT em cada amostra com posterior incubação a 37°C por 2 minutos. Após, adicionou-se 1 μL de M-MLV Reverse Transcriptase e as amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 50 minutos e a reação foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 minutos.

3.1.8.2 RT-qPCR

O cDNA sintetizado conforme descrito acima, foi utilizado como template nas reações de RT-qPCR. As reações de RT-qPCR foram realizadas em aparelho Applied Biosystems StepOne and Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94°C , seguida por 45 ciclos de 10s a 94°C , 15 s a 60°C , e 15 s a 72°C . Em seguida, as amostras foram mantidas por 2 minutos a 40°C para

reanelamento, sendo aquecidas de 55 a 99 °C para obtenção da curva de desnaturação do produto de amplificação.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, sendo os mesmos compostos de: 12,5 µL da amostra de cDNA diluído 50X em H₂O, 2,0 µL tampão PCR 10X, 1,2 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,4 µL de dNTPs a 5 mM, 0,4 µL de cada primer a 10 µM, 4,95 µL de H₂O, 1,0 µL de SYBR-GREEN (1:100,000 Molecular Probes), e 0,05 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µL; Invitrogen). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os *primers* utilizados nas reações estão listados na Tabela 4 abaixo. Utilizou-se como gene referência para normalização o gene PP2A (At1g13320). A análise dos dados foi realizada através dos softwares StepOnev2.3 e Microsoft Office Excel, utilizando-se a metodologia $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrita por Livak and Schmittgen (2001).

Tabela 4. Primers utilizados nas reações de RT-qPCR

Nome	Sequência
<i>AtPLAC8-11.1</i>	F: ACTGGGTGATGGGATCAAAG R: AGGAGCAAAACTTGGTGCTT
<i>AtPLAC8-11.2</i>	F: ACTGGGTGATGGGATCAAAG R: TCACCACACTTGAACACTTATATCAA
<i>PP2A</i>	F: TAACGTGGCCAAAATGATGC R: ACCAAGCGGTTGTGGAGAAC

F: Forward; R: Reverse.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES

3.2.1 Material vegetal: Obtenção de sementes com inserção de T-DNA

No presente trabalho, de acordo com a inserção de T-DNA existente, foram selecionados e adquiridos os mutantes CS852038 e CS378853 para o gene *AtPLAC8-11.1*, com inserção de

T-DNA no promotor e no primeiro éxon do gene, respectivamente, a partir do banco de sementes *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC).

3.2.2 Assepsia e cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *Arabidopsis thaliana* selvagem Columbia-0 e linhagens mutantes CS852038 e CS378853 foram esterilizadas com EtOH 70%, com adição de Triton-100x a 0,1%, durante 15 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas com água destilada estéril por quatro vezes, resuspensas em agarose 0,1% e então inoculadas em placas Petri contendo meio MS meia-força (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture - Sigma-Aldrich) com 1% (m/v) de sacarose e 0,5% (m/v) de fitagel. O pH da solução nutritiva foi ajustado para 5,8 pela adição de KOH. Para a análise de segregação de mutantes o meio foi suplementado com o herbicida Basta (Glufosinato amônio, Sigma-Aldrich), na concentração de 10mg/L, para CS852038, e o antibiótico Sulfadazina (Synth), na concentração de 7.5 mg/L, para CS378853. As sementes foram estratificadas no escuro a 4 °C por 72h antes de serem transferidas para sala de cultivo sob condições de dia longo com 16h de luz/8h escuro, 24°C, 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e 34% de umidade relativa (UR). Após uma semana em sala de cultivo, as plântulas foram passadas para uma mistura de 1:2 solo e vermiculita expandida e crescidas nas condições supracitadas durante quatro semanas.

3.2.3 Genotipagem de plantas mutantes

A genotipagem dos mutantes, para obtenção das linhagens homozigotas, ocorreu através de reações de PCR. Inicialmente realizou-se extração de DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico das folhas das linhagens mutantes (CS852038 e CS378853) e de plantas selvagem Col-0.

3.2.3.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído conforme protocolo adaptado de Clarke (2009), utilizando o reagente CTAB (Merk) - Brometo de Cetiltrimetilamônio. Inicialmente, preparou-se um tampão de extração composto por 3 mL de CTAB 10% em água, 2,8 mL de cloreto de sódio

(NaCl) 5 M, 400 μ L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 8,0 5 M, 1 mL Tris-HCl pH 8,0 1 M, 0,3g de polivinilpirrolidona 40 kDa (PVP40), 20 μ L de β -mercaptoetanol e 2,48 mL de água para completar o volume final de 10 mL. Aproximadamente 100 mg de tecido vegetal foi coletado e macerado em nitrogênio líquido em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. O tampão de extração foi pré-aquecido a 65°C e então adicionou-se 200 μ L do mesmo em cada amostra. Os tubos contendo o tecido macerado imerso no tampão de extração foram incubados em banho-maria a 65°C por 50 minutos sendo agitados em vórtex a cada dez minutos. Após transcorrido o período de 50 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13.000 \times g por 5 minutos à temperatura ambiente e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 200 μ L de clorofórmio à solução aquosa, agitando vigorosamente. Após, as amostras foram centrifugadas a 13.000 \times g por cinco minutos, a temperatura ambiente, e novamente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e o processo descrito neste parágrafo foi repetido por mais uma vez, adicionando-se ao final 150 μ L de isopropanol gelado (-20°C). Os tubos foram misturados por imersão e incubados a -20°C por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 \times g por 10 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se lavagem do material precipitado (DNA) com 500 μ L de EtOH 70% gelado (-20°C) e centrifugação a 13.000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi descartada e o precipitado foi seco e ressuspenso em 30 μ L de H₂O. O DNA genômico foi quantificado em NanoDrop Lite (Thermo Scientific™).

3.2.3.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR utilizaram como template o DNA genômico extraído conforme item 3.2.3.1 acima. Os *primers* específicos para a genotipagem dos mutantes foram desenhados através do site: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> (Tabela 5).

Tabela 5. Primers para RT-PCR utilizados para genotipagem

Inserção de T-DNA	Sequência	Produto (pb)
-------------------	-----------	--------------

Região Promotora CS852038	F: CCCATCTGTTTTGACATAATTTCTTC R: GGTTCGCTGGTTCGGTGTA	1134
Região Promotora CS852038	F: CCCATCTGTTTTGACATAATTTCTTC LB: AACGTCCGCAATGTGTTAAGTTG	472-772
Éxon 1 CS378853	F: CGACCGTTGAAAAGTCAAAC R: TATGATCGGAGTTCATGCATG	1074
Éxon 1 CS378853	F: CGACCGTTGAAAAGTCAAAC LB: GTGGATTGATGTGATATCTCC	503-803

F: Forward; R: Reverse; LB: Left Border of T-DNA.

Foram utilizados três *primers* para cada mutante: dois *primers* (*forward e reverse*) que amplificam a sequência do gene que flanqueia a inserção de T-DNA, e o terceiro *primer* LB (*left border of T-DNA*) que hibridiza na inserção de T-DNA. Para as reações de genotipagem foram utilizados dois conjuntos de *primers* para cada mutante: uma reação com os *primers forward e reverse*, para possível amplificação da banda selvagem e outra reação com os *primers forward e left border*, para amplificar a banda característica de inserção de T-DNA. As reações de PCR foram realizadas conforme procedimento descrito no item 3.1.2.1, utilizando 1µL de DNA genômico como template. As condições utilizadas no termociclador seguem conforme Tabela 3, com modificações na temperatura de anelamento para 50°C e com um maior tempo de anelamento: 1 minuto e 30 segundos. A visualização dos produtos obtidos na PCR ocorreu conforme 3.1.1.

3.2.4 Análise de segregação

Para a análise de segregação das linhagens mutantes foi utilizado sementes T2 crescidas em laboratório. Foi avaliada a germinação e estabelecimento de plântulas das linhagens mutantes CS852038 e CS378853 em meio com seleção por BASTA e sulfadiazina, respectivamente. As concentrações de herbicida e antibiótico utilizadas na seleção dos mutantes estão descritas no item 3.2.2. A contagem do número de plântulas em seleção foi comparada

com o número de plantas em meio sem seleção para contabilização do número de sementes inviáveis. Com estes dados foi possível verificar o nível de sobrevivência para cada linhagem mutante e estabelecida heteroziguidade e/ou homoziguidade. O mesmo foi realizado com plantas Col-0 para verificar a eficiência do método de seleção. As sementes Col-0, CS852038 e CS378853 foram esterelizadas, estratificadas e crescida em placa conforme item 3.2.2 por 15 dias.

3.2.5 Reações de PCR quantitativa RT-qPCR com as linhagens mutantes

Para verificar o nível de expressão gênica das linhagens mutantes, o experimento de RT-qPCR foi realizado utilizando as partes áreas de três plantas T3 de cada linhagem em estudo: *Wild type*, mutante com inserção de T-DNA no promotor do gene *AtPLAC8-11.1* e mutante com inserção de T-DNA no primeiro éxon do gene *AtPLAC8-11.1*. A extração de RNA total, síntese de cDNA e a reação de RT-qPCR seguiram de acordo com os itens 3.1.8.1 e 3.1.8.2 descritos anteriormente, ocorrendo apenas a mudança no normalizador utilizado, que passou a ser o gene endógeno Ubiquitina-10 (AT4G05320). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e triplicatas experimentais e os *primers* utilizados nas reações constam na Tabela 6.

Tabela 6. Primers para RT-PCR

Nome	Sequência
<i>AtPLAC8-11.1</i>	F: ACTGGGTGATGGGATCAAAG R: AGGAGCAAACTTGGTGCTT
Ubiquitina 10	F: GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG R: ACTATGTTTCCGTTCCCTGTTATCTCTTT

F: Forward; R: Reverse

3.2.6 Análises Morfológicas

3.2.6.1 Avaliação do crescimento das raízes

Para avaliar o crescimento das raízes, sementes do tipo selvagem (Col-0) e mutantes homozigotos CS378853 foram esterelizadas, estratificadas e crescidas em placa conforme item

3.2.2. As placas quadradas com dimensões de 115x115 mm foram mantidas na vertical para acompanhamento do crescimento das raízes. As medidas de comprimento de raiz foram realizadas a partir do quarto dia de cultivo. As raízes foram fotografadas e o tamanho das mesmas foi determinado com auxílio do software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

3.2.6.2 Teste de Germinação

O experimento de germinação foi realizado com sementes do tipo selvagem (Col-0) e mutantes homozigotos CS378853 que foram esterelizadas, estratificadas e germinadas em placa conforme item 3.2.2. Foram utilizadas três placas de Petri contendo 45 sementes em cada, tanto para a linhagem mutante quanto para a selvagem. A verificação da germinação ocorreu com auxílio de um microscópio de luz. A germinação foi contabilizada pela emissão da radícula (raiz embrionária) durante o período de 72 horas.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES *in silico*

4.1.2 Estrutura do gene *AtPLAC8-11.1* e da forma variante de *splicing AtPLAC8-11.2*

Com auxílio do software SnapGene Viewer realizou-se a montagem da estrutura gênica de *AtPLAC8-11.1* e da forma variante de *splicing AtPLAC8-11.2* (Figura 7). A região codificante da forma canônica de *splicing AtPLAC8-11.1* possui os quatro éxons do gene, totalizando 573pb (Fig 7b). Porém, na forma alternativa de *splicing AtPLAC8-11.2*, ocorre a retenção do último íntron durante o processamento do RNA mensageiro (Fig 7c). Contudo, o último íntron apresenta um stop códon (TGA), assim sendo, a região codificadora do *splicing* alternativo possui 564 pb devido a retenção de 80pb do ultimo íntron e a exclusão do quarto éxon (Fig 7d).

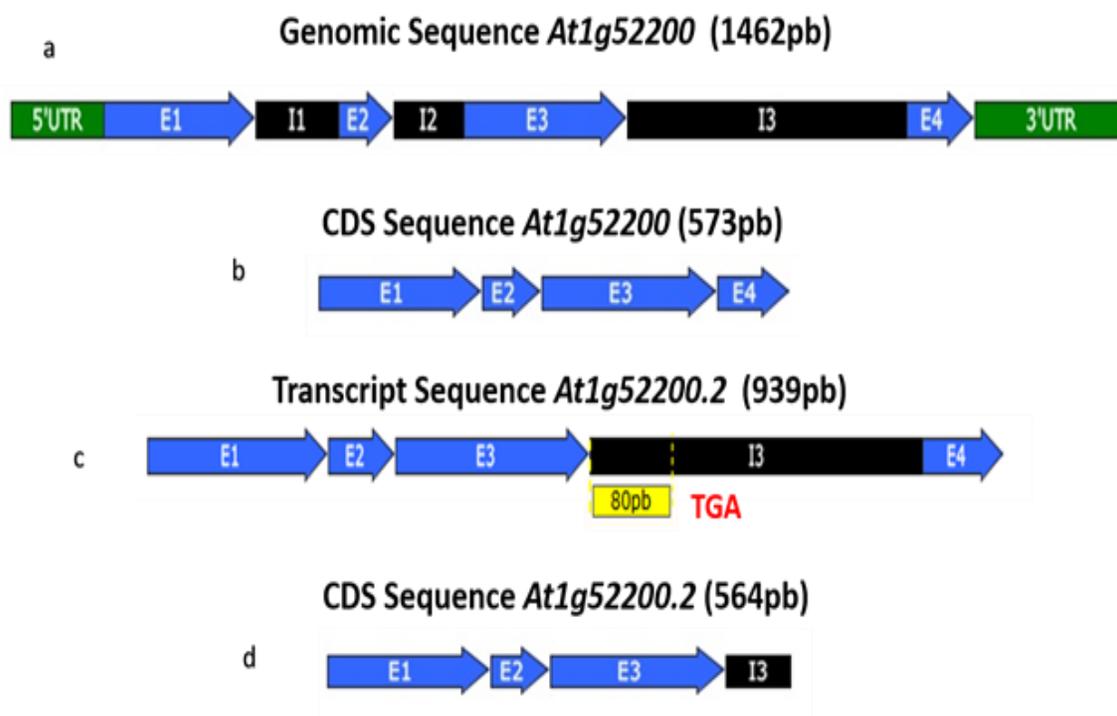


Figura 7. Estrutura do gene *At1g52200* e do *splicing* alternativo *At1g52200.2*. a) Sequência genômica do gene *At1g52200* com quatro éxon e três íntrons. b) Sequência codificante do gene *At1g52200* composta pelos quatro éxons. c) Sequência transcrita do *splicing* alternativo denominado *At1g52200.2*, mostrando a retenção do último íntron. d) Sequência codificante do *splicing* alternativo com retenção dos 80 pb do último íntron. Setas em azul representam éxons e setas em preto indicam os íntrons.

A exclusão do quarto éxon na forma variante de splicing não acarreta na perda do domínio que define a família gênica PLAC8, visto que o mesmo está localizado entre os aminoácidos 53 à 151, abrangendo, portanto, os três primeiros éxons no gene *AtPLAC8-11.2*, conforme representado em vermelho na Figura 8. O domínio transmembrana compreendendo entre os aminoácidos 94 à 113, representado em laranja na mesma figura, também é mantido em ambas as formas: canônica e variante de splicing, visto que as diferenças nas sequências peptídicas das mesmas inicia a partir do aminoácido 161.

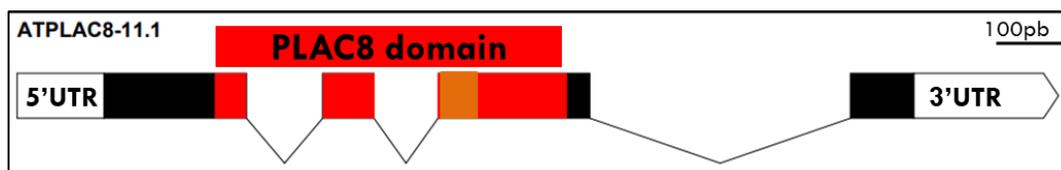


Figura 8. Domínios do gene *AtPLAC8-11.1*: PLAC8 e transmembrana. As barras pretas representam os quatros éxons existentes no gene e as linhas pretas os três íntrons. As barras vermelhas encontradas no primeiro, segundo e terceiro éxon indicam o domínio PLAC8 e a barra laranja contida no terceiro éxon o domínio transmembrana.

As sequências peptídicas do gene *AtPLAC8-11.1* e da forma variante de *splicing* *AtPLAC8-11.2* foram utilizadas para realizar buscas por similaridade protéica através da ferramenta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). A Figura 9 retrata o resultado encontrado apenas para a forma variante de splicing, *AtPLAC8-11.2*, havendo identidade com o domínio chaperona de *Escherichia Coli* de 18.92%.

Sort	Name	Title	Coverage	GMQE	QSQE	Identity	Method
✓	4xvv.1.A	Acid stress chaperone HdeB	<input type="text"/>	0.05	0.16	18.92	X-ray, 1.7Å
Target	4xvv.1.A	MGRVITPSEEDSNNGLPVQQPGTFNQRTTRVPVSQFAPPNY	40				
Target	4xvv.1.A	QQANVNLSVGRPWSTGLFDCQADQANAVLTTIVPCVTFGQ	80				
Target	4xvv.1.A	IAEVMDEGEMTCPLGTFMYLLMMPALCSHWVMGSKYREKM	120				
Target	4xvv.1.A	RRKFNLVEAPYSDCASHVLCPCCSLCQEYRELKIRNLDPS	160				
		CQEFMDMNEKSMTPV	26				
Target	4xvv.1.A	LGTNSKRQIQIYIYGPGILFDISVQVW	187				
		AFWVVDNRNT	47				

Figura 9. Similaridade protéica encontrada entre o variante de splicing (*target*) e o domínio chaperona de *Escherichia Coli* (4xvv.1.A) através do Swiss-Model. Uma identidade de 18.92% foi encontrada entre as sequências peptídicas, sendo representadas pelo sublinhado preto a partir do resíduo 146.

4.1.3 Padrão de expressão frente a estresses abióticos

Análises *in silico* através do browser ePlant (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>), presente na plataforma BAR (*The Bio-Analytic Resource for Plant Biology*) (<http://bar.utoronto.ca/>), indicam que o gene em estudo apresenta expressão modulada frente a condições de estresses abióticos (Figura 10). É possível verificar elevada resposta após estresses abióticos como UV-B, após três horas, e a estresse oxidativo após 24 horas. Verifica-se também, modulações em menor grau quando exposto a estresses genotóxicos e ao frio após 24 horas. Estresse como o sal regula negativamente a expressão do gene.

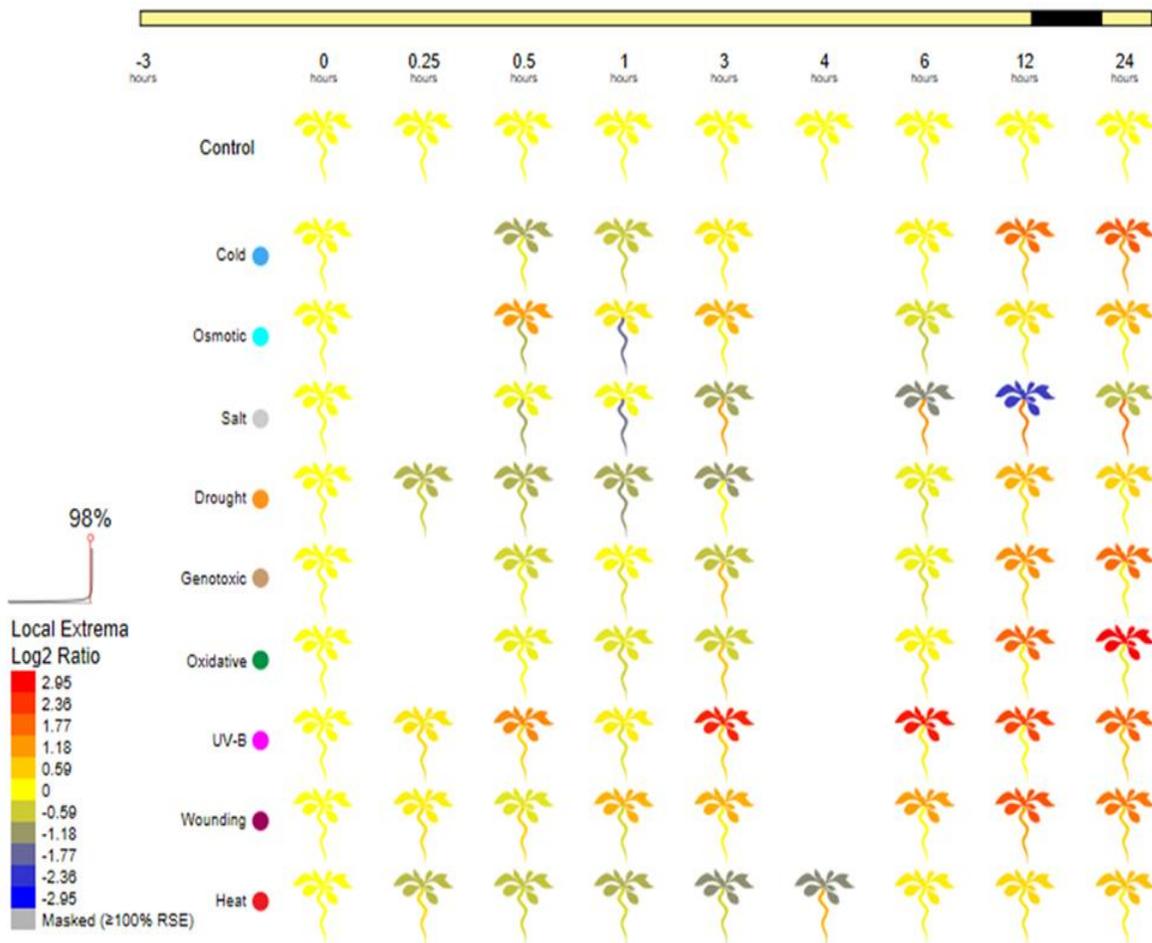


Figura 10. Predições *in silico* dos diferentes padrões de expressão do gene *AT1G52200* frente a condições de estresses abióticos. ePlant (2018).

4.2 CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO

4.2.1 Amplificação do gene *AtPLAC8-11.1* e do produto do *splicing* alternativo *AtPLAC8-11.2* a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana*.

A primeira etapa do presente trabalho consistiu na amplificação do gene *AtPLAC8-11.1* e seu variante de *splicing* *AtPLAC8-11.2* por RT-PCR. Através da reação de amplificação, foi possível obter fragmentos únicos de DNA para ambos os genes (Figura 11a e 11b), assegurando a especificidade da reação. Nas reações de amplificação, foram utilizados *primers* (Tabela 1) que mantinham o codon de parada (com stop - CS), assim como *primers* que eliminavam esse codon (sem stop - SS), para que houvesse seguimento da síntese protéica e fusão à proteína YFP (*yellow fluorescent protein*) na recombinação com os vetores de destino.

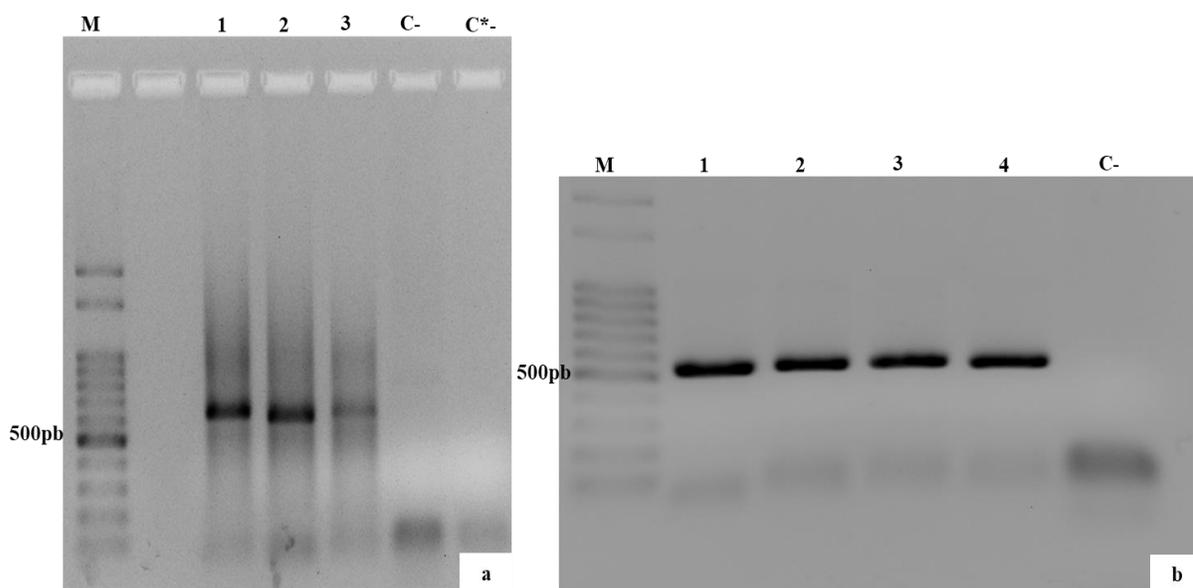


Figura 11. Amplificação da sequência codificadora do gene *AtPLAC8-11.1* e seu variante de *splicing* *AtPLAC8-11.2*. Visualização em gel de agarose 1.2% corado com gel red (a) Sequência codificadora de *AtPLAC8-11.1*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig®); Linha 1 e 2: fragmento de *AtPLAC8-11.1*-CS; Linha 3: fragmento de *AtPLAC8-11.1*-SS; C-: Controle negativo da reação de PCR com o *primer* SS; C-*: Controle negativo da reação de PCR com o *primer* CS (b) Sequência codificante do *splicing* alternativo *AtPLAC8-11.2*. (b) M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig®), Linha 1 a 4: fragmento de *AtPLAC8-11.2*-CS; C- Controle negativo da reação de RT-PCR com o *primer* CS. CS = conjunto de *primers* com stop codon. SS = conjunto de *primers* sem stop codon.

4.2.2 Clonagem de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO

Para seleção de colônias positivas, contendo os plasmídeos pENTR/D-TOPO::*PLAC8-11* e pENTR/D-TOPO::*PLAC8-11.2*, separadamente, foi realizado PCR de colônia cujos produtos podem ser visualizados na Figura 10a e 10b. Amplificações conforme o controle positivo foram observadas na Figura 12a, linhas 1, 2, 3, 5 e 10. Contudo, na linha 2 da figura 12b, verifica-se uma banda acima das demais, podendo ser um indicativo de falso positivo. Nesse sentido utilizou-se o DNA plasmidial de tal colônia para realização de restrição e confirmação de que a colônia poderia ser um falso positivo.

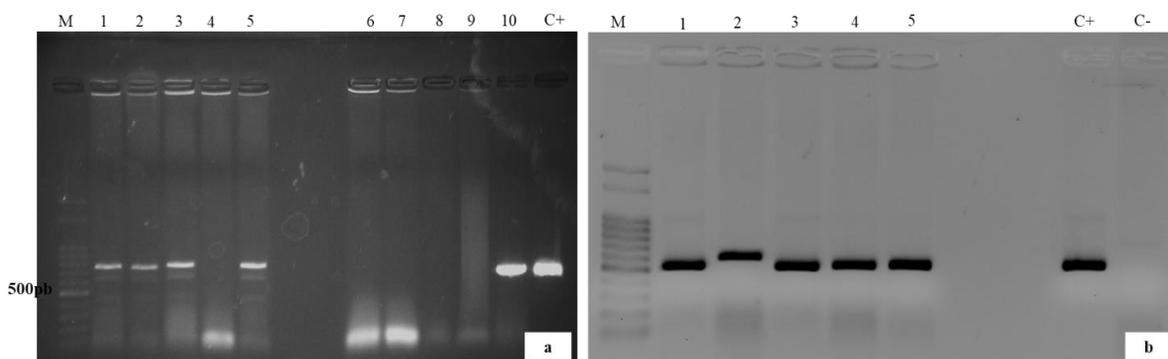


Figura 12. PCR de colônias de *Escherichia coli* OmniMAX transformadas com o plasmídeo pENTR/D-TOPO®. (a) PCR de colônia para *AtPLAC8-11.1*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig®); Linha 1 a 5: *AtPLAC8-11.1*-CS; Linha 6 a 10: *AtPLAC8-11.1*-SS; C+: Controle positivo da reação de PCR (produto purificado da PCR *AtPLAC8-11.1*). (b) PCR de colônia para *AtPLAC8-11.2*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig®); 1 a 5: *AtPLAC8-11.2* CS; C+: Controle positivo da reação de PCR (produto purificado da PCR *AtPLAC8-11.2*); C-: Controle negativo da reação de PCR. CS = conjunto de *primers* com stop codon. SS = conjunto de *primers* sem stop codon.

Os plasmídeos foram isolados a partir das colônias 1, 3, 5 (*AtPLAC8-11.1*- CS) e 10 (*AtPLAC8-11.1*-SS) (Figura 12a) e das colônias 1, 2, 3 e 4 (*AtPLAC8-11.2*-CS) (Figura 12b). Para confirmação das clonagens, foram analisados os perfis de fragmentos dos diferentes plasmídeos submetidos a restrição enzimática, com as endonucleases NcoI e EcoRV (New England Biolabs®), conforme Figura 13. Eram esperados os fragmentos de 155, 548 e 2249 pares de bases para *AtPLAC8-11.1* (Figura 13a) e 155, 539 e 2579 pares de bases para *AtPLAC8-11.2* (Figura 13b). As colônias 1, 3, 5 e 10 da Figura 12a, que foram utilizadas para a restrição, são representadas respectivamente pelas linhas 1, 2, 3 e 4 na Figura 13a. Para as reações de restrição

na Figura 13b, utilizou-se as colônias 1, 2, 3 e 4 da Figura 12b, sendo representadas respectivamente pelas linhas 1, 2, 3 e 4 na Figura 13b. Observa-se perfis de fragmentos corretos para as linhas 3 (colônia 5 - *AtPLAC8-11.1-CS*) e 4 (colônia 10 - *AtPLAC8-11.1-SS*) na Figura 13a e para as linhas 1 (colônia 1 - *AtPLAC8-11.2-CS*) e 3 (colônia 3 - *AtPLAC8-11.2-CS*) na Figura 13b.

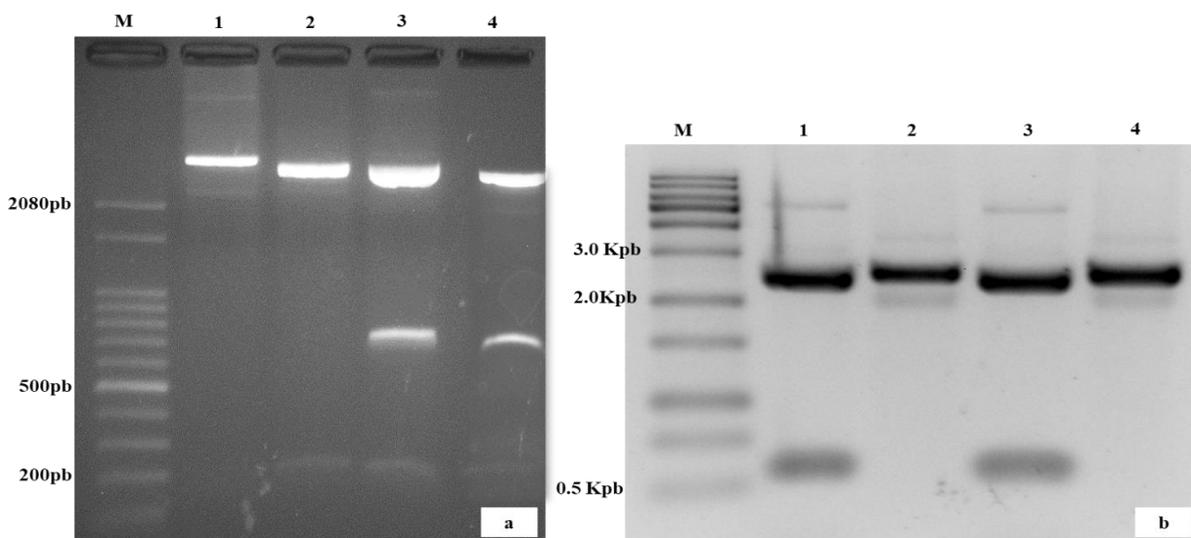


Figura 13. Padrão de clivagens dos clones com endonucleases de restrição. O DNA plasmidial foi clivado com as enzimas de restrição *NcoI* (New England Biolabs®) e *EcoRV* (New England Biolabs®). O produto resultante da clivagem foi visualizado em gel de agarose 1,2% corado com gel red. (a) Restrições para *AtPLAC8-11.1*: M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Ludwig®); Linhas 1,2,3,4: Padrão de restrição do DNA plasmidial recombinante. (b) Restrições para *AtPLAC8-11.2*: M: Marcador de Peso Molecular de 1kb (Ludwig®); Linhas 1,2,3,4: Padrão de restrição dos plasmídeos recombinantes. Fragmentos esperados: *AtPLAC8-11.1* = 155, 548e 2249 pb; *AtPLAC8-11.2* = 155, 539 e 2579pb.

Amostras de plasmídeo pENTR/D-TOPO::*PLAC8-11* colônia 5, *AtPLAC8-11.1-CS*, e colônia 10, *AtPLAC8-11.1-SS*, foram sequenciadas. Os resultados obtidos indicaram que a sequência de *AtPLAC8.11.1* não sofreu alterações de nucleotídeos e que o inserto foi integrado na orientação correta, para ambas sequências de *AtPLAC8-11.1* (com e sem stop codon) conforme Figuras 12 e 13. Através do sequenciamento da preparação número 10 de pENTR/D-TOPO::*ATPLAC8-11.1-SS*, representada pela sequência de orientação 3'-5', é possível observar que houve a inserção da região codificante do gene *AtPLAC8-11.1-SS* no vetor de entrada, com completo pareamento com a sequência CDS de 573 pb. Conforme esperado, existe a perda dos três pares de bases referentes ao stop codon TAA que não foi amplificado devido o conjunto de

primers utilizados, indicado pela seta vermelha na Figura 14.

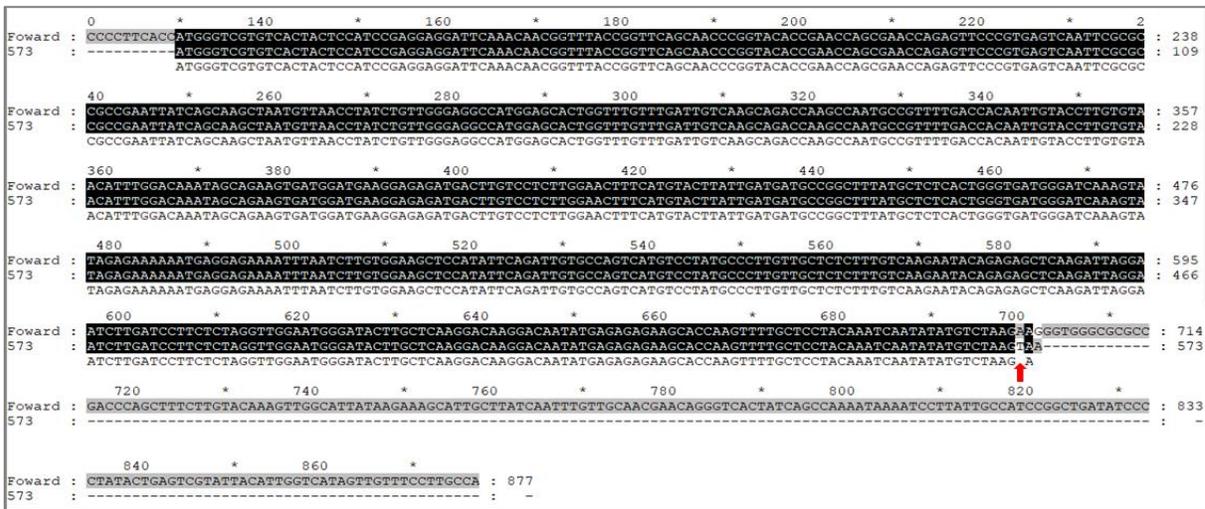


Figura 14. Sequenciamento da região codificante do gene *AtPLAC8-11.1-SS* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO. SS = conjunto de primers sem stop codon. A seta vermelha indica o não pareamento com o codon de terminação da região codificante do gene.

A Figura 15 mostra o alinhamento do produto de clonagem no vetor de pENTR/D-TOPO::*ATPLAC8-11.1-CS*, colônia 5 - *AtPLAC8-11.1-CS*, com a sequência CDS de 573 pb. Pode ser verificado, a partir do sequenciamento desse clone que houve completo alinhamento com a sequência codificante do gene *AtPLAC8-11.1*.

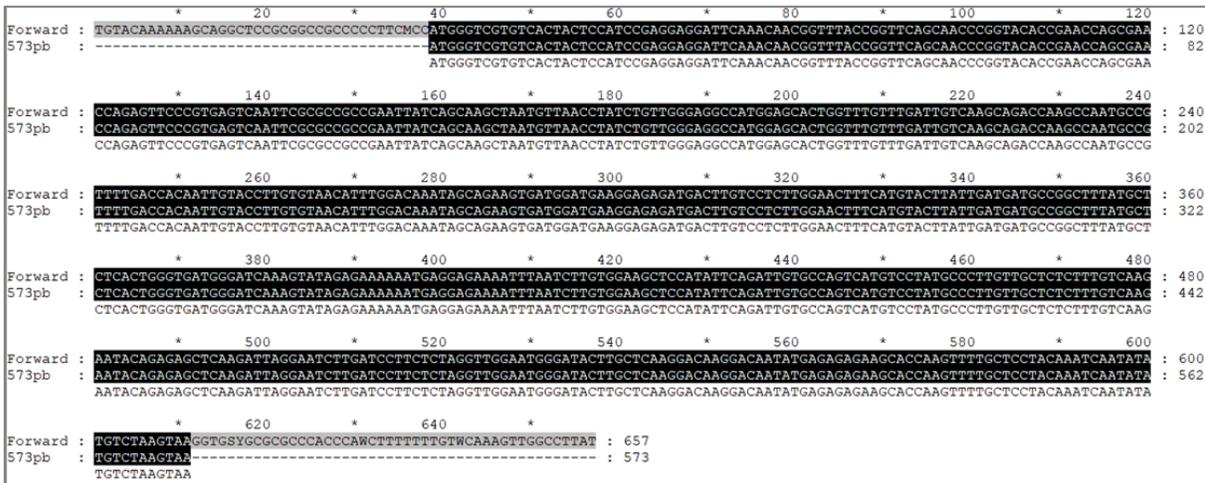


Figura 15. Sequenciamento do produto de clonagem da região codificante do gene *AtPLAC8-11.1-CS* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO. CS = conjunto de primers com stop codon.

A Figura 16 mostra o resultado do sequenciamento obtido com o produto purificado da reação de PCR para amplificação da região codificante do *splicing* alternativo, denominado por *Forward*. Destacado em amarelo, estão os 80 pares de base do último íntron que ficam retidos durante o processamento do mRNA.



Figura 16. Resultado do sequenciamento da região codificante do gene *AtPLAC8-11.2* – CS amplificado a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana*. CS = conjunto de *primers* com stop codon.

4.2.3. Recombinação com os vetores de destino

As reações de recombinações entre os vetores de entrada e os vetores de destino pEarleyGate 100 (superexpressão), 101 (superexpressão com fusão a YFP) e 302 (superexpressão + flag de histidina), foram realizadas somente com o gene *AtPLAC8-11.1*. As colônias recombinantes crescidas em placa com meio seletivo foram submetidas a PCR de colônia para confirmação da inserção do gene de interesse (Figura 17).

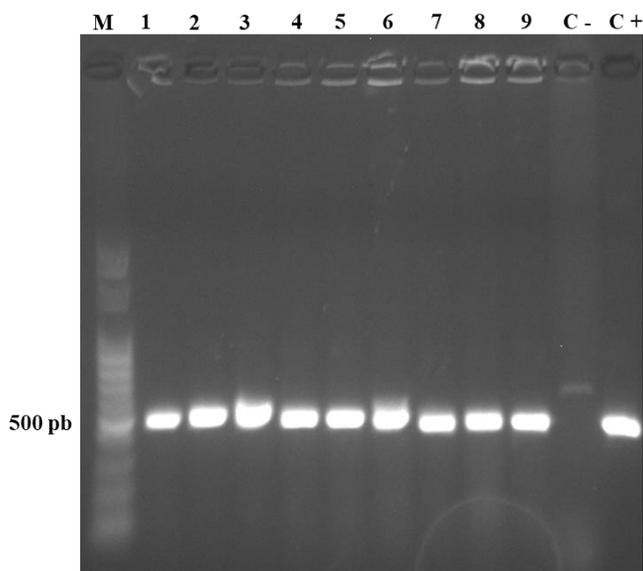


Figura 17. PCR de colônias de *Escherichia coli* OmniMAX contendo os plasmídeos pEarleyGate100::*AtPLAC8-11.1-CS*, pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1-SS* e pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1-SS* para confirmação da presença do gene *AtPLAC8-11.1* (573pb). O produto resultante da reação de PCR foi visualizado em gel de agarose 1,2% corado com gel red. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig®). Linhas 1 a 3: pEarleyGate100 – *AtPLAC8-11.1-CS*; Linhas 4 a 6: pEarleyGate101 – *AtPLAC8-11.1-SS*; Linhas 7 a 9: pEarleyGate302 – *AtPLAC8-11.1-SS*. C-: Controle negativo da reação de PCR; C+: Controle positivo da reação de PCR - pENTR/D-TOPO@-*AtPLAC8-11.1-CS* = conjunto de primers com stop codon. SS = conjunto de primers sem stop codon.

As colônias positivas para o PCR de colônia tiveram os plasmídeos isolados. A confirmação da clonagem foi realizada por restrição enzimática com as endonucleases NcoI e EcoRV (New England Biolabs®). Os fragmentos esperados são: pEarleyGate100::*AtPLAC8-11.1-CS* = 6624/3823/155pb; pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1-SS* = 7426/3823/155pb; pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1-SS* = 6647/2524/155pb e C+: pENTRD-TOPO::*AtPLAC8-11.1* = 2449/548. Na figura 18, os plasmídeos testados número 1 (pEarleyGate100::*AtPLAC8-11.1-CS*), 2 (pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1-SS*) e 6 (pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1-SS*) continham os fragmentos corretos.

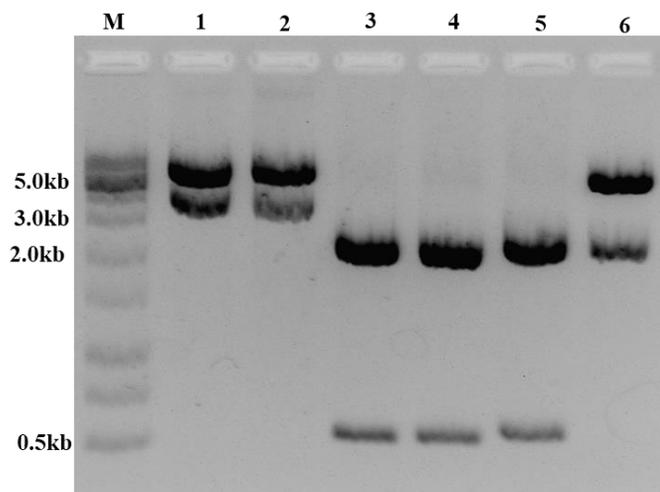


Figura 18. Clivagens com endonucleases NcoI e EcoRV (New England Biolabs®). Os produtos das digestões foram visualizados em gel de agarose 1,2% corado com gel red. Produto das clivagens para *AtPLAC8-11.1*. M: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®); Linha 1: pEarleyGate100::*AtPLAC8-11.1*-CS; Linha 2: pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1*-SS; Linha 3: pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1*-SS; Linha 4: pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1*-SS; Linha 5: pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1*-SS; Linha 6: pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1*-SS. Fragmentos esperados: pEarleyGate100::*AtPLAC8-11.1*-CS = 6624/3823/155 pb; pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1*-SS = 7426/3823/155 pb; pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1*-SS = 6647/2524/155 pb. CS = conjunto de *primers* com stop codon. SS = conjunto de *primers* sem stop codon.

4.2.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* EH105

Células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 foram submetidas a transformações com os vetores binários recombinantes para posterior transformação genética de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para confirmação da presença do inserto *AtPLAC8-11.1* através de PCR de colônia foram selecionadas colônias de *Agrobacterium* transformadas com os vetores de destino pEarleyGate 100, 101 e 302. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 19.

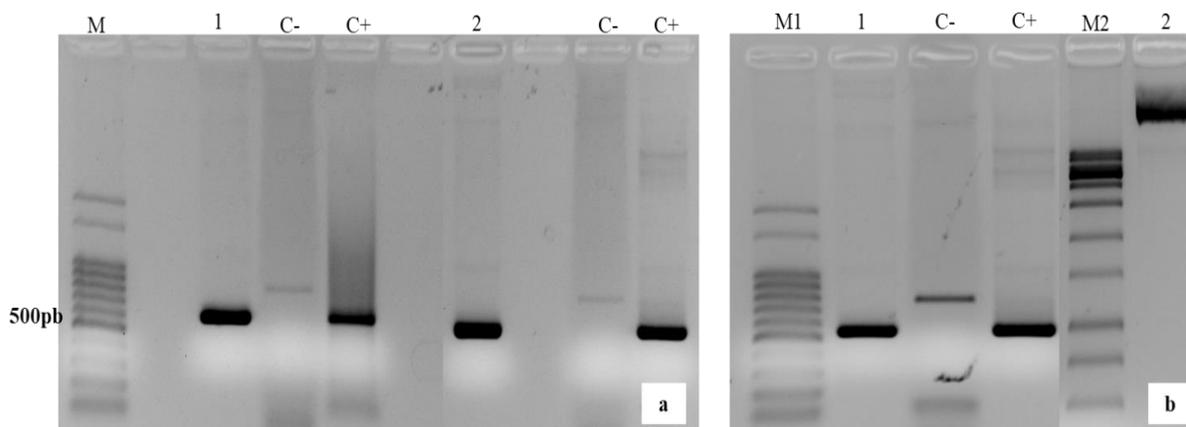


Figura 19. PCR de colônia para confirmação da transformação das *A. tumefaciens* EH105 (a) Produtos da amplificação por PCR do DNA plasmidial de *A. tumefaciens* transformadas com os vetores de destino pEarleyGate 100 e 101. M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Ludwig®); Linha 1 pEarleyGate100::*AtPLAC8-11.1*-CS; C-: Controle negativo da reação de PCR = H₂O + conjunto de primers CS; C+ : controle positivo da reação de PCR = *AtPLAC8-11.1*-CS; Linha 2: pEarleyGate101::*AtPLAC8-11.1*-SS; C-: Controle negativo da reação de PCR = H₂O + conjunto de primers SS; C+ : controle positivo da reação de PCR = *AtPLAC8-11.1*-SS. (b) Produtos da amplificação por PCR do DNA plasmidial de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor de destino pEarleyGate302. M1: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Ludwig®); Linha 1: pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1*-SS; C-: Controle negativo da reação de PCR = H₂O + conjunto de primers SS; C+: controle positivo da reação de PCR = *AtPLAC8-11.1*-SS. M2: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Ludwig®); Linha 2: Vetor pEarleyGate101 vazio (12453 bp). CS = conjunto de primers com stop codon. SS = conjunto de primers sem stop codon.

4.2.5 Seleção das sementes transformantes

Plantas de *Arabidopsis thaliana* foram transformadas com os vetores de destino pEarleyGate 100, 101 e 302 via método de floral dipping, conforme item 3.1.5. Passado o período essencial para o desenvolvimento e a maturação de sementes, após a transformação genética, as mesmas foram coletadas e submetidas à seleção *in vitro* utilizando o herbicida Basta [10mg/L]: marca de resistência existente nos vetores pEarleyGate100,101 e 302. Plantas transformadas, resistentes ao herbicida Basta, cresceram em meio seletivo, com abertura e expansão dos cotilédones, bem como a emissão do primeiro par de folhas verdadeiras, ao contrário das plantas não transformadas. Exemplos destes tipos de observações fenotípicas estão representado na Figura 20.

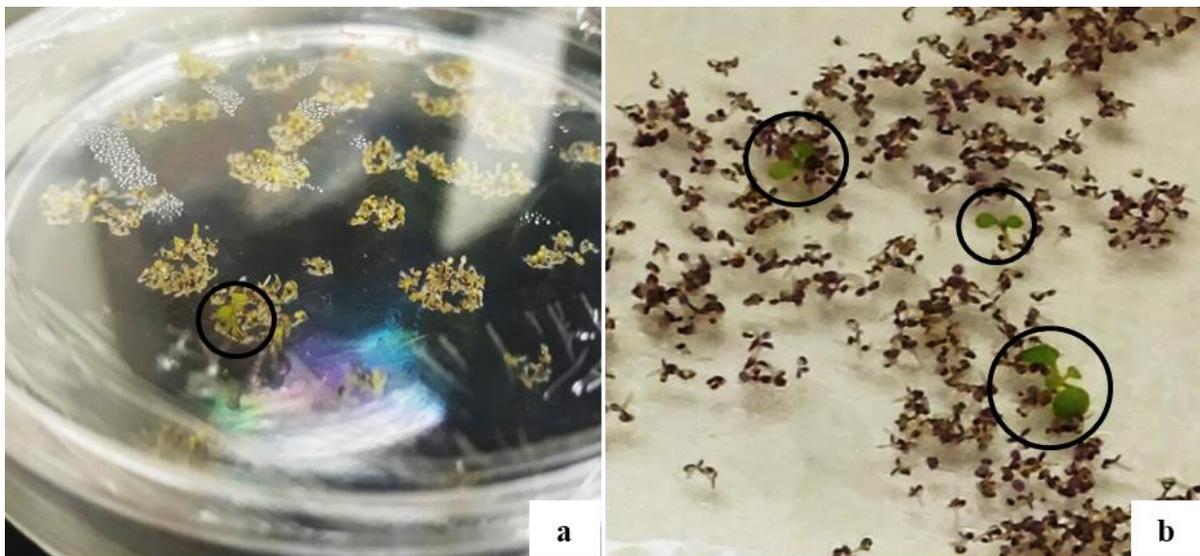


Figura 20. Seleção *in vitro* de sementes transgênicas coletadas de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas pelo método de *floral dipping*. Os círculos mostram as plântulas transformadas resistentes ao herbicida Basta [10 mg/L] utilizado na seleção. (a) Seleção de sementes transgênicas T0 superexpressando *PLAC8-11::HIS* (pEarleyGate 302). (b) Seleção de sementes transgênicas T0 superexpressando *PLAC8-11::YFP* (pEarleyGate 101).

Ao realizar o processo de seleção dos transformantes verificamos que as plântulas com características fenotípicas de transformadas não apresentavam raízes desenvolvidas. Nesse sentido, após seleção em placa com herbicida Basta, as mesmas foram passadas para placa com meio MS meia-força, livre de seleção, para que a raiz fosse recuperada e então foram transferidas para potes com solo. A Figura 21 ilustra tais procedimentos.

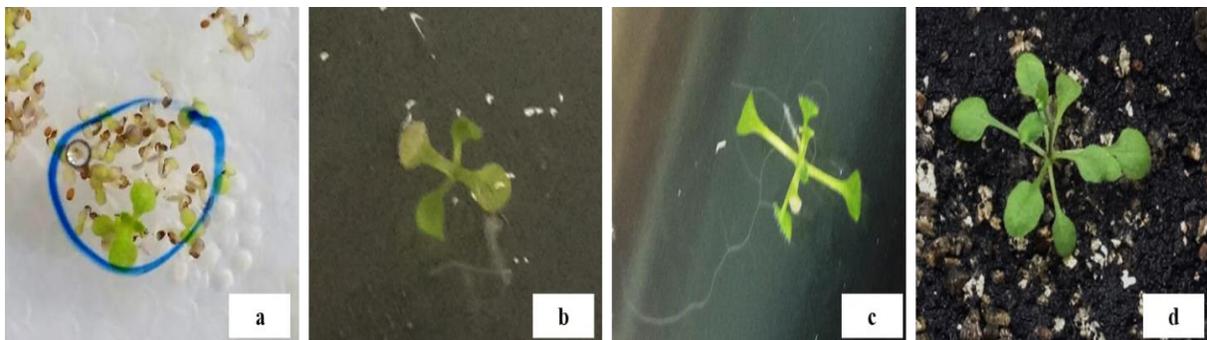


Figura 21. Etapas da seleção de plantas transgênicas de *A. thaliana* pEarleyGate302::*AtPLAC8-11.1-SS*. (a) Plântula transformada em meio seletivo com Basta [10 mg/L]; (b) Passagem da plântula crescida em meio seletivo para meio sem adição do herbicida Basta; (c) Recuperação das raízes após cinco dias em meio sem seleção; (d)

Plântula desenvolvendo-se em solo após a passagem das etapas de seleção e enraizamento.

Outra estratégia para seleção das plantas transgênicas, visando obter plantas transformadas com tamanho de raiz propício para desenvolvimento e crescimento em solo, foi a pulverização de uma solução de basta conforme descrito no item 3.1.6, em plantas com a raiz já estabelecida. A Figura 22 ilustra a estratégia de seleção.



Figura 22. Seleção de transformantes por pulverização de uma solução de Basta. Uma solução preparada a partir de 1 mL de Basta [120 mg/mL] + 999 mL de H₂O + 500 µL de Silwet foi pulverizada em plantas estabelecidas oriundas das sementes coletadas das plantas submetidas ao *floral dipping*. (a) Plantas após cinco horas da aplicação da solução com Basta; (b) Plantas após cinco dias da aplicação da solução com Basta; (c) As plantas que sobreviveram à seleção foram passadas para solo para que completassem seu ciclo de vida.

Independentemente da utilização de dois métodos distintos para a seleção de plantas transgênicas, não foi possível crescer os transformantes até a fase de coleta das sementes. As principais características observadas foram: tamanho reduzido das raízes e dificuldade de crescimento em solo (Figura 23).



Figura 23. Plântula transformante em solo após seleção em placa com o herbicida Basta [10 mg/L]. Transformante superexpressando *PLAC8-11::HIS* (pEarleyGate 302).

4.2.6 Localização subcelular de AtPLAC8-11

Plantas de *A. thaliana* transformadas para superexpressão de *PLAC8-11::YFP* tiveram suas sementes coletadas e as mesmas passaram por seleção com o herbicida Basta. Aquelas com características fenotípicas de plantas transgênicas foram analisadas em microscópio de fluorescência com aumento de 10x para análises preliminares da localização subcelular de *PLAC8-11.1* (Figura 24). As plantas transgênicas analisadas exibiram a fluorescência resultante da fusão *PLAC8-11::YFP* no tecido foliar (24c), hipocótilo (24 f, g e h), raiz (24i) e tricoma (24 j e k). Não foi observada fluorescência nas plantas selvagens (24l).

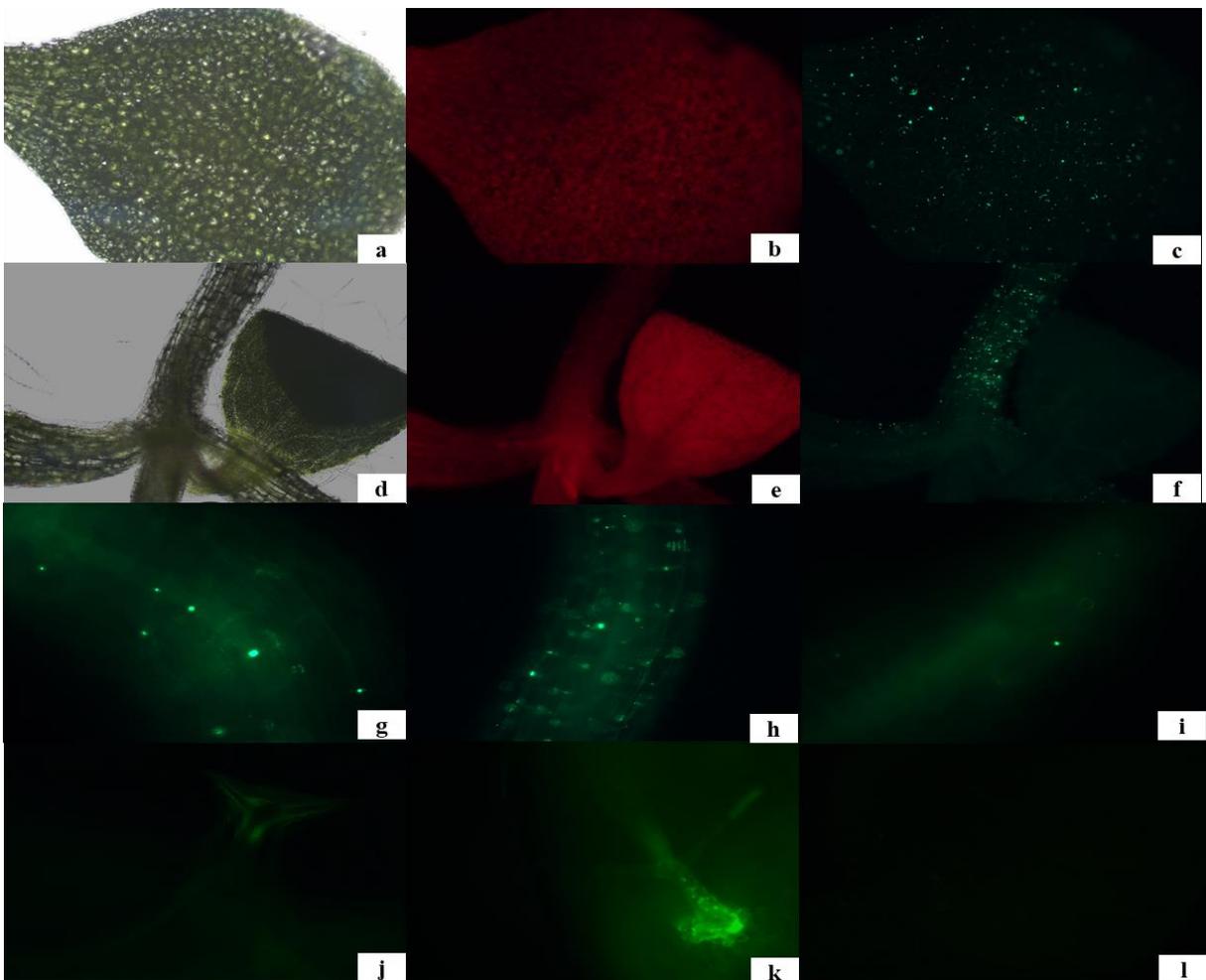


Figura 24. Análise preliminar das plântulas transgênicas superexpressando *PLAC8-11::YFP* em microscópio de fluorescência com aumento de 10x. As plântulas resistentes ao herbicida Basta foram analisadas em microscópio de fluorescência (filtro FITC; excitação 490 nm e emissão 530 nm). (a): Tecido foliar em filtro de campo claro; (b) Equivalente tecido foliar exibindo coloração avermelhada devido a autofluorescência da clorofila; (c): Equivalente tecido foliar no filtro correto para visualização de YFP: planta transgênica exibindo fluorescência devido a proteína

YFP. (d a f): Hipocótilo em diferentes filtros: d: filtro de campo claro, e: filtro para clorofila, f: filtro para YFP. (g e h) Hipocótilo exibindo fluorescência em filtro para YFP; (i) Raíz exibindo tênue fluorescência em filtro para YFP; (j e k) Fluorescência observada nos tricomas em filtro para YFP; (l) Controle negativo: planta selvagem Col-0 observada em filtro para YFP.

Conforme ilustra a Figura 25, é possível observar fluorescência nas membranas plasmáticas que estão delimitando as células em análise. Além disso, durante realização das imagens, verificou-se uma movimentação da fluorescência em pontuações, ao longo da célula. A movimentação observada através da fluorescência pode ser um indicativo de que a proteína poderia estar sendo reciclada por alguma vesícula secretora, sendo eliminada da célula, devido a mesma não tolerar os altos índices de superexpressão da proteína codificada pelo gene em estudo. Entretanto, é necessário a realização de estudos de co-localização com marcadores específicos para organelas para testar esta hipótese.

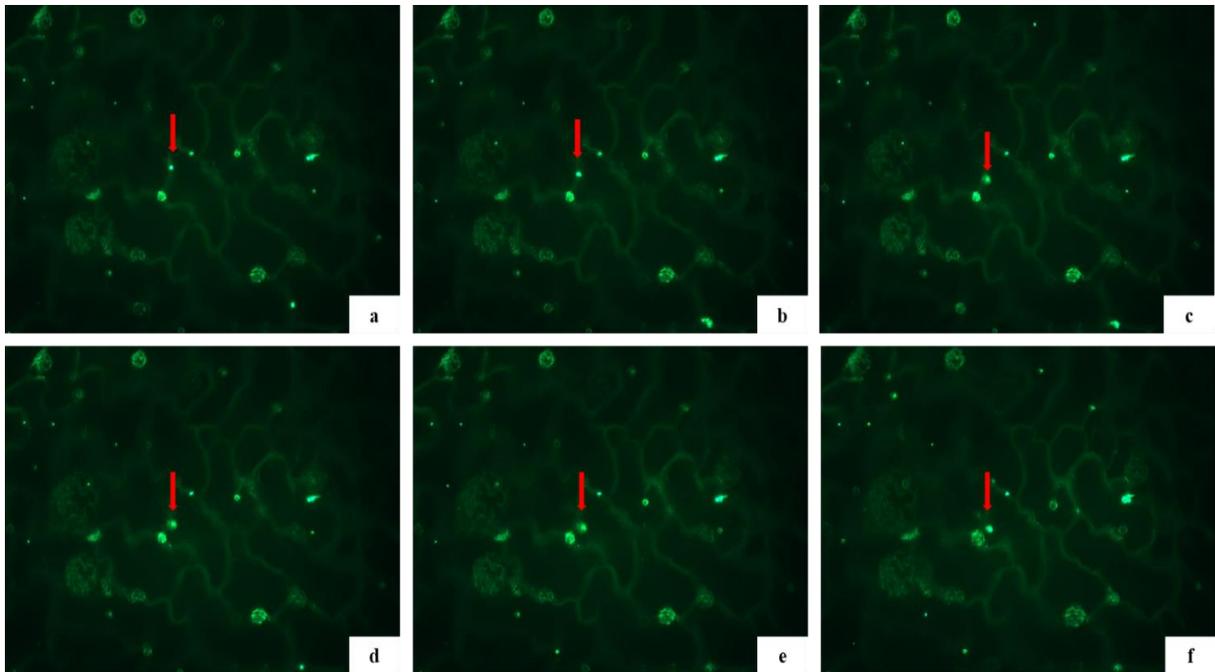


Figura 25. Análise das plântulas transgênicas superexpressando PLAC8-11::YFP em microscópio de fluorescência com aumento de 40x. É observada fluorescência ao nível de membrana plasmática e movimentação da fluorescência ao longo da célula. As setas vermelhas ajudam a visualizar a movimentação da fluorescência em uma célula que está sendo acompanhada através das imagens consecutivas em (a) até (f).

4.2.7 Nível de expressão do gene *PLAC8-11* e *PLAC8-11.2* em folhas de *Arabidopsis thaliana*

Reações de RT-qPCR foram realizadas conforme item 3.1.8 para analisar os níveis de transcritos de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em folhas de *A. thaliana*. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e quadruplicata técnica. Conforme Figura 26, verifica-se um maior nível de expressão de *AtPLAC8-11.1* em comparação com *AtPLAC8-11.2* em folhas de *A. thaliana*, sob condições normais de crescimento.

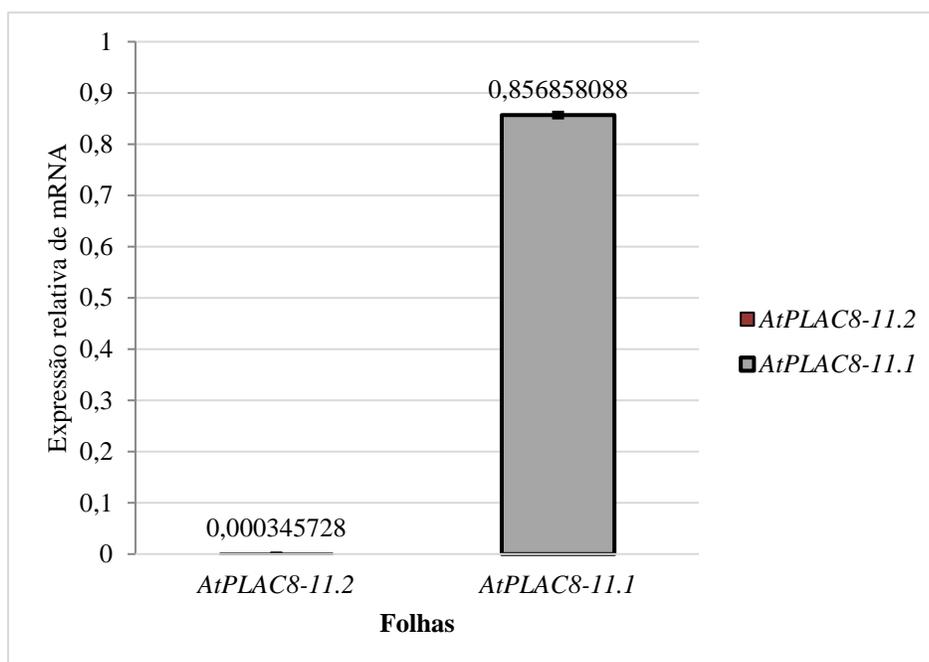


Figura 26. Determinação do nível de expressão do gene *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em folhas de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 em condições normais de crescimento. O RNA total das folhas de *A. thaliana* foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando RT-qPCR. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão do gene *PP2A*. Os resultados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak and Schmittgen (2001).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES

4.3.1 Obtenção de sementes com inserção de T-DNA

No presente trabalho, foram selecionados e adquiridos dois mutantes de *A. thaliana* para o gene *AtPLAC8-11.1* com inserção de T-DNA a partir do banco de sementes *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC), descritos conforme Tabela 7.

Tabela 7. Mutantes para *AtPLAC8-11.1* com inserção de T-DNA

Ecótipo	Inserção de T-DNA	Número Stock	Genótipo	Vetor e Seleção
Columbia	Promotor	CS852038	Heterozigoto	pDs-Lox/Basta
Columbia	Éxon 1	CS378853	Homozigoto	pAC161/Sulfadiazina

4.3.2. Genotipagem de mutantes

Conforme descrito na metodologia, três *primers* foram utilizados nas reações de genotipagem para cada um dos mutantes. Dois deles, chamados de *forward* (F) e *reverse* (R) amplificam a sequência do gene que flanqueia a inserção, e o terceiro *primer* chamado de LB (*left border of T-DNA*) hibridiza na inserção do T-DNA (Tabela 5). Os produtos obtidos na PCR para CS852038 e CS378853 podem ser observados nas Figura 27 e 28, respectivamente. De acordo com cada conjunto de primers utilizados têm-se um tamanho esperado de fragmento. Para o mutante CS852038, a combinação dos *primers* F + R apresenta uma banda de 1134 pb, já a combinação F + LB, amplifica um fragmento (com a inserção de T-DNA) entre 442-772pb. Verifica-se nas imagens da Figura 27 a e b (linha 1 e 3, respectivamente) que na reação com plantas selvagem (Col-0) há amplificação de um fragmento menor que 1500pb, conforme esperado para a planta selvagem. Para as linhagens mutantes CS2038.1 e CS2038.2, os fragmentos resultantes da amplificação para banda selvagem foram acima de 1500 pb (3 e 5), e os fragmentos resultantes da amplificação da banda mutante ficaram em 600 pb, diferente dos fragmentos oriundos de uma contaminação em 2 e C2-. Nesse sentido, há indícios de que as linhagens CS852038.1 e CS852038.2 são homozigotas para a inserção de T-DNA.

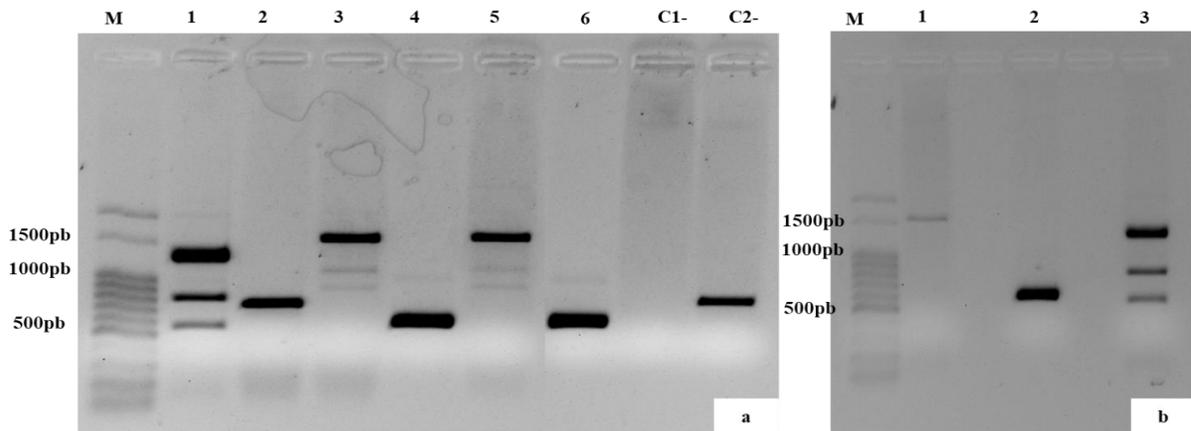


Figura 27. Produtos amplificados por PCR a partir do DNA genômico de plantas de *Arabidopsis thaliana* com inserção de T-DNA no promotor do gene de *AtPLAC8-11.1*, linhagens CS852038.1 e CS852038.2. Em uma das reações, utilizou-se DNA genômico de plantas selvagens (Col-0). (a) M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Ludwig®); Linha 1: DNA genômico de plantas selvagens + primer F e R; Linha 2: DNA genômico de plantas selvagem + primer F e LB; Linha 3: DNA genômico da linhagem CS852038.1 + primer F e R; Linha 4: DNA genômico da linhagem CS852038.1+ primer F e LB; Linha 5: DNA genômico da linhagem CS852038.2 + primer F e R; Linha 6: DNA genômico da linhagem CS852038.2 + primer F e LB; C1-: Controle negativo - H₂O + primer F e R; C2-: Controle negativo - H₂O + primer F e LB. (b) M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Ludwig®). Linha 1: DNA genômico da linhagem CS852038.2 + primer F e R; Linha 2: DNA genômico da linhagem CS852038.3 + primer F e LB; Linha 3: DNA genômico de Col-0 + primer F e R. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1,2% corado com gel red.

Na Figura 28, a combinação dos *primers* F + R gera um fragmento característico de banda selvagem em 1074 pb e a combinação dos *primers* F + LB gera um fragmento entre 503-803pb. Apesar da amplificação da banda mutante não ter sido efetiva, nas linhas 2, 4 e 6, existe indicativos de que as linhagens testadas são homocigotas para a inserção de T-DNA, uma vez que nenhuma das linhagens mutantes exibiram a banda selvagem e que a planta Col-0 exibiu uma forte banda selvagem logo acima de 1000 pb (Figura 28, linha 7).

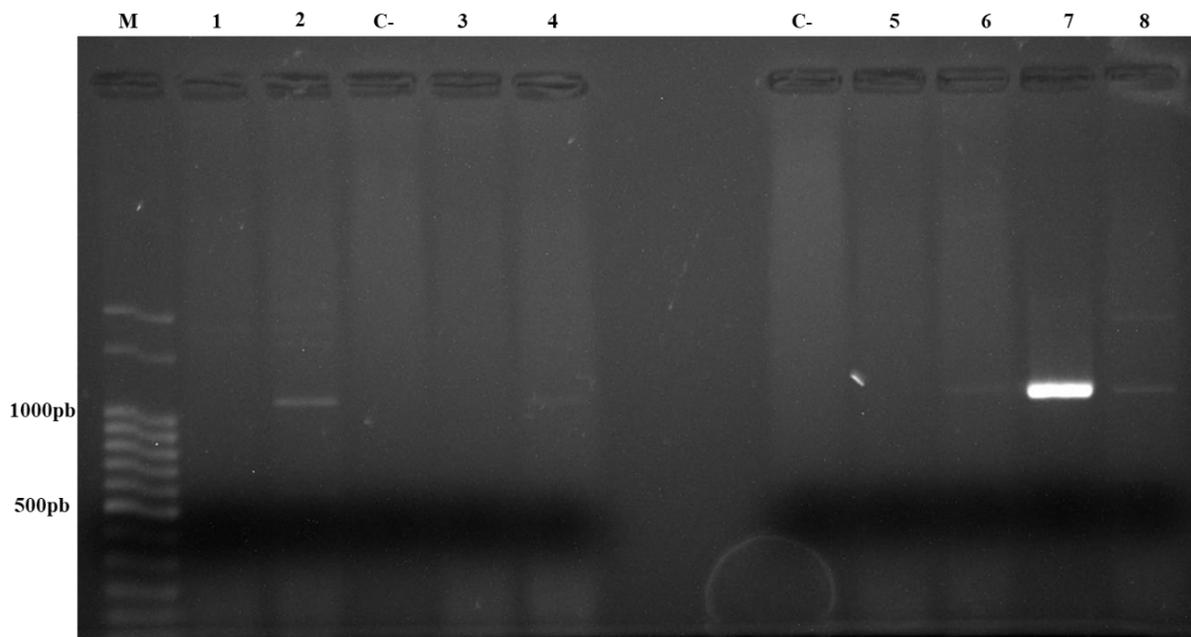


Figura 28. Produtos amplificados por PCR a partir do DNA genômico de plantas de *Arabidopsis thaliana* com inserção de T-DNA no primeiro éxon do gene de *AtPLAC8-11.1*, linhagens CS378853.1, CS378853.2 e CS378853.3. Em uma das reações, utilizou-se DNA genômico de plantas selvagem (Col-0). (a) M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (Ludwig®); Linha 1: DNA genômico da linhagem CS378853.1 + primer F e R; Linha 2: DNA genômico da linhagem CS378853.1 + primer F e LB; Linha 3: DNA genômico da linhagem CS378853.2 + primer F e R; C-: Controle negativo - H₂O + primer F e R; Linha 4: DNA genômico da linhagem CS378853.2 + primer F e LB; C-: Controle negativo - H₂O + primer F e LB; Linha 5: DNA genômico da linhagem CS378853.3 + primer F e R; Linha 6: DNA genômico da linhagem CS378853.3 + primer F e LB; Linha 7: DNA genômico de Col-0 + primer F e R; Linha 8: DNA genômico de Col-0 + primer F e LB. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1,2% corado com gel red.

4.3.4 Análise da Segregação

A análise da segregação foi realizada com o inóculo de 100 sementes da linhagem de interesse em meio com seleção por antibiótico ou herbicida, dependendo do mutante analisado, e 50 sementes em placa com meio controle para contabilização de sementes inviáveis. Foi realizada a análise de segregação para os mutantes das linhagens CS852038 e CS378853. O cálculo de sobrevivência de plântulas em meio com seleção foi utilizado para caracterização de heteroziguidade e homoziguidade. A porcentagem de sobrevivência esperada para linhagens heterozigotas em meio seletivo é de 70 a 80 % (3:1), e de linhagens homozigotas deve ser maior que 90 %. Verificamos que as linhagens analisadas obtiveram sobrevivência maior do que 90% em meio seletivo, caracterizando homoziguidade para a mutação, conforme Tabela 8. Na Figura 29 é possível observar as placas utilizadas para o experimento de segregação com o

mutante CS378853.

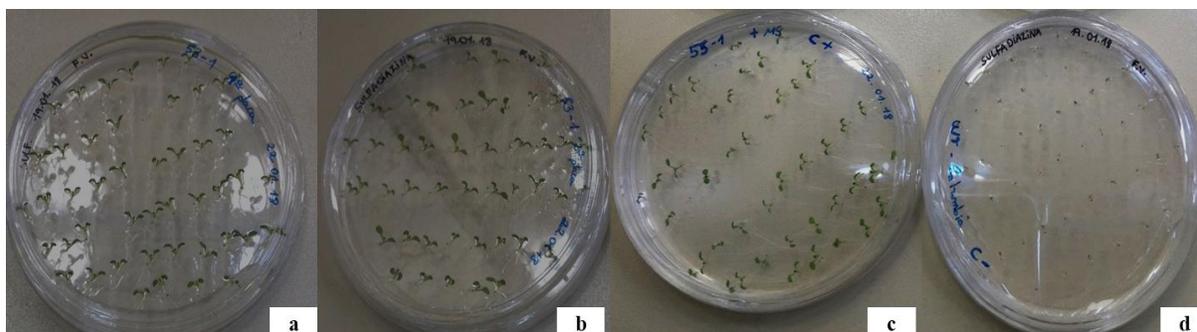


Figura 29. Placas analisadas no teste da segregação para o mutante com inserção de T-DNA no primeiro éxon do gene *AtPLAC8-11.1* (Linhagem CS378853.5). Seleção realizada com antibiótico sulfadiazina [7.5 mg/L]. (a) Primeira placa de sementes da linhagem CS378853.5 germinadas em meio seletivo; (b) Segunda placa de sementes da linhagem CS378853.5 germinadas em meio seletivo. (c) Controle positivo: sementes da linhagem CS378853 germinadas em meio MS meia-força sem adição de sulfadiazina; (d) Controle negativo: sementes de plantas selvagem (Col-0) germinadas em meio seletivo contendo sulfadiazina [7.5 mg/L].

Tabela 8. Resultado do experimento da análise de segregação

Mutante - % de sementes que germinaram	CS852038	CS378853
1ª placa: sulfadiazina [7.5 mg/L]		92%
1ª placa: basta [10 mg/L]	92%	
2ª placa: sulfadiazina [7.5 mg/L]		92%
2ª placa: basta [10 mg/L]	92%	
Controle positivo: sem seleção	92%	90%
Controle Negativo: Columbia + sulfadiazina [7.5 mg/L]		0%
Controle Negativo: Columbia + basta [10 mg/L]	0%	

4.3.5 Análise da expressão do gene *AtPLAC8-11.1* nos mutantes CS852038 e CS378853

Foi realizada a análise da expressão do gene *PLAC8-11.1* em folhas de plantas do tipo selvagem e mutantes CS852038 e CS378853 para comprovação de que a inserção homocigota de T-DNA, demonstrada pelo teste de segregação, está situada no gene de interesse (Fig. 30). É

possível verificar que os mutantes com inserção de T-DNA no promotor do gene *PLAC8-11.1* (CS852038) são plantas *knockdown*, nesse sentido, há uma redução da expressão gênica de *PLAC8-11.1*, mas a mesma ainda é detectada. Os mutantes com inserção de T-DNA no primeiro éxon do gene *PLAC8-11.1* (CS378853) são plantas *knockout*, ou seja, não há expressão gênica do gene *PLAC8-11.1* em comparação com as plantas selvagem Col-0. Obter linhagens mutantes *knockout* e *knockdown* de um gene de interesse é de extrema relevância para o estudo da função molecular e fisiológica do mesmo.

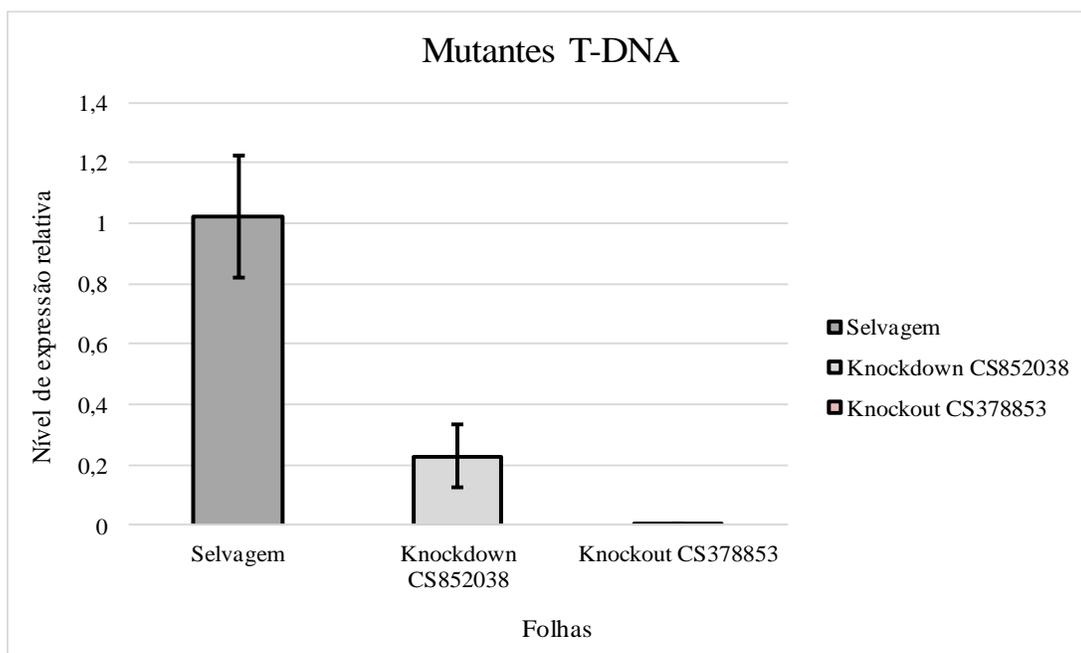


Figura 30. Análise da expressão do gene *AtPLAC8-11.1* em folhas de plantas mutantes CS852038 e CS378853 com inserção de T-DNA na região promotora e éxon 1, respectivamente. O RNA total das folhas de *A. thaliana* foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando RT-qPCR. As colunas apresentam a média das triplicatas biológicas e as barras o erro padrão. (n=3). O normalizador utilizado foi Ubiquitina-10 (AT4G05320) e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak and Schmittgen (2001).

4.3.6 Análise morfológica do comprimento de raiz do mutante *knockout plac8-11.1*

Durante os procedimentos de cultivo das linhagens mutantes e experimentos para genotipagem, verificou-se que as linhagens mutantes *knockout plac8-11.1* apresentavam visualmente um tamanho de raiz aumentado em comparação com as plantas selvagens. Nesse sentido, realizou-se um experimento quantitativo durante um período de oito dias após estratificação, para comparar e verificar se as linhagens *knockout plac8-11.1* realmente

possuíam tal fenótipo observado. Plântulas do mutante *knockout plac8-11.1* exibem tamanho de raiz significativamente maior em comparação com plântulas do tipo selvagem, quando crescidas em meio controle nos dias 4, 6 e 8 de análise (Fig. 31 e 32).

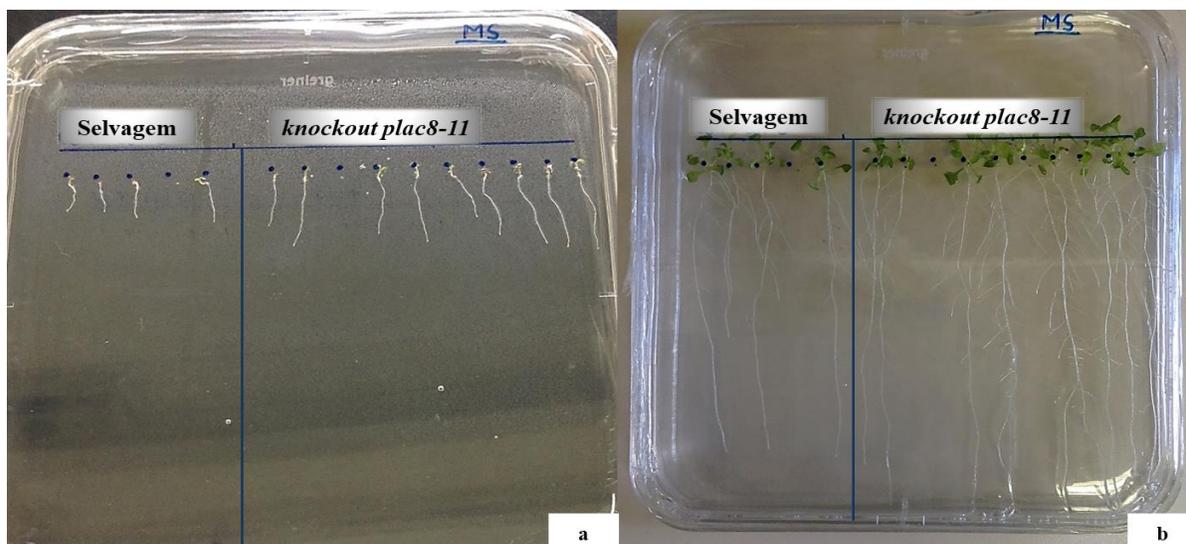


Figura 31. Crescimento de plântulas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem Col-0 e mutante *knockout plac8-11.1* (a) Plântulas selvagem e *knockout plac8-11.1* crescidas por 4 dias em meio MS meia-força. (b) Plântulas selvagens e *knockout plac8-11.1* crescidas por 10 dias em meio MS meia-força. A linha azul vertical separa as plântulas do tipo selvagem das plântulas mutante *knockout plac8-11.1*.

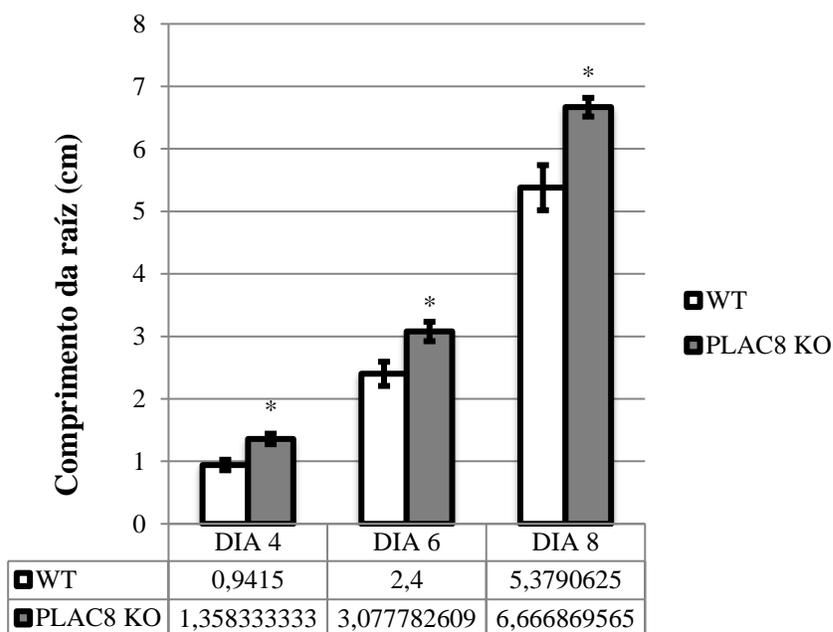


Figura 32. Quantificação do comprimento de raízes de plântulas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem Col-0 e plântulas mutante *knockout plac8-11.1* crescida em meio MS meia-força. Análises foram realizadas em quatro,

seis e oito dias após o processo de estratificação e cultivo em sala de crescimento. A quantificação das raízes foi realizada com o software ImageJ. As análises estatísticas foram realizadas através do teste t e os * indicam diferenças significantivas com $p < 0.01$.

4.3.7 Experimento de Germinação

Foi realizada uma análise da germinação de sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem e mutante *knockout plac8-11.1* para testar se os resultados obtidos no experimento de medida do comprimento de raiz eram devidos a uma germinação precoce das sementes *knockout plac8-11.1*. A germinação das sementes foi acompanhada durante 72 horas e contabilizada pelo rompimento do endosperma pela raiz embrionária e emissão desta através do revestimento da semente (Fig 33). Não houve diferença na porcentagem de germinação entre sementes do tipo selvagem e *knockout plac8-11.1* durante 24, 48 e 72 horas de análise (Fig 34). Dessa maneira, a possibilidade das plântulas *knockout plac8-11.1* possuírem um maior tamanho de raiz devido a uma germinação adiantada foi refutada.

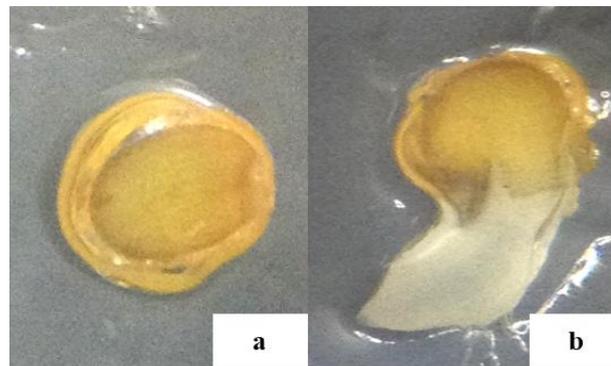


Figura 33. Análise visual das sementes no teste de germinação com auxílio de lupa. (a) Semente não germinada; (b) Semente considerada germinada após a raiz embrionária se projetar através do revestimento da semente.

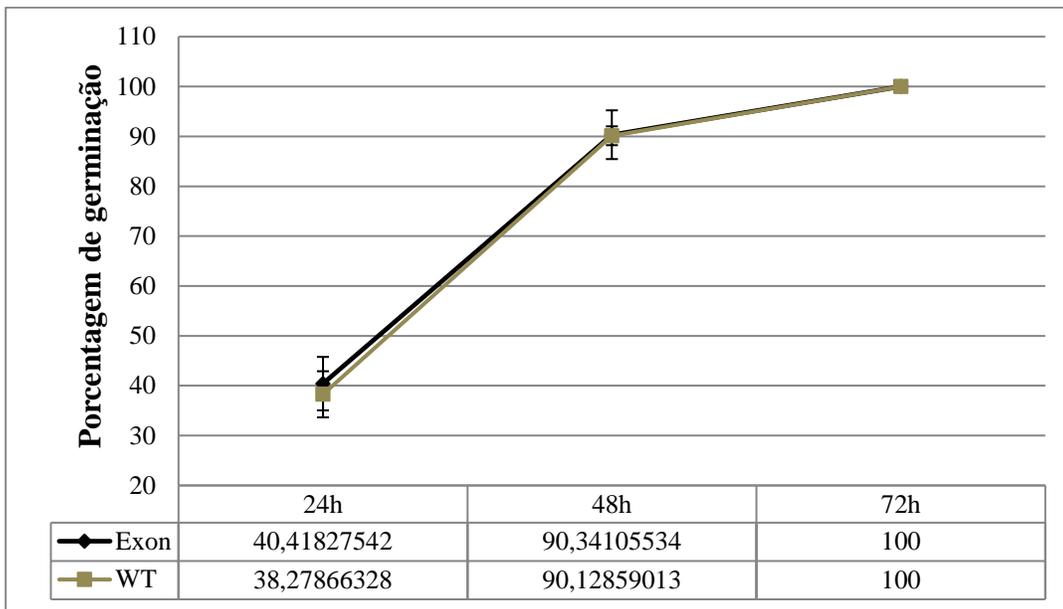


Figura 34. Porcentagem de germinação de sementes do tipo selvagem e mutante knockout *plac8-11.1* durante 72 horas. Foram analisadas o total de 135 sementes do tipo selvagem e knockout *plac8-11.1*. O número total de sementes que germinou em cada uma das placas foi considerado como 100% para os cálculos de germinação.

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

O sequenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana* forneceu a oportunidade de determinar as funções de aproximadamente 27.000 genes codificadores de proteínas. Pesquisas voltadas ao estudo do fenótipo de plantas mutantes são considerados excelentes abordagens para elucidar os papéis dos genes e seus produtos, esclarecendo as vias bioquímicas, de desenvolvimento e de sinalização (AJJAWI et al., 2009; INITIATIVE, 2000). Até o momento, não há na literatura nenhum estudo experimental indicando a funcionalidade do gene *AtPLAC8-11.1*, localização subcelular e sua relevância frente a processos celulares específicos.

Mais de um mRNA pode ser originado a partir de um único pré-mRNA por *splicing* alternativo atuando para diversificar o transcriptoma e o proteoma de um organismo (SHANG; CAO; MA, 2017). Neste contexto, o presente trabalho apresenta pela primeira vez a confirmação experimental da existência e amplificação da forma alternativa de *splicing* *AtPLAC8-11.2*. O papel de *AtPLAC8-11.2* ainda precisa ser testado experimentalmente.

A seleção de plântulas de *A. thaliana* superexpressando *AtPLAC8-11.1*, em meio seletivo contendo o herbicida Basta, está sendo um desafio, apesar das duas metodologias empregadas para seleção: recuperação da raiz em meio MS meia-força após seleção inicial com o herbicida Basta [10 mg/L] e pulverização de Basta em plantas com as raízes bem estabelecidas. Mesmo apresentando características de transformantes (expansão dos cotilédones e emissão do primeiro par de folhas verdadeiras) e apresentarem fluorescência YFP (Figura 24), as possíveis plântulas transformantes apresentavam tamanho de raiz reduzido, cessando seu crescimento após alguns dias (Figura 21 e 23).

Várias hipóteses podem ser consideradas para o entendimento deste fenótipo, uma delas é de que os agentes seletivos empregados nos métodos de seleção de plantas transgênicas frequentemente exercem um efeito negativo sobre o crescimento das plantas (WEI, 2004). Dados de microarranjos revelaram a ativação de vários genes relacionados a estresse, incluindo genes correlacionados com a desintoxicação em plantas de *A. thaliana* tolerantes ao glufosinato que foram expostas ao herbicida. Nesse sentido, presume-se que as plantas transgênicas ativem outros processos de desintoxicação para compensar os efeitos tóxicos do herbicida residual ou

seus derivados (ABDEEN; MIKI, 2009). Conforme relatado anteriormente, o *AtPLAC8-11.1*, por interagir com um regulador negativo da PCD, pode estar ativando a via de PCD frente a sinais de estresse. Devido ao elevado nível de toxicidade do herbicida Basta e da superexpressão de um gene relacionado com PCD, as plântulas transformantes podem não suportar tal situação, diminuindo o tamanho da raiz e cessando seu crescimento. A limitação do crescimento em plantas é uma estratégia de aclimatação contra os estresses abióticos (YAN et al., 2011). Em estudos realizados utilizando *A. thaliana* foi visto que o estresse desencadeado por NaCl inicia a PCD na raiz primária, levando à sua eliminação (HUH et al., 2002).

Além disso, existem relatos de genes que quando superexpressos causam fenótipos pleiotrópicos. O gene *LEAFY COTYLEDON1 (LECI)*, está entre os diversos reguladores chave que controlam a maturação de sementes em *Arabidopsis thaliana*. Porém, a superexpressão constitutiva da *LECI* causou letalidade das plântulas, dificultando seu estudo funcional (MU et al., 2008). Em *A. thaliana*, também foi visto que a superexpressão de uma das quatro proteínas que contém o domínio CSD (*Cold shock domain*) conservado, *AtCSP4* (AT2G21060), induziu a letalidade do embrião (SASAKI; IMAI, 2012). Uma alternativa para conseguir realizar a superexpressão de *AtPLAC8-11.1*, e assim estudar sua função, é através da superexpressão a partir de um promotor induzível. Os sistemas indutíveis oferecem a possibilidade de ativar a expressão gênica em estágios específicos do desenvolvimento das plantas e em tecidos de interesse, permitindo assim analisar a função de genes requeridos para a viabilidade da planta (BORGHI, 2010).

No banco de informações TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) é predito que a proteína codificada pelo gene *AtPLAC8-11.1* seja expressa em estruturas como cotilédone, célula guarda, raiz, hipocótilo, folha, dentre outros. Ainda de acordo com o TAIR, existe a predição de que a proteína PLAC8 seja um componente integral da membrana plasmática. Na Figura 25, observa-se que as membranas das células estão visivelmente delimitadas pela fluorescência, fornecendo forte indicativo de localização membranar. As células eucarióticas são compartimentadas por membranas que circundam organelas com funções específicas, sendo que a comunicação e o transporte entre esses compartimentos ligados à membrana são fundamentais para a célula (SPETH et al., 2009). Ao mesmo tempo, as movimentações da

fluorescência, que foram observadas, podem indicar que a proteína esteja sendo reciclada pela célula, via vesículas secretoras, indicando possível toxicidade da superexpressão gênica.

As PCRs para genotipagem dos mutantes (Figuras 27 e 28), deram indícios de homoziguidade para a mutação. Porém os resultados obtidos somente por essas análises não foram conclusivos, uma vez que para o mutante CS852038 (Figura 27) houve um padrão de banda selvagem muito similar entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem, e na Figura 26 houve ausência da amplificação da banda mutante por parte das linhagens mutantes CS378853. De acordo com O'malley, Barragan e Ecker (2015), a genotipagem bem-sucedida depende da seleção de bons *primers* que flanqueiam o local da inserção e visam a borda esquerda do T-DNA (LB). As análises de segregação das sementes mutantes indicaram segregação homozigota (Figura 27 e Tabela 8) e os resultados da RT-qPCR com a parte aérea das plantas potenciais homozigotas para inserção de T-DNA no gene *AtPLAC8-11.1* e com plantas selvagens indicaram que as linhagens CS852038 são *knockdown* e as linhagens CS378853 são *knockout* para o gene *AtPLAC8-11.1*, em comparação com as plantas selvagens. A inserção de T-DNA em um exon ou um intron na região codificadora da proteína é igualmente capaz de eliminar o gene alvo, enquanto inserções antes do códon de início ou após o códon de parada são um pouco menos efetivas (FOJTOVÁ et al., 2011).

O fenótipo de maior comprimento de raiz em plântulas *knockout plac8-11* (Fig. 32) parece estar em conformidade com o tamanho reduzido de raiz encontrado em plântulas superexpressando o gene *AtPLAC8-11.1*. Diversos estudos utilizando mutantes de T-DNA foram úteis para concluir via alteração fenotípica a função do gene em estudo. Por exemplo, a mutação *knockout* em um membro da família gênica CEP (*C-terminally encoded peptide*), *cep3* (At2g23440), levou a um crescimento aumentado de raiz e parte aérea sob uma gama de condições abióticas de estresse, nutrientes e luz em *A. thaliana*. Nesse sentido, os autores propuseram que os genes CEPs sejam reguladores negativos do desenvolvimento radicular, mediados por influências ambientais no desenvolvimento das plantas (DELAY; IMIN; DJORDJEVIC, 2013). Via obtenção de mutantes duplos de T-DNA, pesquisadores descobriram que GTL1 (trihelix transcription factor GT-2-LIKE1) e seu homólogo DF1 regulam o crescimento de pêlos radiculares em *Arabidopsis*, através da repressão do fator de transcrição

reponsável por controlar o crescimento dos pêlos radiculares, ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4, uma vez que os mutantes duplos *gtl1-1 dfl-1* apresentam pêlos radiculares significativamente mais longos em comparação com o tipo selvagem (SHIBATA et al., 2018). Em vista disso, devem ser realizados novos experimentos visando avaliar o desenvolvimento radicular do mutante *knockout plac8-11.1* para verificar a função de *AtPLAC8-11.1* como possível regulador negativo do desenvolvimento radicular em *Arabidopsis*.

As análises dos transcritos de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* por RT-qPCR mostraram um maior nível de expressão em parte aérea de *A. thaliana* da forma canônica do gene *AtPLAC8-11.1* em condições normais de crescimento. O variante de *splicing AtPLAC8-11.2* parece não apresentar expressão gênica significativa. Porém, vários trabalhos sugerem que a regulação pós-transcricional da expressão gênica exerce papéis críticos na resposta das plantas às mudanças ambientais, sendo o *splicing* alternativo um novo meio de regulação para aptidão ambiental das plantas, causando melhorias nos fenótipos de plantas e culturas (ALI; REDDY, 2008; SYED et al., 2012; SHANG; CAO; MA, 2017).

Nesse sentido, estudos devem ser aprofundados para concluir a caracterização molecular, fenotípica e funcional do gene *AtPLAC8-11.1*, bem como da forma alternativa de *splicing AtPLAC8-11.2*. Para tal, deve-se seguir os seguintes procedimentos como perspectivas futuras:

- Realizar a superexpressão indutível de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em plantas de *A. thaliana*.
- Analisar fenotipicamente e os níveis de expressão de *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em diferentes tecidos de *A. thaliana* em condições controle e quando submetidas a diferentes estresses abióticos, como UVB e frio.
- Realizar estudos de localização e colocalização subcelular para o gene *AtPLAC8-11.1* e *AtPLAC8-11.2* em protoplastos de *A. thaliana*, utilizando marcadores específicos de organelas.
- Avaliar fenotipicamente e molecularmente as respostas das plantas *knockdown* e *knockout* de *AtPLAC8-11.1* frente a condições de estresses abióticos.
- Aprofundar os estudos quanto ao tamanho das raízes nas plantas *knockout plac8-11.1*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEEN, Ashraf; MIKI, Brian. The pleiotropic effects of thebargene and glufosinate on the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Biotechnology Journal*, [s.l.], v. 7, n. 3, p.266-282, abr. 2009.

AJJAWI, I. et al. Large-Scale Reverse Genetics in *Arabidopsis*: Case Studies from the Chloroplast 2010 Project. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 152, n. 2, p.529-540, 11 nov. 2009.

ALI, G. S.; REDDY, A. S. N.. Regulation of Alternative *Splicing* of Pre-mRNAs by Stresses. *Current Topics In Microbiology And Immunology*, [s.l.], p.257-275, 2008.

AMBASTHA, Vivek; TRIPATHY, Baishnab C; TIWARI, Budhi Sagar. Programmed cell death in plants: A chloroplastic connection. *Plant Signaling & Behavior*, [s.l.], v. 10, n. 2, p.1-7, fev. 2015.

BORGHI, Lorenzo. Inducible Gene Expression Systems for Plants. *Plant Developmental Biology*, [s.l.], p.65-75, 2010.

CABREIRA, Caroline et al. Revising the PLAC8 Gene Family: From a Central Role in Differentiation, Proliferation, and Apoptosis in Mammals to a Multifunctional Role in Plants. *Genome* (no prelo).

CABREIRA, Caroline et al. The Lesion Simulating Disease (LSD) gene family as a variable in soybean response to *Phakopsora pachyrhizi* infection and dehydration. *Functional & Integrative Genomics*, [s.l.], v. 13, n. 3, p.323-338, 12 jun. 2013.

CLARKE, J. D.. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, [s.l.], v. 2009, n. 3, p.177-177, 1 mar. 2009.

COLL, N S; EPPLE, P; DANGL, J L. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, [s.l.], v. 18, n. 8, p.1247-1256, 8 abr. 2011.

CONG, B.; LIU, J.; TANKSLEY, S. D.. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 99, n. 21, p.13606-13611, 7 out. 2002.

CZARNOCKA, Weronika et al. The dual role of LESION SIMULATING DISEASE 1 as a condition-dependent scaffold protein and transcription regulator. *Plant, Cell & Environment*,

[s.l.], v. 40, n. 11, p.2644-2662, 26 jul. 2017.

DANEVA, Anna et al. Functions and Regulation of Programmed Cell Death in Plant Development. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, [s.l.], v. 32, n. 1, p.441-468, 6 out. 2016.

DANON, Antoine et al. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology And Biochemistry*, [s.l.], v. 38, n. 9, p.647-655, set. 2000.

DELAY, Christina; IMIN, Nijat; DJORDJEVIC, Michael A.. CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 64, n. 17, p.5383-5394, 31 out. 2013.

DICKMAN, Martin et al. Reassessing apoptosis in plants. *Nature Plants*, [s.l.], v. 3, n. 10, p.773-779, 25 set. 2017.

DIETRICH, Robert A. et al. A Novel Zinc Finger Protein Is Encoded by the Arabidopsis LSD1 Gene and Functions as a Negative Regulator of Plant Cell Death. *Cell*, [s.l.], v. 88, n. 5, p.685-694, mar. 1997.

EARLEY, Keith W. et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, [s.l.], v. 45, n. 4, p.616-629, fev. 2006.

EPPLE, P. et al. Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in Arabidopsis by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 100, n. 11, p.6831-6836, 5 maio 2003.

FOJTOVÁ, Miloslava et al. Molecular analysis of T-DNA insertion mutants identified putative regulatory elements in the AtTERT gene. *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 62, n. 15, p.5531-5545, 23 ago. 2011.

FOYER, Christine H. et al. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 67, n. 7, p.2025-2037, mar. 2016.

FRARY, A.. Fw2.2: A Quantitative Trait Locus Key to the Evolution of Tomato Fruit Size. *Science*, [s.l.], v. 289, n. 5476, p.85-88, 7 jul. 2000.

GALAVIZ-HERNANDEZ, Carlos et al. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes

identified through microarray analysis. *Gene*, [s.l.], v. 309, n. 2, p.81-89, maio 2003.

GILCHRIST, D. G.. PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT DISEASE: The Purpose and Promise of Cellular Suicide. *Annual Review Of Phytopathology*, [s.l.], v. 36, n. 1, p.393-414, set. 1998.

GHANEM, M. E. et al. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 59, n. 11, p.3039-3050, 13 jun. 2008.

GOODSTEIN, David M. et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 40, n. 1, p.1178-1186, 22 nov. 2011.

HARA-NISHIMURA, Ikuko et al. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion In Plant Biology*, [s.l.], v. 8, n. 4, p.404-408, ago. 2005.

HATSUGAI, Noriyuki et al. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 6, p.1-11, 9 abr. 2015.

HATSUGAI, Noriyuki; HARA-NISHIMURA, Ikuko. Two vacuole-mediated defense strategies in plants. *Plant Signaling & Behavior*, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1568-1570, dez. 2010.

HE, Rui et al. Metacaspase-8 Modulates Programmed Cell Death Induced by Ultraviolet Light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 283, n. 2, p.774-783, 12 nov. 2007.

HUH, Gyung-hye et al. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *The Plant Journal*, [s.l.], v. 29, n. 5, p.649-659, mar. 2002.

INITIATIVE., Arabidopsis Genome. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, [s.l.], v. 408, n. 6814, p.796-815, dez. 2000.

JALMI, Siddhi K. et al. Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 9, p.1-21, 5 fev. 2018.

KABBAGE, Mehdi et al. The Life and Death of a Plant Cell. *Annual Review Of Plant Biology*, [s.l.], v. 68, n. 1, p.375-404, 28 abr. 2017.

KHAN, Abid et al. Genome-wide analysis of dirigent gene family in pepper (*Capsicum annuum*

L.) and characterization of CaDIR7 in biotic and abiotic stresses. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-21, 3 abr. 2018.

KIM, Geun-don; CHO, Young-hee; YOO, Sang-dong. Regulatory Functions of Cellular Energy Sensor SNF1-Related Kinase1 for Leaf Senescence Delay through ETHYLENE-INSENSITIVE3 Repression. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-13, 9 jun. 2017.

KINSEY, Conan et al. Plac8 Links Oncogenic Mutations to Regulation of Autophagy and Is Critical to Pancreatic Cancer Progression. *Cell Reports*, [s.l.], v. 7, n. 4, p.1143-1155, maio 2014.

KUMAR, S. R.; MOHANAPRIYA, G.; SATHISHKUMAR, R.. Abiotic Stress-Induced Redox Changes and Programmed Cell Death in Plants—A Path to Survival or Death? *Redox State As A Central Regulator Of Plant-cell Stress Responses*, [s.l.], p.233-252, 2016.

LI, Y. et al. LESION SIMULATING DISEASE1 Interacts with Catalases to Regulate Hypersensitive Cell Death in Arabidopsis. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 163, n. 2, p.1059-1070, 19 ago. 2013.

LIBAULT, Marc; STACEY, Gary. Evolution of FW2.2-like (FWL) and PLAC8 genes in eukaryotes. *Plant Signaling & Behavior*, [s.l.], v. 5, n. 10, p.1226-1228, out. 2010.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, [s.l.], v. 25, n. 4, p.402-408, dez. 2001.

MAIZEL, Alexis. A View to a Kill: Markers for Developmentally Regulated Cell Death in Plants. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 169, n. 4, p.2341-2341, dez. 2015.

MARQUES, Deyvid N. et al. Plant NAC transcription factors responsive to abiotic stresses. *Plant Gene*, [s.l.], v. 11, p.170-179, set. 2017.

MATUSZKIEWICZ, Mateusz et al. The Role of Programmed Cell Death Regulator LSD1 in Nematode-Induced Syncytium Formation. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 9, p.1-2, 19 mar. 2018.

MININA, Elena A.; BOZHKOVA, Peter V.; HOFIUS, Daniel. Autophagy as initiator or executioner of cell death. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 19, n. 11, p.692-697, nov. 2014.

MININA, Elena A; SMERTENKO, Andrei P; BOZHKO, Peter V. Vacuolar cell death in plants. *Autophagy*, [s.l.], v. 10, n. 5, p.928-929, 27 fev. 2014.

MU, J. et al. LEAFY COTYLEDON1 Is a Key Regulator of Fatty Acid Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 148, n. 2, p.1042-1054, 8 ago. 2008.

MUNNÉ-BOSCH, Sergi; ALEGRE, Leonor. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, [s.l.], v. 31, n. 3, p.203-216, 2004.

NAKAGAWA, Y. et al. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 104, n. 9, p.3639-3644, 20 fev. 2007.

O'MALLEY, Ronan C.; BARRAGAN, Cesar C.; ECKER, Joseph R.. A User's Guide to the Arabidopsis T-DNA Insertion Mutant Collections. *Methods In Molecular Biology*, [s.l.], p.323-342, 2015.

PETROV, Veselin et al. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 6, p.1-2, 18 fev. 2015.

REAPE, Theresa J.; MCCABE, Paul F.. Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*, [s.l.], v. 180, n. 1, p.13-26, out. 2008.

ROCHA, Gustavo Lemos et al. Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants. *Enzyme Inhibitors And Activators*, [s.l.], p.25-47, 29 mar. 2017.

ROGERS, Hilary J.. Senescence-Associated Programmed Cell Death. *Plant Programmed Cell Death*, [s.l.], p.203-233, 2015.

ROGULSKI, Kenneth et al. Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene*, [s.l.], v. 24, n. 51, p.7524-7541, 19 set. 2005.

SASAKI, Kentaro; IMAI, Ryozi. Pleiotropic Roles of Cold Shock Domain Proteins in Plants. *Frontiers In Plant Science*, [s.l.], v. 2, p.1-6, 2012.

SCHIPPERS, Jos H.m. et al. Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 169, n. 2, p.914-930, 14 ago. 2015.

SHANG, Xudong; CAO, Ying; MA, Ligeng. Alternative *Splicing* in Plant Genes: A Means of Regulating the Environmental Fitness of Plants. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 18, n. 2, p.432-450, 20 fev. 2017.

SHIBATA, Michitaro et al. GTL1 and DF1 regulate root hair growth through transcriptional repression of ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4 in Arabidopsis. *Development*, [s.l.], v. 145, n. 3, p.1-11, 1 fev. 2018.

SONG, Won-yong. et al. Common functions or only phylogenetically related? The large family of PLAC8 motif-containing/PCR genes. *Molecules And Cells*, [s.l.], v. 31, n. 1, p.1-7, jan. 2011.

SONG, Won-yong.. A Novel Family of Cys-Rich Membrane Proteins Mediates Cadmium Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 135, n. 2, p.1027-1039, 4 jun. 2004.

SONG, W-yong. et al. Arabidopsis PCR2 Is a Zinc Exporter Involved in Both Zinc Extrusion and Long-Distance Zinc Transport. *The Plant Cell Online*, [s.l.], v. 22, n. 7, p.2237-2252, 1 jul. 2010.

SPETH, E. B. et al. Subcellular Localization and Functional Analysis of the Arabidopsis GTPase RabE. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 149, n. 4, p.1824-1837, 4 fev. 2009.

SWARBRECK, D. et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 36, p.1009-1014, 23 dez. 2007.

SYED, Naeem H. et al. Alternative *splicing* in plants – coming of age. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 17, n. 10, p.616-623, out. 2012.

THALMANN, Matthias; SANTELIA, Diana. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, [s.l.], v. 214, n. 3, p.943-951, 9 mar. 2017.

THEOLOGIS, Athanasios et al. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, [s.l.], v. 408, n. 6814, p.816-820, dez. 2000.

UENO, Naoya et al. Time course of programmed cell death, which included autophagic features, in hybrid tobacco cells expressing hybrid lethality. *Plant Cell Reports*, [s.l.], v. 35, n. 12, p.2475-2488, 1 set. 2016.

VAN HAUTEGEM, Tom et al. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 20, n. 2, p.102-113, fev. 2015.

- VANYUSHIN, B.f et al. Apoptosis in Plants: Specific Features of Plant Apoptotic Cells and Effect of Various Factors and Agents. *International Review Of Cytology*, [s.l.], p.135-179, 2004.
- VASHISTH, Divya et al. Transcriptome changes induced by abiotic stresses in *Artemisia annua*. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-14, 21 fev. 2018.
- WAESE, Jamie et al. EPlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. *The Plant Cell*, [s.l.], v. 29, n. 8, p.1806-1821, ago. 2017.
- WATANABE, Naohide et al. Two *Arabidopsis* Metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b Are Arginine/Lysine-specific Cysteine Proteases and Activate Apoptosis-like Cell Death in Yeast. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 280, n. 15, p.14691-14699, 3 fev. 2005.
- WEI, S.. Fluorescent Screening of Transgenic Arabidopsis Seeds without Germination. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 135, n. 2, p.709-714, 4 jun. 2004.
- WITUSZYŃSKA, Weronika et al. LESION SIMULATING DISEASE 1 and ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, [s.l.], v. 38, n. 2, p.315-330, 5 mar. 2014.
- WOLTERING, E. J.. Do Plant Caspases Exist? *Plant Physiology*, [s.l.], v. 130, n. 4, p.1764-1769, 1 dez. 2002.
- WOO, H. R. et al. Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal Of Cell Science*, [s.l.], v. 126, n. 21, p.4823-4833, 21 out.
- WOO, Hye Ryun; MASCLAUX-DAUBRESSE, Céline; LIM, Pyung Ok. Plant senescence: how plants know when and how to die. *Journal Of Experimental Botany*, [s.l.], v. 69, n. 4, p.715-718, 6 fev. 2018.
- YAMANAKA, T. et al. MCA1 and MCA2 That Mediate Ca²⁺ Uptake Have Distinct and Overlapping Roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, [s.l.], v. 152, n. 3, p.1284-1296, 22 jan. 2010.
- YAN, Yong-sheng et al. Overexpression of an F-box Protein Gene Reduces Abiotic Stress Tolerance and Promotes Root Growth in Rice. *Molecular Plant*, [s.l.], v. 4, n. 1, p.190-197, jan. 2011.

YOU, Jun et al. Genome-wide identification and expression analyses of genes involved in raffinose accumulation in sesame. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-11, 12 mar. 2018.

ZHANG, Xiao et al. Measurement of metabolite variations and analysis of related gene expression in Chinese liquorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants under UV-B irradiation. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-17, 18 abr. 2018.

ZHANG, Xiuren et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, [s.l.], v. 1, n. 2, p.641-646, 29 jun. 2006.

ZHAO, Yun et al. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *Febs Letters*, [s.l.], v. 448, n. 1, p.197-200, 1 abr. 1999.

ZHU, Jian-kang. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, [s.l.], v. 167, n. 2, p.313-324, out. 2016.

CURRICULUM VITÆ resumido
VALANDRO, F.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernanda Valandro

Local e data de nascimento: Nova Bréscia, Rio Grande do Sul, Brasil - 07/12/1990

Endereço Profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética. Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43312, sala 204. Agronomia – Porto Alegre. CEP: 91501-970, RS – Brasil.

Telefone Profissional: (51) 3308-7928

E-mail: fernandavvalandro@gmail.com

2. FORMAÇÃO

2017-2018: Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2011-2016: Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS).

3. ESTÁGIOS

Dezembro 2013 – Julho 2014: Estágio Voluntário no Departamento de Ciências Agrárias, Alimentar e Agro-Ambiental da Università di Pisa (UNIPi) – Itália. Orientadora: Dra. Adriana Ciurli. Projeto: Coltivazione a diverse concentrazioni di azoto nel mezzo di crescita della microalga *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897) per evidenziare una eventuale maggiore

produzione di acidi grassi.

Agosto 2014 – Dezembro 2014: Bolsista InICie no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS). Orientadora: Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues. Projeto: “Seleção e Isolamento de Leveduras de Curtumes para Utilização na Produção de Biocombustíveis”.

Fevereiro 2015 – Julho 2015: Bolsista FAPERGS no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS). Orientadoras: Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues e Dra. Lúcia Allebrandt da Silva Ries. Projeto: “Seleção e Isolamento de Leveduras de Curtumes para Utilização na Produção de Biocombustíveis”.

Setembro 2015 – Dezembro 2015: Bolsista InICie no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS). Orientadora: Dra. Jane Marlei Boeira. Projeto: “Avaliação biológica para a qualidade da água de irrigação para produção agrícola em uma comunidade de Canoas, RS”.

Janeiro 2016 – Julho 2016: Bolsista FAPERGS no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS). Orientadora: Dra. Jane Marlei Boeira. Projeto: “Avaliação da capacidade antioxidante in vitro da toxicidade do extrato bruto da fruta do mamãozinho-do-mato (*Vasconcella quercifolia* A.ST.HILL)”.

Abril 2016 – Julho 2016: Estágio Curricular no Departamento de Química Analítica Ambiental da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Orientador: Dr. Marçal José Rodrigues Pires. Projeto: “Otimização de metodologia de análise de elementos traços em amostrar ambientais”.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2016: Menção Honrosa no 6º SIEPEX (Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão da UERGS), Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

VALANDRO, F.; SILVEIRA, T. R.; RIES, L. A.; RODRIGUES, R. S. B. Avaliação do crescimento e produção de lipídio de *chlorella spp.* sob diferentes concentrações de nitrogênio. In: 5º Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e a 1ª Jornada de Pós-Graduação da UERGS, 2015, Frederico Westphalen. Livro de Resumos 5º Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e a 1ª Jornada de Pós-Graduação da UERGS, 2015.

SILVEIRA, T. R.; **VALANDRO, F.;** RODRIGUES, R. S. B. Avaliação da eficiência de diferentes métodos de extração de lipídios de microalgas para produção de biodiesel. In: 5º Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e a 1ª Jornada de Pós-Graduação da UERGS, 2015, Frederico Westphalen. Livro de Resumos 5º Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e a 1ª Jornada de Pós-Graduação da UERGS, 2015.

VALANDRO, F.; RODRIGUES, R. S. B. Diferentes meios de cultivos para micro-algas. In: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2015, Porto Alegre. Livro de Resumos SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2015.

VALANDRO, F.; RODRIGUES, R. S. B. **Diferentes meios de cultivos para micro-algas.** In: Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Porto Alegre, 2015 (Apresentação de Trabalho).

VALANDRO, F.; BOEIRA, J. M. Avaliação fitoquímica e capacidade antioxidante do extrato

alcoólico das folhas do mamãozinho-do-mato (*vasconcella quercifolia* A.ST.HILL). In: Livro de Resumos 6º Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e a 2ª Jornada de Pós-Graduação da UERGS, 2016.

VALANDRO, F.; BOEIRA, J. M. Avaliação fitoquímica e capacidade antioxidante do extrato alcoólico das folhas do mamãozinho-do-mato (*vasconcella quercifolia* A.ST.HILL). In: 6º Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e a 2ª Jornada de Pós-Graduação da UERGS, 2016 (Apresentação de trabalho)

