



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

LÍGIA CRISTINE GONÇALVES PONTES

**Gene MebZIP de mandioca: caracterização da proteína deduzida e
avaliação do padrão de expressão gênica em condições de luminosidade**

**Belém, Pará
2018**

LÍGIA CRISTINE GONÇALVES PONTES

Gene MebZIP de mandioca: caracterização da proteína deduzida e avaliação do padrão de expressão gênica em condições de luminosidade

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado Agronomia para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra Cláudia Regina Batista de Souza

**Belém, Pará
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP)

Bibliotecas da Universidade Federal Rural da
Amazônia

Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P813g

Pontes, Lígia Cristine Gonçalves

Gene MebZIP de mandioca: caracterização da proteína deduzida e avaliação do padrão de expressão gênica em condições de luminosidade / Lígia Cristine Gonçalves Pontes. - 2019.
42 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Agronomia(PPGA), Campus universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Claudia Regina Batista de Souza

1. Mandioca. 2. Regulação transcricional. 3. Resposta à luminosidade. 4. Bzip. I. Souza, Claudia Regina Batista de , orient. II. Título

CDD 633.682

LÍGIA CRISTINE GONÇALVES PONTES

**Gene *MebZIP* de mandioca: caracterização da proteína deduzida
e avaliação do padrão de expressão gênica em condições de
luminosidade**

Defesa apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, para obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora

Cláudia R. B. de Souza

Profa. Dra. Cláudia Regina Batista de Souza-Orientadora
(UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ-UFPA)

Aline Medeiros Lima

Profa. Dra. Aline Medeiros Lima: 1º Examinador
(UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA)

Roberto Lisboa Cunha

Prof. Dr. Roberto Lisboa Cunha: 2º Examinador
(EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL)

Evonildo Costa Gonçalves

Prof. Dr. Evonildo Costa Gonçalves: 3º Examinador
(UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ-UFPA)

Profa. Dra. Elisa Ferreira Moura: Examinador suplente
(EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL)

BELÉM/PA
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por mais uma etapa de minha vida vencida, foram muitos dias e noites de choro e desespero, quase pra desistir, mas foi Ele quem me deu formas para continuar.

Obrigada a todos os órgãos responsáveis por esta conquista. À UFRA e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia por nos oferecer uma ótima qualidade de ensino e a todos os professores. Ao CNPq, CAPES e FAPESPA pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudo. À UFPA pela infraestrutura fornecida através do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas.

À professora Cláudia Regina Batista de Souza, pela paciência e atenção que me ofereceu para o término da minha pós graduação. Gratidão sempre por não permitir que meus anos de mestrado fossem perdidos. Obrigada.

À todos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UFPA, em especial à Daihany, Ângelo e Danyllo, que, mais que companheiros de trabalhos, foram amigos nessa curta e intensa jornada. Aos alunos e colegas da UFRA pela parceria e ajuda.

À minha família, Mãe e irmãos, que acompanharam de perto meu esforço, e aguentaram meu afastamento por esse período. Meu Pai, que eu perdi durante essa trajetória, foi um dos meus maiores apoiadores, desde o início. Saudades eternas do Sr, meu Pai. Ao Sr. dedico essa conquista.

Meu namorado, Sidney, que mais que isso, é um amigo, confidente, companheiro, parceiro e meu co Orientador particular, pois sempre me ajudou em meus trabalhos, desde a graduação. Obrigada pela sua companhia, sempre!

Obrigada a todos que fizeram parte dessa jornada, seja meus amigos da Pós, da graduação, da rua, da vida, de trabalho. Obrigada a todos por cada palavra de conforto, ajuda e força que vocês me deram. Todos são especiais para mim.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1-** Proteína reguladora do tipo bZIP interagindo com a molécula de DNA.....15
- FIGURA 2 -** Alinhamento da MebZIP com bZIPs de outras espécies.....18
- TABELA 1 -** Genes avaliados nos ensaios de RT-PCR semi-quantitativa de folhas de mandioca.....26
- FIGURA 3 -** Sequência do cDNA da MebZIP contendo sua ORF28
- TABELA 2 –** Proteínas do tipo bZIP depositadas no Genbank do NCBI29
- FIGURA 4 -** Alinhamento da MebZIP com proteínas bZIPs de outras espécies vegetais depositadas no Genbank30
- FIGURA 5 -** Amostras de RNA totais isoladas a partir de folhas de plantas de mandioca....31
- FIGURA 6 -** O gráfico refere-se a quantificação relativa dos genes MeCHS e MebZIP comparado com o controle interno, o gene tubulina (MeTUB)32

LISTA DE ABREVIACOES

bZIP – Básico Zíper de leucina

cDNA – DNA Complementar

CPRF – Common Plant Regulatory Factor

ORF - Open Reading Frame

pb - Pares de bases

RACE - Rapid Amplification of Complementary DNA Ends

RT-PCR – Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase

RESUMO

As proteínas da família bZIP (de Basic Leucine Zipper Domain, bZIP domain) são proteínas reguladoras que ocorrem em eucariotos e apresentam o domínio básico de ligação ao DNA, e o domínio de dimerização contendo os resíduos de leucina conservados, conhecido como zíper de leucina. Em plantas, as bZIPs atuam na regulação transcricional de genes envolvidos em diversos processos biológicos. Estudos prévios identificaram uma sequência parcial de cDNA codificando uma proteína bZIP, denominada MebZIP, contendo 334 resíduos de aminoácidos (aa) com expressão na raiz e folha da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). No presente trabalho, com o objetivo de complementar a identificação e caracterização da MebZIP, foram realizados ensaios de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) visando o isolamento da extremidade 3' desse cDNA. Análises de Bioinformática mostraram que o cDNA completo da MebZIP apresenta uma ORF (Open Reading Frame) de 1320 pb codificando uma proteína deduzida de 439 aa com massa molecular e ponto isoelétrico preditos de 47 kDa e 5.85, respectivamente. Análises comparativas com sequências do GenBank mostraram alta identidade da MebZIP com as proteínas CPRF-2 de *M. esculenta* (XP_021620722) e CPRF-2 de *Hevea brasiliensis* (XP_021650934), incluindo a presença de domínios conservados. Dados da literatura mostram que as proteínas CPRF-2 podem participar da regulação do gene da sintetase da chalcona (CHS) da via de síntese dos fenilpropanóides, cuja expressão pode ser influenciada pela exposição à luz. Desta forma, ensaios de RT-PCR semi-quantitativa foram realizados na avaliação da expressão dos genes MebZIP e MeCHS em folhas de plantas de mandioca submetidas a diferentes períodos de exposição a luz branca (0h, 3h, 6h, 9h, 12h e 15h). Os resultados mostraram um aumento de expressão do gene MebZIP na amostra com 6h, contudo não foi observada relação com a expressão do possível gene alvo da MebZIP, o gene MeCHS, o qual se manteve constante nas condições utilizadas neste estudo. Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que a MebZIP identificada aqui contém os domínios conservados (bZIP, D1-D4) que indicam a sua funcionalidade, enquadrando-a na família dos fatores de transcrição bZIP do tipo CPRF, com potencial função na resposta da mandioca à luminosidade.

Palavras chaves: bZIP, Mandioca, Regulação transcricional, Resposta à luminosidade

ABSTRACT

Proteins of bZIP family (from Basic Leucine Zipper Domain, bZIP domain) are regulatory proteins that occur in eukaryotes and exhibit a basic DNA-binding domain, and a dimerization domain containing conserved leucine residues, known as leucine zipper. In plants, bZIPs act on the transcriptional regulation of genes involved in various biological processes, including responses to biotic and abiotic factors. Previous studies have identified a partial cDNA sequence encoding a bZIP protein, named MebZIP, containing 334 amino acid residues (aa) with expression in the root and leaf cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Here, with the objective of complementing the identification and characterization of MebZIP, RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) assays were performed in order to isolate the 3' end of this cDNA. Bioinformatics analyzes showed that the MebZIP full-length cDNA has a 1320 bp Open Reading Frame (ORF) coding for a deduced protein with 439 aa with predicted molecular weight and isoelectric point of 47 kDa and 5.85, respectively. Comparative analyzes with GenBank sequences showed high identity of MebZIP with the *M. esculenta* CPRF-2 (XP_021620722) and *Hevea brasiliensis* CPRF-2 (XP_021650934) proteins, including the presence of conserved domains. Literature data show that CPRF-2 proteins may participate in the regulation of the chalcone synthase gene (CHS), whose expression may be influenced by exposure to light. Thus, semi-quantitative RT-PCR assays were performed to evaluate the expression of the MebZIP and MeCHS genes in cassava leaves submitted to different periods of exposure to white light (0h, 3h, 6h, 9h, 12h and 15h). Results showed an increased MebZIP expression level in the 6h sample, however, no relationship was detected with the expression levels of the potential target gene for the MebZIP, the MeCHS, which remained constant under the conditions used here. Based on our results, we can conclude that the MebZIP identified here contains conserved domains (bZIP, D1-D4) indicating its functionality as a member of bZIP CPRF family with potential role in the light response of cassava.

Keywords: bZIP, cassava, transcriptional regulation, light response.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	11
1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1.1. A cultura da mandioca.....	12
1.1.2. Regulação da expressão gênica.....	13
1.1.3. Fatores de transcrição	14
1.1.4. As proteínas bZIP e seu papel na regulação da expressão de genes em plantas.....	14
1.1.5. Proteína bZIP em mandioca.....	16
1.1.6. MeCHS- Enzima Sintetase da chalcona em mandioca.....	18
2 . CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA REGULADORA DO TIPO BZIP DE MANDIOCA (Manihot esculenta Crantz).....	21
2.1 Introdução	21
2.2 Material e Métodos.....	23
2.2.1. Obtenção da extremidade 3' do cDNA da MebZIP via RACE.....	23
2.2.2. Análises de Bioinformática.....	23
2.2.3. Material vegetal e tratamento com luminosidade.....	23
2.2.4. Extração de RNA a partir de folhas.....	24
2.2.5. Eletroforese em gel de agarose com formaldeído.....	25
2.2.6. Tratamento com DNase I.....	25
2.2.7. RT- PCR Semi-quantitativa	26
2.2.7.1 Reação de Transcrição Reversa (Síntese de cDNA).....	26
2.2.7.2. Amplificação da sequência de gene constitutivo Tubulina.....	26
2.2.7.3. Condições de amplificação para os genes MebZIP e MeCHS.....	27
2.3. Resultados.....	27
2.3.1. Síntese da extremidade 3' e obtenção da ORF completa da MebZIP.....	27
2.3.2. Predição do peso molecular e ponto isoelétrico da MebZIP.....	28
2.3.3. Comparação da MebZIP com sequências do GenBank.....	28

2.3.4. Obtenção das amostras de RNA total de folha de mandioca.....	31
2.3.5. Análise da expressão de genes MebZIP e MeCHS.....	31
2.4. Discussão.....	32
2.5. Conclusões.....	36
REFERÊNCIAS.....	36

1. Contextualização

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta nativa da América do Sul, sendo considerada uma das culturas alimentares mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, esta cultura é mais popular na região norte, onde apresenta relevante importância socioeconômica. Esta espécie vegetal é conhecida por apresentar grande tolerância às condições ambientais adversas. Apesar disto, estudos com plantas de mandioca ainda são bastante recentes e escassos em comparação com outras culturas como as de milho, trigo e arroz.

Um dos fatores ambientais mais importantes para o desenvolvimento das plantas é a luminosidade, pois exerce grande influência na expressão gênica, que por sua vez é mediada por fatores de transcrição que aumentam em resposta à luminosidade. Neste contexto, a luz branca está sendo usada recentemente para pesquisas sobre a função de genes que atuam como reguladores sobre tais condições ambientais (JENKINS, et al., 2001; CHEN et al., 2013).

Dentre os fatores de transcrição mais estudados estão as proteínas da família bZIP, caracterizadas por apresentarem identificação com as regiões conservadas A-box, C-box e G-box, onde, esta última, já se tem conhecimento que é a região promotora do gene da sintetase da chalcona (CHS), envolvida na resposta à luminosidade (DIXON et al., 1994; FOSTER et al., 1994; SHEN, 2007). Portanto o gene da CHS tem sua expressão regulada pela exposição à luz, atuando na regulação da biossíntese de fenilpropanóides (DAO et al., 2011; HAHLBROCK e SCHEEL, 1989). Portanto, além das bZIPs participarem da regulação de resposta em plantas a diversos fatores ambientais, incluindo na resposta a estresses bióticos (LIMA et al., 2017; LIU et al., 2017) e abióticos (NAKASHIMA et al., 2014; Todaka et al., 2015; Julkowska, et al., 2015), evidências também indicam que as bZIPs atuam em resposta à luminosidade (WEISSHAAR et al., 1991; ARMSTRONG et al., 1992; AN et al., 2017)

Em mandioca, foram identificados 77 MebZIPs e os níveis de expressão de alguns desses MebZIPs foram avaliados em resposta a estresses abióticos (HU et al., 2016). Cardoso (2008), caracterizou em mandioca uma sequência parcial da MebZIP e esta proteína se identificou similar às proteínas bZIPs do tipo CPRF-2, que reconhece elementos do G-box, que é promotor da Sintetase da chalcona, sendo reconhecida, assim, como uma proteína bZIP reguladora de luz (DRÖGE-LASER et al., 1997).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral caracterizar uma proteína reguladora da expressão gênica da mandioca, denominada MebZIP. A caracterização dessa proteína incluiu a identificação de domínios conservados em sua sequência de aminoácidos, bem como a avaliação dos níveis de expressão do gene MebZIP em plantas de mandioca submetidas a diferentes condições de luminosidade.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. A Cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, com vegetação arbustiva e raiz tuberosa pertencente a classe das Eudicotiledôneas, ordem Malpighiales e família Euphobiaceae. Muito conhecida e consumida no Brasil, a mandioca também é popularmente conhecida como Macaxeira e aipim. Como alimento podem ser consumidas as folhas da mandioca na forma de Maniva, utilizada na região norte para ser feita a maniçoba, e as raízes, para ser feita a farinha, tapioca, tucupí e outras formas de consumo (Cordeiro et al., 2017).

A mandioca é uma planta nativa da América do Sul e alcançou a África e Ásia nos séculos XVI e XVII, respectivamente, tornando-se uma das mais importantes culturas alimentares nas regiões tropicais e subtropicais (ZHANG, 2000; DE SOUZA et al., 2002). Hoje a mandioca é cultivada em mais de 100 países, tornando-se uma das principais fontes de carboidratos, sendo um importante alimento para pessoas de baixa renda (ZHANG, 2000). Estima-se que a mandioca é consumida por cerca de 600 milhões de pessoas diariamente na África, Ásia e América Latina (BAGUMA, 2004).

O maior teor de proteínas da mandioca está concentrado nas folhas, utilizadas como fonte de alimento para animais e como matéria prima para a agroindústria e o etanol (MATTOS e CARDOSO, 2003; LARA et al., 2008; ANDRÉ e SANTOS, 2012). Como fonte de calorias a mandioca ocupa a quarta posição, logo após o arroz, milho e cana-de-açúcar (PUONTI-KAERLAS, 1998; BAGUMA, 2004).

O Brasil é um dos maiores produtores de mandioca e também o maior consumidor deste produto agrícola (ALVES FILHO et al., 2015). Na Amazônia, a mandioca destaca-se como o principal produto da agricultura familiar, desempenhando um papel social importante devido um significativo número de famílias do meio rural que vive da produção e

do processamento da farinha e de outros produtos derivados da mandioca (SILVA et al., 2006).

De acordo com os levantamentos do IBGE em 2018, mais de 1 milhão de hectares de área foram usadas para plantação de mandioca, sendo 474 mil hectares foram na região Norte. Assim, no Brasil foram obtidas quase 1,9 milhões de toneladas neste mesmo período. A região norte é a maior produtora de mandioca, apresentando 7,2 milhões de toneladas produzidas desta cultura (IBGE, 2018).

No Brasil, há uma ampla variabilidade genética de mandioca presente em coleções de trabalhos e bancos ativos de germoplasma distribuídos em todo o país, com variedades selecionadas naturalmente ou por agricultores (FUKUDA et al., 1996; VIEIRA et al., 2007). Apesar da sua importância, pesquisas com a mandioca são bastante recentes em comparação com outras culturas, como o arroz, milho, trigo e algodão. Entretanto, já se tem conhecimento da alta tolerância da cultura de mandioca à seca e ao ambiente de baixa fertilidade.

Adaptações de plantas a diferentes condições ambientais envolvem amplas alterações fisiológicas e bioquímicas, que são resultados da expressão diferencial de genes para a síntese de proteínas envolvidas em diversas rotas metabólicas. Grande parte das proteínas conhecidas possuem seus papéis identificados, ou pelo menos parte deles na fisiologia das plantas. Isto proporciona maior conhecimento sobre as alterações fisiológicas. Nesse contexto, estudos de regulação da expressão gênica, de identificação de proteínas e seus papéis, bem como sua importância para a maquinaria molecular envolvida na fisiologia de plantas é fundamental para entender mecanismos adaptativos que possibilitam o desenvolvimento e sobrevivência de diferentes espécies vegetais.

1.1.2. Regulação da expressão gênica

A regulação da expressão gênica ocorre tanto em procariotos como em eucariotos. Em eucariotos a forma de regulação pode ser feita a nível transcricional, traducional, ou na ativação da proteína já sintetizada (pós-traducional) (ALBERTS et al., 2016).

A expressão gênica ocorre com o auxílio de diversas proteínas acessórias ou fatores de transcrição basais e especiais, que regulam a transcrição a partir da região promotora de um gene. Esses fatores de transcrição também se ligam a sequências denominadas de acentuadores (ou enhancers), localizados próximos ao gene. A interação entre os fatores de transcrição basais, especiais e a enzima RNA polimerase regula a atividade transcricional

dos genes pelo aumento, diminuição, ou repressão da síntese de transcritos primários. Assim, a expressão gênica ocorre de forma controlada, influenciada por estímulos ambientais ou sinais biológicos. Em organismos eucariotos a regulação da expressão gênica também ocorre a nível espacial, de forma tecido-específica. Portanto, enquanto diversos genes são expressos continuamente (constitutivos), outros têm sua expressão controlada de acordo com as necessidades do organismo (induzíveis).

A regulação gênica em plantas é essencial para sua sobrevivência nas diversas condições ambientais. Como organismos sesséis, as plantas precisam adequar respostas às condições ambientais que se apresentam em constantes mudanças. Algumas condições como seca, calor, salinidade, frio e ataques de patógenos ou pragas alteram o crescimento e o desenvolvimento das plantas por meio de alterações metabólicas, modificações na morfologia ou mudanças na história de vida (KAAK et al., 2017, LIMA et al., 2018). As plantas são organismos autotróficos, ou seja, a luz é sua principal fonte de energia, sendo, também, um importante fator de estresse ambiental (STRANCE et al., 2010).

1.1.3. Fatores de transcrição

Fatores de transcrição (FTs) são proteínas que auxiliam na ativação ou repressão de genes específicos, ligando-se ao DNA em regiões conservadas próximo aos genes que estão relacionados. Eles atuam de forma tecido específicas em eucariotos, portanto diferentes tipos celulares podem ser capazes de produzir diferentes tipos de FTs. Para que a expressão de um gene ocorra, é necessária uma sequencia promotora para direcionar a ativação da síntese do transcrito. Esses promotores são sequências nucleotídicas que apresentam elementos conservados, muitas vezes encontrados entre o TATA Box e o CAAT Box. Esses elementos podem promover a ativação ou repressão gênica a nível transcricional, fazendo com que os genes sejam expressos em determinados tipos de tecidos.

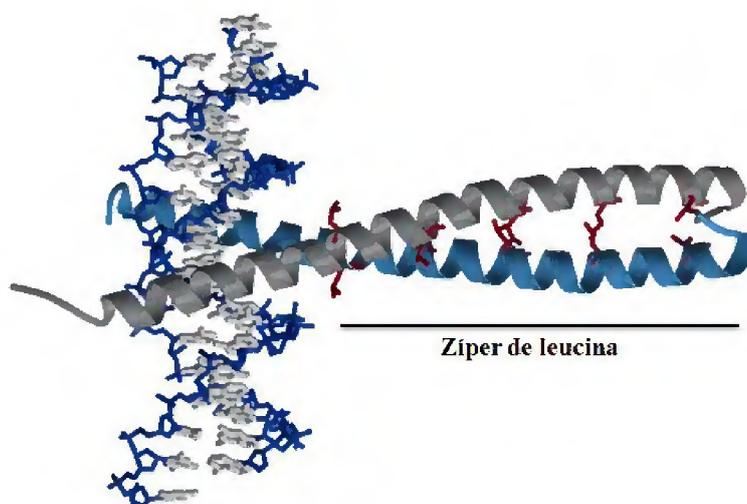
Os fatores de transcrição podem ser agrupados em diferentes classes, ou famílias, os quais apresentam motivos estruturais características que são as: zinc finger, hélice-giro-hélice, bHLH e zíper de leucina (bZIP – Basic-leucine zipper).

1.1.4. As proteínas bZIP e seu papel na regulação da expressão de genes em plantas

Dentre estas famílias de fatores de transcrição, as bZIPs compreendem uma das maiores e mais conservadas famílias, e contém duas regiões funcionais: uma região básica e

um zíper de leucina (WEI et al., 2012; LIU et al., 2015; ALAGARASAN et al., 2017). A primeira região, denominada região básica, é conservada e apresenta cerca de 18 resíduos de aminoácidos básicos, sendo responsável pela localização nuclear e pela ligação ao DNA. A região seguinte é onde se encontra o zíper de leucina, que se encontra adjacente ao domínio básico e consiste em várias repetições de leucina a cada sete aminoácidos ou outros aminoácidos hidrofóbicos, e está envolvida no reconhecimento e dimerização de bZIPs (Figura 1), promovendo a dimerização de homodímeros, quando ocorre entre subunidades idênticas, ou heterodímeros, quando ocorre entre subunidades diferentes (ALVES et al., 2013; LIU et al., 2017). Ocorrendo a interação dos dois zíperes, as regiões carregadas vão em sentidos opostos, formando uma superfície ideal para a ligação ao DNA, que apresenta uma carga negativa.

Figura 1. Proteína reguladora do tipo bZIP interagindo com a molécula de DNA por meio do domínio básico, enquanto o zíper de leucinas possibilita a dimerização



. Fonte: NELSON e COX. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5 ed. (2011).

As proteínas do tipo bZIP são exclusivas de eucariontes e se ligam ao DNA a partir de sequências conservadas contendo o núcleo ACGT, presentes nos elementos em cis na região promotora do gene regulado, tais como G-box (CACGTG), C-box (GACGTC) e A-box (TACGTA), com os quais possuem bastante afinidade (FOSTER et al., 1994; SHEN et al., 2007). Além dos domínios conservados identificados anteriormente, são encontrados também outros domínios tais como os domínios D1, D2 e D3, localizados na região N-terminal de algumas proteínas bZIP em Arabidopsis, arroz e outras espécies vegetais, entretanto suas funções ainda não são conhecidas (SHEN et al., 2007). Os fatores de transcrição G/HBF-1 e SBZ1 de soja, CPRF-2 de salsa e BZI-1 de fumo, por outro lado,

possuem quatro domínios conservados (D1- D4) (DRÖGE-LASER et al., 1997; YOSHIDA et al., 2008), distintos dos domínios anteriormente citados em *Arabidopsis*. Cada domínio está relacionado a uma importante função na proteína. O domínio D1 pode promover a interação intermolecular específica, enquanto o D2 é relativamente rico em resíduos ácidos e estudos indicam que seja necessário para ativação transcricional (DROGE-LASER et al., 1997; ZOU et al., 2008). O domínio D3 pode estar relacionado a afinidade de ligação ao DNA e o D4 não exibe nenhuma característica estrutural distintiva (DROGE-LASER et al., 1997).

Vários estudos mostram que os fatores de transcrição bZIP participam da regulação da expressão gênica em plantas, onde há evidências consideráveis que mostram que as bZIPs desempenham papéis cruciais em vários aspectos dos processos biológicos, incluindo maturação de sementes, embriogênese e maturação de órgãos, desenvolvimento de flor e vascular (WEI et al., 2012). Ainda segundo estes autores, as evidências crescentes também indicam que as bZIPs participam da regulação de resposta em plantas a estresses bióticos e abióticos.

Em estudos recentes, foram identificados genes pertencentes ao grupo A bZIPs que são confirmados para modular a transcrição de genes dependentes de ABA (Ácido abscísico) em resposta a estresses ambientais. Esses estudos foram feitos em *Arabidopsis*, os quais evidenciaram que, em resposta ao estresse abiótico ou sinalização de ABA, houve o acúmulo de bZIPs do grupo A, como a AtbZIP39, AtbZIP36, AtbZIP38, AtbZIP66, AtbZIP40, AtbZIP35 e AtbZIP37 (JAKOBY et al., 2002; NAKASHIMA et al., 2014). A exemplo disso, os fatores de transcrição ABF2/AREB1 sofrem fosforilação por SnRK2s do grupo 3, que compreende quinases fortemente induzidas por ABA, aumentando, assim, a resistência das plantas aos estresses por seca e sensibilidade ao ABA (NAKASHIMA et al., 2014; JULKOWSKA, et al., 2015).

Estudos com arroz também confirmaram a regulação positiva por algumas bZIPs, (OsbZIP23, OsbZIP46, OsbZIP71 e OsbZIP16) envolvidas com resistência ao estresse abiótico (TODAKA et al., 2015). Juntas, essas evidências indicam que as bZIPs são fatores de transcrição cruciais na resposta das plantas aos estresses abióticos (HU et al., 2016).

1.1.5. Proteínas bZIP em mandioca

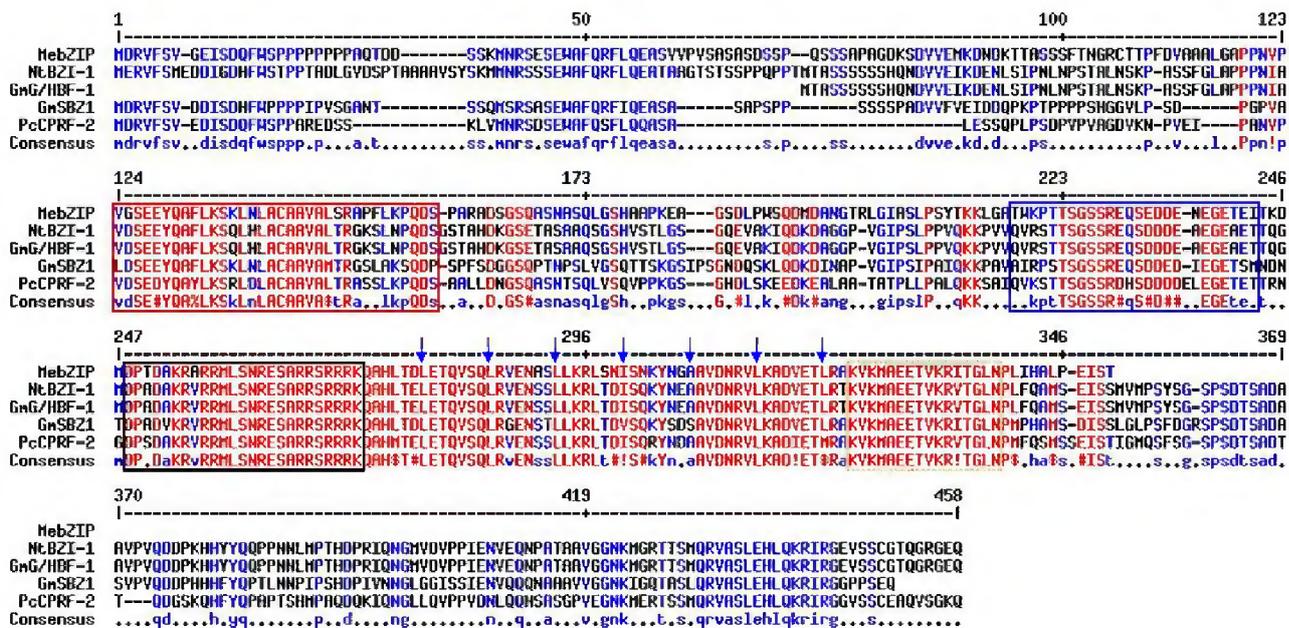
Estudos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar genes de bZIP envolvidas na tolerância da mandioca frente a estresses abióticos. Recentemente, Hu et al. (2016) avaliaram a

expressão de 77 bZIPs em respostas aos estresses abióticos e na sinalização ao ABA, mostrando que essas proteínas são promissoras no melhoramento genético desta espécie. Embora Hu et al. (2016) tenham identificado 77 MebZIPs em todo o genoma na mandioca, seu papel *in vivo* permanece desconhecido. Desta forma, Liu et al. (2017) realizaram a análise do padrão de expressão e função de dois genes MebZIPs (MebZIP3 e MebZIP5) em resposta à infecção por patógeno, destacando o papel positivo dessas duas bZIPs na resistência da mandioca contra a bacteriose.

A identificação e estudo destas moléculas como fatores de transcrição têm contribuído significativamente na elucidação de mecanismos de regulação da expressão gênica. Um típico fator de transcrição de planta contém, com poucas exceções, uma região de ligação ao DNA, um lugar de oligomerização, um domínio de regulação transcricional e um sinal de localização nuclear (LIU et al., 1999).

Com o objetivo de identificar proteínas do tipo bZIP em mandioca, de Souza et al. (2003) detectaram três proteínas diferencialmente expressas na raiz e imunologicamente relacionadas com a Opaco-2, uma proteína do tipo bZIP de milho. Posteriormente, Namias (2006) e Cardoso (2008) isolaram uma sequência de cDNA parcial que codifica para uma proteína bZIP de mandioca, denominada MebZIP, que correspondeu a uma sequência de 334 aminoácidos com alta similaridade com outras bZIPs, entre elas a G/HBF-1 de soja (*Glycine max*), a BZI-1 de fumo (*Nicotiana tabacum*) e a CPRF-2 de salsa (*Petroselinum crispum*), constituídas por um total de 439 aa. Na Figura 2, é mostrado o alinhamento da sequência parcial da MebZIP com sequências de bZIPs de outras espécies vegetais, incluindo a CPRF-2 de salsa.

Figura 2. Alinhamento da MebZIP de mandioca com bZIPs de outras espécies vegetais (NtBZI-1 de fumo, GmG/HBF-1 e GmSBZ1 de soja, PcCPRF-2 de salsa).



Fonte: Cardoso, 2008.

Em salsa, a proteína CPRF-2 reconhece elementos G-Box no promotor do gene da sintetase da chalcona (CHS), sendo uma proteína bZIP regulada pela luz (DRÖGE-LASER et al., 1997). Portanto, baseando-se na alta identidade da proteína MebZIP com a CPRF-2 de salsa, pode ser que a MebZIP seja uma proteína do tipo CPRF e desempenhe uma função similar na mandioca. Desta forma, se faz necessário estudar a expressão do gene MebZIP e do possível gene alvo a ser regulado pela MebZIP (o gene MeCHS) na planta da mandioca submetida a diferentes condições de luz, e dessa forma, poder atribuir uma possível função da MebZIP na regulação de genes em resposta à luminosidade.

1.1.6. MeCHS- Enzima Sintetase da chalcona em mandioca

A enzima sintetase da chalcona (CHS) participa da via biossintética dos fenilpropanóides, que estão envolvidos na resposta de plantas a diversos tipos de estresse. Estes compostos fornecem materiais iniciais para um conjunto diversificado de metabólitos que desempenham papéis diferentes e importantes como o fornecimento de pigmentos florais, antibióticos e repelentes de insetos. A síntese de CHS também pode ser induzida sob condições de estresses abióticos, como exposição a UV, além de ser importante no desenvolvimento de plantas (DAO et al., 2011; HAHLBROCK e SCHEEL, 1989).

A CHS tem papel importante na biossíntese de flavonóides, onde catalisa a primeira e principal etapa da regulação desta biossíntese, que envolve a condensação em etapas de três unidades acetílicas da malonil-coenzima A (CoA) com porção coumaroil da 4-coamiril-CoA derivada da via dos fenilpropanóides para formar o flavonóide C15 naringenina chalcona (HAHLBROCK e SCHEEL, 1989). Após a isomerização da naringenina chalcona, outras substituições levam à formação de flavona, flavonol, antocianina, isoflavona, e fitoalexina antimicrobiana.

Os flavonóides desempenham importante papel na defesa das plantas. Como a CHS é o guardião da biossíntese de flavonóides, são responsáveis pela regulação da via. A expressão do gene CHS é influenciada por muitos fatores ambientais e de estresse, como UV, sendo um gene constitutivo em flores, mas com a expressão regulada por fatores externos, resultando em aumento da produção de flavonoides (DIXON e PAIVA, 1995; GLAGEN et al., 1998; DAI et al., 2011). Os flavonoides absorvem a luz UV, sendo capazes de proteger a planta de danos que podem causar a exposição aos raios UV no DNA (LEYVA et al., 1995). Para reduzir as UV que atingem as macromoléculas suscetíveis, as plantas filtram parte desse espectro de luz solar por meio dos flavonóides depositados nos vacúolos das células epidérmicas. Para que isso ocorra, os flavonóides estão frequentemente presentes na camada celulares epidérmicas de folhas e tecidos que são suscetíveis a luz solar (STRANCE et al., 2010; HSIEH e HUANG, 2007).

O nível de expressão do gene CHS é relacionado ao nível de transcritos do CHS nas células das plantas. Para que a transcrição aconteça, deve haver a ligação da RNA polimerase II nas sequências de DNA específicas no promotor para a CHS próximo ao TATA Box, bem como ocorrer a ativação por proteínas específicas de ligação ao DNA, denominadas de fatores de transcrição, que se ligam a elementos de resposta para que seja iniciada a transcrição. O promotor da CHS apresenta o motivo regulador da sequência nucleotídica CACGTG, conhecido como G-Box, considerada uma região importante na resposta à luz, onde as bZIP's também apresentam afinidade (DIXON et al., 1994; FOSTER et al., 1994; SHEN, 2007). Esta proteína básica de zíper de leucina (bZIP), que se liga tanto à G-box quanto à H-box adjacente na região proximal do promotor de genes CHS15, é rapidamente fosforilada em células de soja elicitadas. Isto também acontece com o promotor CHS15, CHS7 e CHS1 (DOGE et al., 1997; YOSHIDA et al., 2008).

Em estudo recente, Lima et al. (2017) selecionaram genes de proteínas com potencial função de defesa da planta contra patógenos, onde avaliaram o padrão de expressão dos genes MebZIP e MeCHS, entre outros genes, durante a interação da mandioca com o

patógeno responsável pela doença podridão radicular, o *Phytophthium* sp. Dentre os genes com expressão aumentada durante esta interação, foram identificados o gene MeCHS da sintetase da chalcona e o gene MebZIP, evidenciando o envolvimento dos mesmos na resposta de defesa da mandioca contra o patógeno.

Outros trabalhos tem evidenciado a expressão do gene CHS em resposta a regulação pela luz. Verificou-se a produção fotoreguladora de flavonóides, relacionada com a transcrição de CHS (CHAPPELL e HAHLBROCK, 1984; FEINBAUM e AUSUBEL, 1988; VAN TUNEN et al., 1988; TAYLOR e BRIGGS, 1990). Em *Arabidopsis thaliana*, Feinbaum et al. (1991) identificaram que a luz de alta intensidade regulam a expressão de genes da CHS. Ao aumentar a exposição de luz UV-A por 24 h em hipocótilos de nabo vermelho, houve expressão aumentada dos genes CHS e acúmulo de antocianinas (ZHOU et al., 2007).

2. CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DEDUZIDA E AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE

2.1. Introdução

Diversos fatores de transcrição atuam no controle da expressão gênica em eucariotos. Estes fatores de transcrição são classificados em famílias de acordo com suas especificidades. Dentre estas famílias, as bZIPs compreendem uma das maiores e mais conservadas. As bZIPs são constituídas por duas regiões funcionais: uma região básica e um zíper de leucina (WEI et al., 2012; LIU et al., 2015; ALAGARASAN et al., 2017). A primeira região, denominada região básica, é conservada e apresenta cerca de 18 resíduos de aminoácidos básicos, responsáveis pela localização nuclear e ligação ao DNA. A região seguinte é onde se encontra o zíper de leucina, localizada adjacente ao domínio básico, consistindo em várias repetições de leucina a cada sete aminoácidos ou outros aminoácidos hidrofóbicos. Esta região está envolvida no reconhecimento e dimerização das bZIPs (ALVES et al., 2013; LIU et al., 2017).

As proteínas do tipo bZIP são exclusivas de eucariontes e se ligam ao DNA a partir de sequências conservadas presentes nos elementos em cis na região promotora do gene regulado, tais como G-box (CACGTG), C-box (GACGTC) e A-box (TACGTA) (FOSTER et al., 1994; SHEN et al., 2007). Além dos domínios conservados identificados anteriormente, são encontrados também os domínios D1, D2 e D3, localizados na região N-terminal de algumas proteínas do tipo bZIP em *Arabidopsis*, arroz e outras espécies vegetais, com funções ainda desconhecidas (SHEN et al., 2007). Os fatores de transcrição G/HBF-1 e SBZ1 de soja, CPRF-2 de salsa e BZI-1 de fumo, por outro lado, possuem quatro domínios conservados (DRÖGE-LASER et al., 1997; YOSHIDA et al., 2008), distintos dos domínios anteriormente citados em *Arabidopsis*.

Os fatores de transcrição bZIP participam da regulação da expressão gênica, desempenhando papéis cruciais em vários aspectos dos processos biológicos em plantas (WEI et al., 2012). Estudos indicam que as bZIPs participam da regulação de resposta em plantas a diversos fatores ambientais, incluindo na resposta a estresses bióticos (LIMA et al., 2017; LIU et al., 2017) e abióticos (NAKASHIMA et al., 2014; TODAKA et al., 2015; JULKOWSKA et al., 2015). Evidências também indicam que as bZIPs atuam em resposta a luminosidade em salsa (WEISSHAAR et al., 1991; ARMSTRONG et al., 1992) e macieiras (AN et al., 2017), estando relacionada à ativação de genes. Dentre estes genes, está o gene da sintetase da chalcona (CHS), que atua na biossíntese de fenilpropanóides (HAHLBROCK

e SCHEEL, 1989). Para que a transcrição da CHS aconteça, deve ocorrer a ativação de proteínas específicas de ligação ao DNA. O promotor da CHS apresenta o motivo regulador da sequência nucleotídica CACGTG, conhecida como G-Box, que é considerada uma região importante na resposta à luz, onde as bZIP's apresentam afinidade (DIXON et al., 1994; FOSTER et al., 1994; SHEN, 2007; YOSHIDA et al., 2008).

A luminosidade é um fator ambiental de extrema importância ao metabolismo da planta, atuando como reguladora do seu crescimento e desenvolvimento (FUKUDA, 2019). Para que isso ocorra, a luz precisa ativar genes específicos a partir da ação de fatores de transcrição, culminando com alterações metabólicas envolvidas na biossíntese e acúmulo diferencial de fitormônios que apresentam diferentes efeitos no fenótipo da planta (GALLEMI et al., 2015; FUKUDA, 2019), e dentre os fatores de transcrição regulados pela luminosidade estão as bZIPs. Neste contexto, An et al. (2017) investigaram os níveis de expressão da bZIP MdHY5 em macieiras em respostas a luminosidade, observando o aumento dos níveis de MdHY5 em resposta à luz. Em outros estudos relevantes neste assunto foi observado que em salsa a regulação ocorre em dois níveis; enquanto apenas a proteína CPFR-2 é ativada por fosforilação na presença de luz, os níveis de transcritos da CPRF-1 também são aumentados (WEISSHAAR et al., 1991; ARMSTRONG et al., 1992; DRÖGE-LASER et al., 1997).

Apesar dos avanços na identificação de bZIPs em plantas, poucos estudos foram desenvolvidos na identificação e expressão de genes de MebZIPs de mandioca (SOUZA et al., 2003; HU et al., 2016; LIU et al., 2017), não tendo sido avaliada ainda sua relação com a luminosidade. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta nativa da América do Sul, sendo considerada uma das culturas alimentares mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais (ZHANG, 2000; DE SOUZA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2014). No entanto, apesar da importância desta espécie, pesquisas com mandioca ainda são recentes em comparação a outras culturas, tendo-se pouco conhecimento sobre seus mecanismos de resposta a fatores ambientais como a luminosidade.

Dessa forma, se faz necessário estudar a expressão do gene MebZIP e da sua possível relação com o controle da expressão de outros genes a exemplo do gene MeCHS em mandioca submetidas a diferentes condições de luz. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar o cDNA completo de uma bZIP de mandioca, denominada MebZIP, e caracterizar a sua sequência proteica deduzida, bem como avaliar o padrão de expressão do gene MebZIP e do seu suposto gene alvo, MeCHS, em resposta a exposição a luz.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Obtenção da extremidade 3' do cDNA da MebZIP via RACE

Experimentos de RACE 3' foram desenvolvidos utilizando-se uma amostra de RNA total de raiz de mandioca obtida por Cardoso (2008) e o SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, EUA), de acordo com as orientações do fornecedor.

Foram utilizados primers específicos para a sequência da MebZIP previamente obtida por Cardoso (2008), e após a síntese do cDNA 3', o fragmento de DNA amplificado foi clonado no vetor pGEMT Easy (Promega, EUA) e sequenciado com o Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

2.2.2. Análises de Bioinformática

Utilizando-se o Programa BioEdit (HALL, 1999) foi possível fazer a comparação da sequência 3' com a sequência previamente identificada por Cardoso (2008), bem como fazer a montagem da sequência total do cDNA e a identificação da ORF da MebZIP. Esta foi avaliada através de análise comparativa em banco de dados utilizando-se o programa BLAST-X (ALTSCHUL et al., 1997) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). O peso molecular e o ponto isoelétrico da proteína MebZIP deduzida foram preditos utilizando-se o ExPASy Proteomics Server (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html). O alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos dos genes, bem como a identificação dos domínios foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALW (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html) utilizando os parâmetros padrões. A sequência de cDNA da MebZIP foi registrada no Genbank do NCBI.

2.2.3. Material vegetal e tratamento com luminosidade

A planta de mandioca (cultivar IAC 12-829) foi obtida através do plantio de manivas fornecidas pelo Dr. Luiz J.C.B. Carvalho, da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). Inicialmente a planta de mandioca com três meses de idade foi mantida no escuro por três dias, e em seguida submetidas a exposição à luz branca pelos tempos de 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h e 15 h, de acordo com An et al. (2017), com aumento de mais um período (15h), na temperatura ambiente média de 20°C, mantidas sob luz branca constante durante todo o período da coleta. O tempo de 0h foi utilizado como controle, sendo a coleta das

folhas feita depois dos três dias no escuro e antes da exposição à luz, com o auxílio de uma lanterna, sem deixar a luz chegar à folha que foi coletada. Os demais tempos, na presença da luz, foram contabilizados a partir desta primeira coleta. As folhas coletadas foram utilizadas na extração do RNA total e ensaios de RT-PCR semi-quantitativa.

2.2.4. Extração de RNA a partir de folhas

Para extração de RNA total de folhas de mandioca, foi utilizada a metodologia descrita por Chang et al. (1993). Amostras contendo cerca de 1 g de tecido foram maceradas em cadinho com o auxílio do pistilo e nitrogênio líquido. O material foi transferido para um tubo de centrifugação (50 mL), no qual foram adicionados 15 mL de tampão de extração CTAB 2% (brometo de cetil-trimetilamônio); 2% polivinil-pirrolidona (PVP 40); 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA e 2M NaCl pré-aquecido a 65°C, e 400 µL (2,67%) de 2-ME (β -Mercaptoetanol). A suspensão foi homogeneizada através de vigorosa agitação no vórtex por 10 minutos e em seguida levada para incubação durante 15 minutos a 65°C. Ao extrato foram adicionados 15 mL de clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, respectivamente). Então a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 30 minutos a 20°C e a fase superior transferida para um novo tubo de centrifugação (50 mL), ao qual foram adicionados mais 15 mL de clorofil, seguida de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação foram retirados 12 mL da fase superior, nos quais foram adicionados 3 mL (1/4) de cloreto de lítio 10 M para precipitação diferencial do RNA, durante a noite toda, através de incubação em gelo.

O material foi centrifugado a 8.500 rpm por 50 minutos a 4°C e em seguida o precipitado foi ressuspensionado em 700 µL de SSTE (1M NaCl; 0,5% SDS; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA) e posteriormente incubado a 60°C por 5 minutos para completa ressuspensão. Na amostra foram adicionados 500 µL de clorofil, seguida de centrifugação em temperatura ambiente a 12.000 rpm por 20 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto, seguida de incubação a -20°C, durante toda a noite.

Após a incubação, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% para retirada do sal, e em seguida o sedimento foi seco à temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, o RNA foi ressuspensionado com água ultra pura livre de RNase.

Após a extração, as amostras de RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (como descrito abaixo) e quantificadas por fluorimetria utilizando o fluorímetro QUBIT (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante.

2.2.5. Eletroforese em gel de agarose com formaldeído

O gel para a análise do RNA foi preparado com uma mistura de 1,33 g de agarose e 43 mL de água, a qual foi autoclavada por 20 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 5 mL de MOPS 10X (10.3 g de MOPS, 2.7 g de Acetato de Sódio e 0.9 g de EDTA, para 250 mL final e pH: 7.0) e 2,6 mL de formaldeído (37%). À amostra de RNA (3 µL: 5 µg), adicionou-se 2,06 µL de formaldeído (37%) e 0,56 µL de tampão MOPS 10X, onde esta foi aquecida a 55°C por 15 minutos, centrifugada rapidamente e incubada no gelo. Antes da aplicação da amostra no gel, foram adicionados 5 µL de tampão de amostra (10 mg/mL de azul de bromofenol e 30% de glicerol) e 1 µL de brometo de etídio (10 mg/mL). Na cuba de eletroforese utilizou-se o tampão MOPS 1X.

2.2.6. Tratamento com DNase I

No tratamento das amostras de RNA com DNase foi utilizada a DNase I (Invitrogen, USA) seguindo as orientações do fabricante. Em um tubo de micro-centrifugação (1,5 mL) foram adicionados 5 µg de RNA total, 5 µL de tampão (10X), 37 µL de água livre de RNase e 5 µL de DNase (1 U/µL), somando um volume final de 50 µL. Em seguida a amostra foi incubada a 20°C por 10 minutos, e imediatamente após a incubação foram adicionados 5 µL de EDTA (25 mM), seguida de incubação a 65°C por 10 minutos para inativar a ação da enzima DNase I. Em seguida foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3 M, e 2,5 volumes de etanol absoluto, seguida de incubação a - 20°C durante toda a noite. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C, e em seguida foi descartado o sobrenadante, e o sedimento foi seco à temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, o sedimento foi ressuspensionado em um volume final de 12 µL com água ultra pura livre de RNase.

2.2.7. RT- PCR Semi-quantitativa

Os ensaios de RT-PCR semi-quantitativa foram realizados de acordo com o descrito por Cardoso (2008) e Costa et al. (2011), utilizando-se o gene da Tubulina (MeTUB) como controle constitutivo.

2.2.7.1. Reação de Transcrição Reversa (Síntese de cDNA)

Na reação de transcrição reversa foi utilizada a enzima Transcriptase reversa (Fermentas, USA), seguindo as orientações do fabricante. A reação de síntese das moléculas de cDNA foi constituída por 12 µL de RNA tratado com DNase I e 1 µL de iniciador Oligo dT (0,5 µg/µL), que hibridiza com a cauda poli-A, os quais foram aquecidos a 65°C por 5 minutos, seguida de incubação no gelo por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de tampão 5X para transcriptase reversa, 2 µL de dNTPs (10 mM), totalizando um volume de 19 µL. O material foi incubado a 37°C por 5 minutos, e em seguida foi adicionado 1 µL da enzima TR - Transcriptase Reversa (200 U/µL), seguida de incubação a 42°C por 1,5 hora. Depois foi incubado a 70°C por 10 minutos para desativar a enzima transcriptase reversa.

Por último, os cDNAs sintetizados foram quantificados no fluorímetro QUBIT (Invitrogen, USA), seguindo as orientações do fabricante.

2.2.7.2 Amplificação da seqüência do gene constitutivo Tubulina

Para amplificação do gene constitutivo através de PCR foi utilizada uma amostra de 100 ng de cDNA com os iniciadores do gene MeTUB (MeTub-F e MeTub-R) (Tabela 1). As seguintes condições no termociclador foram utilizadas: 94°C por 5 minutos e 28 ciclos com 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos. (CARDOSO, 2008; COSTA, et al., 2011; LIMA, 2017).

Tabela1. Genes avaliados nos ensaios de RT-PCR semi-quantitativa de folhas de mandioca, com as sequencias dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado e a referência bibliográfica.

Gene	Nome do iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Referência
MeTUB	MeTub-F	ATCCTTCTCAAGGGCAGCAAGAT	370	Costa et al., 2011
	MeTub-R	ACATGGAAAGTACATGGCCTGCTG		

MebZIP	MebZIP-F2	GAATTGCTTTCAAATAGAGAGTCAGCTA	396	Cardoso, 2008
	BZ14	GACG CGGACATAGGGTTATTTGGAGGCTGAT		
MeCHS	MeCHS-F1	TACTACTTTTCGGATCACCAATAGTGAGC	455	Lima et al., 2018
	MeCHS-R1	ACA GAGCACACAACAAGAACACGAGCACC		

2.2.7.3 Condições de amplificação para os genes MebZIP e MeCHS

Para a amplificação dos genes de interesse foram utilizados os iniciadores do gene MebZIP (MebZIP-F2 e BZ14) e do gene MeCHS (MeCHS-F1 e MeCHS-R1) (Tabela 1). As condições da PCR foram as mesmas descritas acima para o gene MeTUB, estando de acordo com o padronizado por Costa et al. (2011), Cardoso (2008) e Lima (2017), para a amplificação dos genes de interesse na fase exponencial.

Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, sendo as bandas comparadas visualmente e avaliadas pelo Programa Image J (Instituto Nacional da Saúde, EUA), como descrito por Reis et al. (2012). Em seguida foi realizada a análise de variância dos dados quantificados e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade 1% utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997).

2.3. Resultados

2.3.1. Síntese da extremidade 3' e obtenção da ORF completa da MebZIP

Como resultado do RACE 3' foi amplificada a sequência correspondente a extremidade 3' do cDNA da MebZIP. Após a montagem da sequência total, por meio da junção da extremidade 5' previamente isolada por Cardoso (2008), obteve-se o cDNA completo que contém uma ORF de 1320 pb codificando uma proteína de 439 aa (Figura 3), ou seja, com 105 aa adicionais na extremidade carboxi-terminal.

Figura 3. Sequência do cDNA da MebZIP contendo uma ORF de 1320 pb codificando uma proteína com 439 aa. Esta sequência foi registrada no GenBank do NCBI.

```

1   atggacagggctcttctcagtcggggaaatctcagaccagttcttggtcaccgctccgccc 60
   M D R V F S V G E I S D Q F W S P P P P
61   cctcctcctcctgctcaaacgacgattcctctaagatgaaccggagcgaatctgaatgg 120
   P P P P A Q T D D S S K M N R S E S E W
121  gccttcagcgcgtttctccaagaggcttctgttgctcctgtttctgcttcagcctctgac 180
   A F Q R F L Q E A S V V P V S A S A S D
181  tcctcgccgcagctcttctcagctcctgctggtgggacaagagtgcgctcgttgagatgaag 240
   S S P Q S S S A P A G D K S D V V E M K
241  gacaatgataaaaacgactgcttcctcctcttaccatggggcgatgtaccagcgcgttt 300
   D N D K T T A S S S F T N G R C T T P F
301  gatgtagctgcggtctcggcgtcctccgaatgttccgggtgggttccgaggagtaccag 360
   D V A A A L G A P P N V P V G S E E Y Q
361  gcgtttttgaaaagtaaacctcaatttggcttgcgcgcgcgttgcctgtcccgggcacct 420
   A F L K S K L N L A C A A V A L S R A P
421  tttctgaaacctcaagattctcctgctagagctgacagtggtacacaggcttcaaatgct 480
   F L K P Q D S P A R A D S G S Q A S N A
481  tcacaattaggatctcatgctgctcctaaagaggctggaagtgacttaccctggtcacaa 540
   S Q L G S H A A P K E A G S D L P W S Q
541  gatatggatgccaatgggccagttggaatgcctctttacctagcacacaaaagaaattf 600
   D M D A N G P V G I A S L P S T Q K K F
601  ggagctactttgaaagcaacaagtggtatcaagagaacagtcagagatgatgaa 660
   G A T L K P T T S G S S R E Q S E D D E
661  aatgaaggagaaactgaaataaccaaggatattggacctactgatgcaaaacgagcaagg 720
   N E G E T E I T K D M D P T D A K R A R
721  agaatgctttcaaatagagagctcagctagacgatctagacgaagaaaacaggcccatttg 780
   R M L S N R E S A R R S R R R K Q A H L
781  accgatcttgagacacaggtttctcaattgagagttgaaaatgcttctctattaaagcgt 840
   T D L E T Q V S Q L R V E N A S L L K R
841  ctgtctaacataagcaataagtacaatggggcagctggtgataacagagttttaaagct 900
   L S N I S N K Y N G A A V D N R V L K A
901  gatggtgaaacattgagagcaaaaggtgaagatggctgaggagacagtcaaaaggattacc 960
   D V E T L R A K V K M A E E T V K R I T
961  ggattgaaatcctttaatccatgccttgctgagatattctacaataagcatgtcatcattt 1020
   G L N P L I H A L P E I S T I S M S S F
1021 gatggaagcccttctgatacatcaacagatgctgctggttcccgtaaatgaggatccaaat 1080
   D G S P S D T S T D A A V P V N E D P N
1081 catcacttttatcagcctccaaataaccctatgtccggttcatgagtcagagtcataaat 1140
   H H F Y Q P P N N P M S V H E S R V N N
1141 gctttggcagacatctcttcagttgaaaacttgcagccacattctggagcagcgggacta 1200
   A L A D I S S V E N L Q P H S G A A G L
1201 gcagggaaacatgaaaggacgaacagcttcttgcagcagtagctagtttggagcattta 1260
   A G N M K G R T A S L Q R V A S L E H L
1261 cagaaacagatccgcaggggtataactccagggcctcagtccaatggggagcagatataa 1320
   Q K Q I R R G I T P G P Q S N G E Q I -

```

Fonte: A autora.

2.3.2. Predição do peso molecular e ponto isoelétrico da MebZIP

De acordo com a predição no servidor ExPASy, a MebZIP apresenta um peso molecular de 47 kDa e um ponto isoelétrico de 5.85, caracterizando uma proteína ácida.

2.3.3. Comparação da MebZIP com sequências do GenBank

A análise comparativa da MebZIP com as sequências depositadas no Genbank mostrou valores de identidade que variaram de 99% com a CPRF-2 de mandioca (Acesso

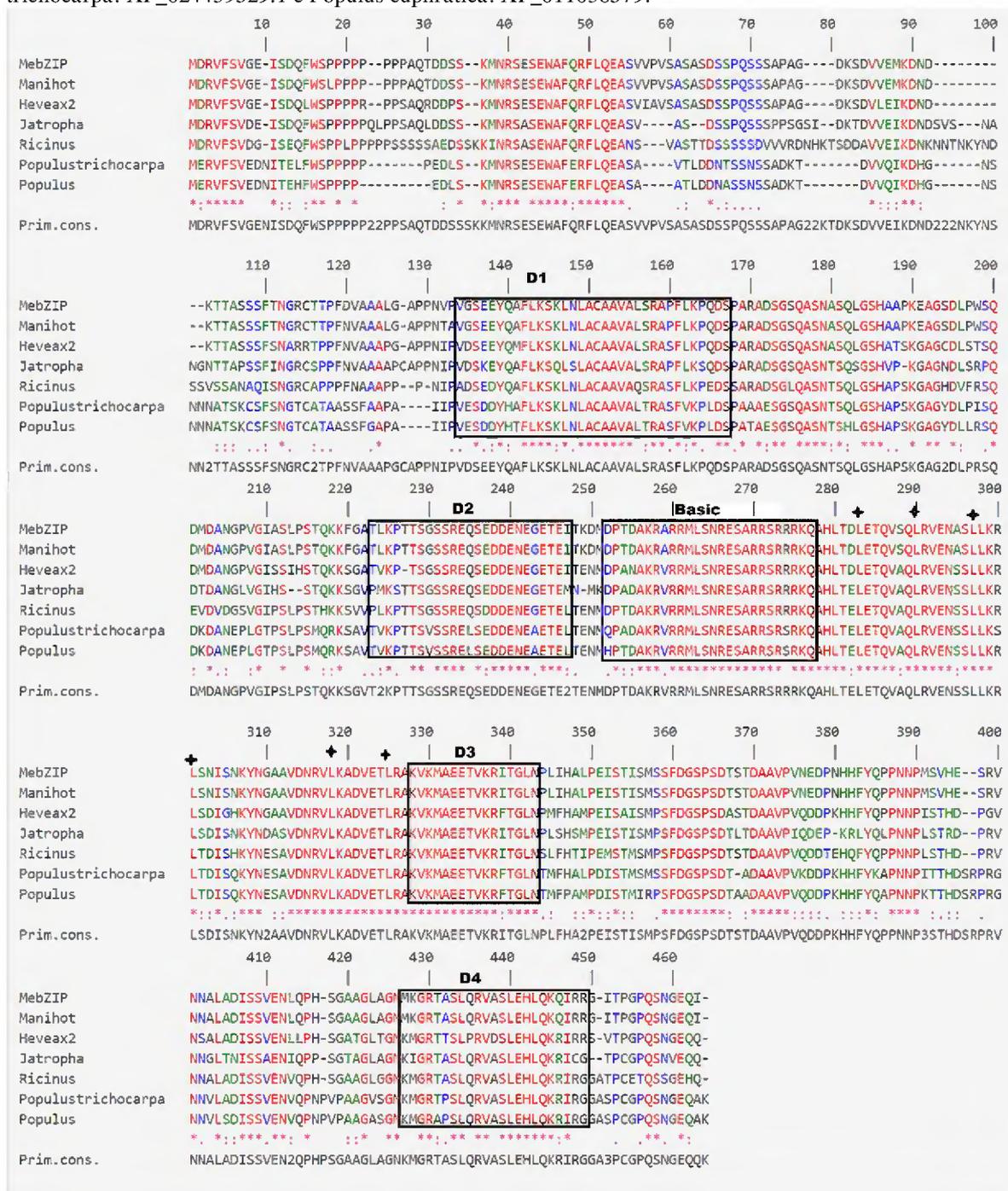
XP_021620722) a 66% com a CPRF-2 de *P. euphratica* (Acesso XP_011038579) (Tabela 2).

Tabela 2. Proteínas do tipo bZIP depositadas no Genbank com as quais a MebZIP apresentou alta identidade de acordo com as análises comparativas utilizando-se o BLAST do NCBI.

Acesso no Genbank	Organismo	Identidade (%)	E-value
XP_021620722	<i>Manihot esculenta</i>	99	0.0
XP_021650934	<i>Hevea brasiliensis</i>	84	0.0
XP_012089255	<i>Jatropha curcas</i>	74	0.0
XP_002531296	<i>Ricinus communis</i>	70	0.0
XP_024439529.1	<i>Populus trichocarpa</i>	67	0.0
XP_011038579	<i>Populus euphratica</i>	66	6e-177

Na Figura 4 é mostrado o alinhamento entre a MebZIP e algumas proteínas homólogas, evidenciando a presença dos domínios conservados característicos dessas bZIPs. O comprimento do alinhamento foi de 464 aminoácidos, os quais 214 aminoácidos mostraram identidade entre todos os acessos, destacados na imagem pela cor vermelha. Apresentados na cor verde são 74 aminoácidos que foram fortemente semelhantes e 43 aminoácidos apresentaram fraca similaridade, apresentados na cor azul. Na cor preta são os aminoácidos diferentes entre os acessos, totalizando 133 aminoácidos. Podem ser identificados também os domínios conservados das proteínas, entre eles os domínios básico e o zíper de leucinas, que são domínios característicos das proteínas do tipo bZIPs.

Figura 4. Alinhamento da MebZIP com proteínas bZIPs de outras espécies vegetais depositadas no Genbank, destacando-se os domínios conservados das proteínas bZIP. (Manihot esculenta: XP_021620722, Hevea brasiliensis: XP_021650934, Jatropha curcas: XP_01208925, Ricinus communis: XP_002531296, Populus trichocarpa: XP_024439529.1 e Populus euphratica: XP_011038579.

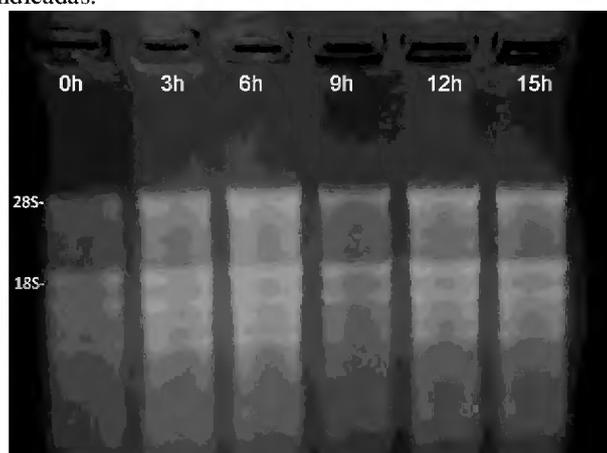


Fonte: A autora

2.3.4. Obtenção das amostras de RNA totais de folhas de mandioca

Após as extrações do RNA total de folhas de mandioca, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante com formaldeído (Figura 5), mostrando qualidade satisfatória evidenciada pelo padrão de bandas dos RNAs ribossômicos 18S e 28S.

Figura 5. Amostras de RNA totais isoladas a partir de folhas de plantas de mandioca submetidas a diferentes tempos de exposição à luz branca artificial (0, 3, 6, 9, 12 e 15 h), com as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S indicadas.

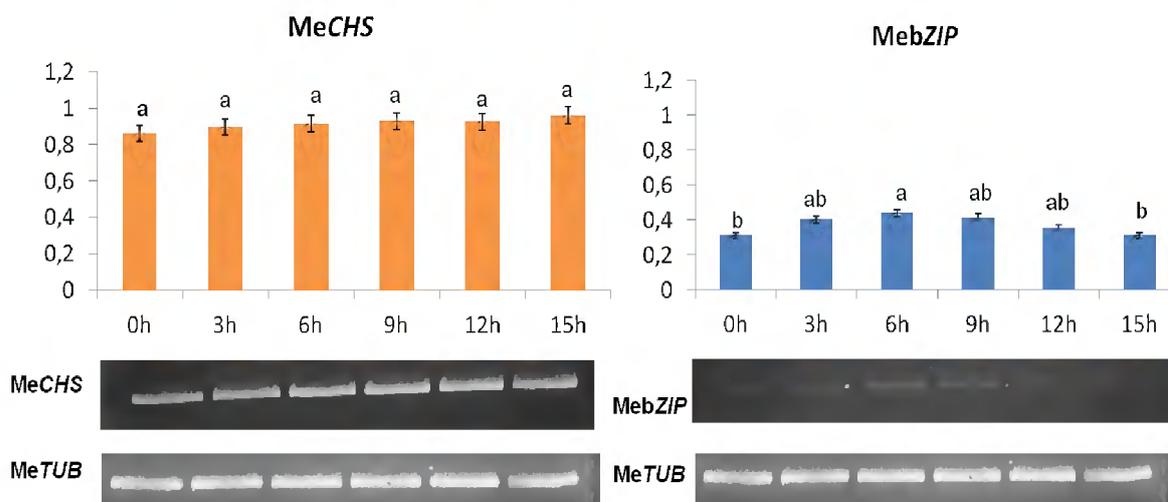


Fonte: A autora.

2.3.5. Análise da expressão de genes MebZIP e MeCHS

Após a reação transcrição reversa para obter o cDNA por meio do RNA total de folhas, foram realizados ensaios de PCR semi-quantitativa na avaliação do padrão de expressão dos genes MebZIP e MeCHS. Os gráficos foram feitos de acordo com as médias de expressão relativa de ambos os genes e os resultados analisados estatisticamente usando teste Tukey, onde obtivemos as diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 6).

Figura 6. O gráfico refere-se à quantificação relativa dos genes MeCHS e MebZIP comparado com o controle interno, o gene da tubulina (MeTUB). As imagens referem-se a géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Os resultados referem-se aos períodos nos quais foram realizadas as coletas das folhas de mandioca expostas a luminosidade (0h, 3h, 6h, 9h, 12h e 15h). As mesmas letras significam que os períodos são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 1%.



Fonte: A autora

Foi observado que o gene MeCHS não apresentou diferença significativa nas condições estudadas, pois os níveis de expressão foram estatisticamente constantes em todos os períodos de coleta. No caso do gene MebZIP, foram observadas diferenças de expressão gênica entre os tratamentos, com maior expressão observada no período de 6 h. A MebZIP apresentou menor expressão nos períodos de 0h e 15h, com valores estatisticamente iguais. Os demais períodos não apresentaram diferenças significativas tanto para o valor da amostra com maior expressão quanto para a de menor expressão.

2.4. Discussão

No presente trabalho foi realizada a caracterização da proteína MebZIP através do alinhamento desta proteína com outras bZIPs já caracterizadas, bem como avaliação do padrão de expressão do gene MebZIP e sua possível relação com a regulação da expressão do MeCHS frente a resposta à luminosidade.

A sequência completa do cDNA da MebZIP contém uma ORF de 1320 pb e codifica uma proteína deduzida constituída por 439 aminoácidos, com peso molecular de 47kDa e ponto isoelétrico de 5,85. O peso molecular e o ponto isoelétrico são importantes características de uma proteína e, assim, facilitam a sua identificação. Em soja, ao isolar o gene da G/HBF-1, Droger-Laser et al. (1997) identificaram uma ORF de 1134 pb, que

codifica uma proteína bZIP de 41kDa. Kircher et al. (1999) identificaram as bZIPs CPRF-1, -2 e -4 em salsa por meio de sua massa molecular de 42kDa, 46kDa e 44kDa, respectivamente. Utilizando o domínio genômico, Zhang et al. (2018) identificaram 160 genes de GmbZIP em soja, que denominaram de GmbZIP1 a GmbZIP160, caracterizando cada uma com sua ORF, número de aminoácidos e massa molecular, onde a GmbZIP14 foi a que apresentou maior similaridade com a MebZIP, com 1320pb, 439aa, e o massa molecular de 48,34kDa. Hu et al. (2016) identificaram 77 bZIPs em mandioca, nomeando-as de MebZIP 1 a MebZIP 77, sendo a MebZIP16, constituída por 439aa, sendo mais similar a MebZIP estudada no presente trabalho.

A identificação completa da ORF da MebZIP possibilitou fazer o alinhamento da sequência desta proteína com outras depositadas no Genbank (NCBI - National Center for Biotechnology Information). Na MebZIP foram identificados 5 domínios (bZIP, D1-D4), os quais são característicos de proteínas bZIP's conhecidas (DROGE-LASER et al., 1997; ZOU et al., 2008; KULKMAN et al., 2003). A maior similaridade MebZIP foi com a proteína CPRF -2 de *Manihot esculenta* (99%), acesso XP_021620722, indicando provavelmente se tratar da mesma proteína.

De acordo com dados da literatura, a CPRF-2 está relacionada com a regulação da expressão do gene da sintetase da chalcona (CHS). Portanto, associa-se esta mesma função para a MebZIP, visto que esta relação já foi demonstrada em outras bZIPs (YOSHIDA et al., 2008). Droger-laser et al. (1997) em estudos com soja, isolaram o cDNA da bZIP G/HBF-1, e identificaram os sítios de interação no promotor do gene da sintetase da chalcona, que podem estar envolvidos em respostas a fatores abióticos, como a luz e a seca.

Weisshaar et al. (1991) isolaram, em salsa, três cDNAs codificantes de proteínas com domínios similares aos dos fatores de transcrição bZIP's e denominaram essas proteínas como CPRF-1, -2 e -3. Como estas proteínas foram capazes de se ligarem à região promotora do gene da sintetase da chalcona, torna-se consistente a relação das proteínas encontradas com a repostas da exposição à luz em salsa. Dos três mRNAs estudados por Weisshaar et al. (1991), o que apresentou maior produção e acúmulo em resposta à luminosidade foi o mRNA da CPRF-1, juntamente com produção do mRNA da CHS, tornando-se consistente a hipótese da CPRF-1 estar envolvida na regulação de CHS em salsa. Armstrong et al. (1992) identificaram que estas mesmas proteínas, CPRF-1, -2 e -3 em salsa, ligam-se a regiões Box I e BOX III, bem como a outros elementos promotores em regiões ACGT, tais como as proteínas bZIPs.

An et al. (2017) investigaram os níveis de expressão da bZIP MdHY5 em macieiras em respostas a luminosidade utilizando ensaios de RT-PCR semi-quantitativa, os quais revelaram níveis de MdHY5 aumentados em resposta à luz.

Para avaliar o padrão de expressão do gene *MebZIP* e de seu possível gene alvo, o *MeCHS*, primeiramente foi realizada a extração do RNA total das folhas de plantas de mandioca submetidas a luminosidade. Observados em gel de agarose desnaturante contendo formaldeído, os RNAs extraídos das folhas coletadas em tempos diferenciados não apresentaram sinais de degradação. Na Figura 5 foram observadas as bandas dos RNAs ribossômicos intactas e na proporção próxima de 2:1 para 28S:18S, confirmando a integridade do material. Além das bandas dos RNAs ribossômicos, outras bandas de RNAs foram também observadas, correspondem provavelmente aos transcritos de genes de cloroplastos, comumente presentes em amostras de RNA total de folhas. Este padrão de expressão com bandas de RNA adicionais, além das bandas dos RNAs ribossômicos, foi observado também por Cardoso (2008) ao analisar amostras de RNA total extraídas de folhas em comparação com amostras de RNA de raízes, ambos de mandioca. Neste estudo, Cardoso (2008) detectou através de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa a expressão do gene *MebZIP* tanto em raízes como em folhas de mandioca, contudo em níveis maiores nas raízes que em folhas. Assim, foi evidenciado um maior número de transcritos do gene *MebZIP* nas raízes, sugerindo maior produção e/ou estabilidade das moléculas de mRNA. A expressão aumentada do gene *MeRZF* na raiz também foi observada por Reis et al. (2012).

No presente trabalho, a expressão relativa do gene *MebZIP* mostrou-se aumentada na amostra submetida a 6 h de exposição à luminosidade, sendo que valores menores de expressão foram observados nos períodos de 0 h (controle) e 15 h. Os fatores de transcrição bZIP de plantas desempenham papéis centrais em processos de desenvolvimento e múltiplos estresses em resposta à tolerância ambiental (HU et al., 2016). Trabalhos sobre expressão gênica de bZIPs de mandioca em resposta a luminosidade são escassos, porém, a identificação de bZIPs e seu envolvimento direto com resposta à luz em outras espécies vegetais já foram relatados (DROGER-LASER et al., 1997; KIRCHER et al., 1991). Até o momento, vários estudos confirmam o envolvimento de bZIPs em respostas a estresses abióticos e nas vias de transdução de sinais.

Hu et al. (2016) realizaram análises de expressão de 8 genes *MebZIP* em resposta à diferentes tratamentos, tais como: salinidade, estresse osmótico, H₂O₂, frio e ABA. Os níveis de expressão dos genes mostraram variação, sendo que alguns foram super-expressos em

determinado tratamento, enquanto em outros, foram reprimidos, revelando que essas podem representar um ponto de convergência de diferentes vias de sinalização.

Entre as MebZIPs identificadas por Hu et al (2016), a MebZIP16, constituída por 439 aa, corresponde provavelmente a proteína MebZIP estudada no presente trabalho. Apesar da MebZIP16 não estar entre as MebZIPs mais estudadas frente aos diferentes tipos de estresses, as análises de transcriptômica realizadas por Hu et al. (2016) revelaram variações na expressão do gene MebZIP16 em folhas e raízes de mandioca, assim como o observado para a MebZIP por Cardoso (2008).

Liu e Chu (2015) identificaram os papéis potenciais dos genes BzdZIP de *Brachypodium distachyon* em resposta a estresses ambientais. Os autores o perfil de expressão do gene BdbZIP sob múltiplos estresses, incluindo fatores ambientais como o frio, calor e H₂O₂, e obtiveram padrões de expressão variados, como a BbdZIP do cluster II obteve expressão em fatores ambientais e dos cluster II e IV obtiveram padrões de expressão óbvios em diferentes tratamentos.

Pan et al. (2017) analisaram a expressão do gene SlbZIP38 em tomate e obtiveram padrão similar ao que foi encontrado com o gene MebZIP no presente estudo. Em resposta ao estresse abiótico, o nível de expressão foi maior no período intermediário de 6h, e retornou ao nível do controle ao final do período, às 18h Na expressão envolvendo o ciclo de luz, a expressão atingiu seu maior nível após as 6h de exposição, concluindo que esta bZIP também é influenciada pela luz (PAN et al., 2017).

Strance et al. (2010), em estudo com *Arabidopsis*, realizaram análise da expressão do fator de transcrição bZIP HY5 em resposta a luz e Uv-B, onde identificaram que esta proteína ativa outros genes, como o MYB12, bem como o gene alvo, o CHS. Os níveis da expressão de CHS foram associados aos níveis de transcritos dos genes estudados, apresentando, assim, uma interação entre os transcritos da proteína reguladora e do gene alvo.

Tem sido bastante investigada a relação de unidades reguladoras de luz (LRUs) com os genes das proteínas da via de biossíntese de flavonóides, como a CHS (KAISER et al., 1995; HARTMANN et al., 1998; STRACKE et al., 2010). Estas LRUs são elemento cis-reguladores que podem estar relacionados ao G-Box do DNA e elementos de reconhecimento MYB. Esses elementos indicam a ação de famílias de fatores de transcrição, como as bZIPs, em respostas à luz (STRACKE et al., 2010).

No presente trabalho, os resultados indicam a relação da expressão do gene MebZIP com a resposta à luz, devido ao aumento de transcritos na amostra com 6 h de luminosidade.

Por outro lado, a expressão do MeCHS foi estatisticamente constante em todos os períodos analisados. Sendo assim, não foi possível identificar diferenças significantes entre os tratamentos no gene MeCHS e sua relação com o aumento da expressão do gene MebZIP. Desta forma, é possível que a realização de novas análises em condições diferentes das utilizadas neste estudo, bem como a utilização de outras metodologias da biologia molecular e juntamente com a análise de outros genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanóides, além do CHS, contribuam na elucidação da função da MebZIP. Além da análise da expressão do gene MebZIP, uma outra abordagem que também pode ser bastante útil é estudar a atividade da proteína MebZIP em condições de luminosidade.

2.5. Conclusões

- A proteína MebZIP identificada neste trabalho contém os domínios conservados (bZIP, D1-D4) que indicam a sua funcionalidade, enquadrando-a na família dos fatores de transcrição bZIP do tipo CPRF, com conhecida função na regulação de genes CHS em condições de luminosidade;

- O nível de expressão do gene MebZIP aumentou durante a exposição à luz branca, indicando uma potencial função na resposta à luminosidade na mandioca, contudo não foi observada relação com a expressão do seu possível gene alvo, o MeCHS, o qual não apresentou variação de expressão significativa nas condições utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AN, J. P., QU, F. J., YAO, J. F.; WANG, X.A.; YOU, C.X.; WANG, X.F.; HAO, Y.J.; The bZIP transcription factor MdHY5 regulates anthocyanin accumulation and nitrate assimilation in apple, *Horticulture Research*, 4, 17023; 2017.
- ALAGARASAN, G., DUBEY, M., ASWATHY, K. S., AND CHANDEL, G. Genome wide identification of orthologous ZIP genes associated with zinc and iron translocation in *Setaria italica*. **Plant Science**. 8:775. doi: 10.3389/fpls.2017. 00775, 2017.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A. & WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Ed., Artmed.2016.
- ALVES, A. A. C. fisiologia da mandioca. In: **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das almas: Embrapa mandioca e Fruticultura tropical, cap.7, p.138-169, 2006.
- ALVES, J.S.; LEDO, C.A.S. 1; COELHO FILHO, M.; DUARTE, S.J. Desempenho fisiológico de genótipos de mandioca submetidos a estresse hídrico. In: Congresso Brasileiro

de Mandioca, 14. ; **Feira brasileira da mandioca**, Maceió. Mandioca: fonte de alimento e energia: anais. Maceió: abam: SBM, 2011.

ALVES, M. S., DADALTO, S. P., GONÇALVES, A. B., DE SOUZA, G. B., BARROS, V. A., AND FIETTO, L. G. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, 7815–7828, 2013.

ALVES FILHO, P. P. DA C.; GALVÃO, J. R.; NEVES, L. B.; COSTA, I. DOS R. Produção de Mandioca acesso roxinha, Igarapé-Açu, Pará em resposta à adubação NPK. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2015.

ARMSTRONG, G.A.; WEISSHAAR, B.; HAHLBROCK, K. Homodimeric and Heterodimeric Leucine Zipper Proteins and Nuclear Factors from Parsley Recognize Diverse Promoter Elements with ACGT Cores **The Plant Cell**, 4, 525-537, 1992.

ANDRÉ, TB. e SANTOS, A.C. Uso de produtos da cultura da mandioca (Manihot) na produção animal. *Enciclopédia Biosfera*, v.8, n.15, p.1622-1647, 2012.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZANGH, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389-3402. 1997.

BAGUMA, Y. **Regulation of Starch Synthesis in Cassava** 2004, 44f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Universidade Sueca de Ciências Agrárias, Uppsala, Suécia, 2004.

CARDOSO, C.M.Y. **Caracterização da proteína MebZIP e análise de expressão do seu gene em raízes e folhas de mandioca**. 2008. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará, 2008.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, 11: 113-116. 1993.

CHAPPELL J & HAHLBROCK K . Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. **Nature** 311:76–78, 1984.

CORDEIRO, T; SECCO, R.; SILVA, M.J.DA; SODRÉ, R.C.; MARTINS, M.L.L. Manihot in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17600>. Acesso em: 10 Jun. 2018.

COSTA, C. N. M.; BRÍGIDA, A. B. S.; BORGES, B. N, MENEZES NETO, M. A. DE; CARVALHO, L. J. C. B; DE SOUZA, C. R. B. Levels of MeLEA3, a cDNA Sequence Coding for an Atypical Late Embryogenesis Abundant Protein in Cassava, Increase Under In Vitro Salt Stress Treatment **Plant Molecular Biology Reporter** 29:997–1005, 2011.

CRUZ, C. D. - *Aplicativo Computacional em Genética e Estatística*. Viçosa, MG: Editora UFV, 1997. v1. 442 p.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews** 10:397–412, 2011

DE SOUZA, C.R.B.; CARVALHO, L.J.C.B.; DE ALMEIDA, E.R.P.; GANDER, E.S. Identification of cassava root protein genes. **Plants Foods for Human Nutrition**, 57: 353-363. 2002.

DE SOUZA, C.R.B.; DE ALMEIDA, E.R.P.; CARVALHO, L.J.C.B.; GANDER, E.S. Studies Toward the identification of transcription factors in cassava storage root. **Journal of Plant Physiology**, 15: 167-170. 2003.

DIXON RA, HARRISON MJ, LAMB-C. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology** 32:479–501 J. 1994.

DIXON RA, PAIVA N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell** 7:1085–1097, 1995.

DRÖGE-LASER, W.; KAISER, A.; LINDSAY, W. P.; HALKIER, B. A.; LOAKE, G. J.; DOERNER, P.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Rapid stimulation of a soybean proteinserine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. **The EMBO Journal**, 16: 726– 738. 1997.

E, Z. G., ZHANG, Y. P., ZHOU, J. H., AND WANG, L. MINI Review roles of the bZIP gene family in rice. **Genetics and Molecular Research**, 3025–3036. April.16.11, 2014.

FEINBAUM R.L., AUSUBEL F.M. Transcriptional regulation of the Arabidopsis thaliana chalcone synthase gene. **Molecular and Cellular Biology** 8:1985–1992,1988.

FOSTER, R.; ISAWA, T.; CHUA, N.H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. **Faseb Journal**, 8: 192-200. 1994.

FUKUDA, N. Plant Growth and Physiological Responses to Light Conditions. In: Plant Factory using Artificial Light. 2019.

FUKUDA, W.M.G; COSTA, I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; OLIVEIRA, R.P. Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização. Embrapa-CNPMP: Cruz das Almas-Bahia, 1996. (Documento, 68).

Gallemlí M, Martínez-García JF. bZIP and bHLH Family Members Integrate Transcriptional Responses to Light. **Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects.** ; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-800854-6.00021-X

GLÄßGEN W.E., ROSE A, MADLUNG J, KOCH W, GLEITZ J, SEITZ HU Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. **planta** 204:490–498, 1998.

HAAK, D.C.; FUKAO, T.; GRENE, R.; HUA, Z.; IVANOV, R.; PERRELLA., G.; LI, S. Multilevel Regulation of Abiotic Stress Responses in Plants. **Frontiers in Plant Science.** 8:1564, 2017.

HALL T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis rogram for windows 95/98 /NT. **Nuc. Acid Symp.** Ser., v. 41, p. 95-98, 1999.

HAHLBROCK K & SCHEEL D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, 40:347–369, 1989.

HARTMANN U., VALENTINE W.J., CHRISTIE J.M., HAYS J., JENKINS G.I. WEISSHAAR B. Identification of UV/blue light-response elements in the Arabidopsis

thaliana chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. **Plant Molecular Biology** 36, 741–754, 1998.

HSIEH K. & HUANG A.H. Tapetosomes in Brassica tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. **The Plant Cell** 19, 582–596. 2007.

HU, W. YANG, H.; YAN, Y., WEI, Y., TIE, WE., DING, Z., ZUO, J., PENG, M.; LI, K. Genome-wide characterization and analysis of bZIP transcription factor gene family related to abiotic stress in cassava. **Scientific Reports**, 6, 22783; 2016.

IBGE (2017). Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro v.30 n.3 p.1-83 Março. 2017.

JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DRÖGE-LASER, W.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; TIEDEMANN, J.; KROJ, T.; PARCY, F. bZIP transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science** 7, 106–111. 2002.

JULKOWSKA, M. M.; TESTERINK, C.; Tuning plant signaling and growth to survive salt. **Trends Plant Sci.** 20, 586–594 2015.

KAISER T., EMMER K., KRETSCH T., WEISSHAAR B., SCHÄFER E.; BATSCHAUER A. Promoter elements of the mustard CHS1 gene are sufficient for light regulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology** 28, 219–229, 1995.

KIRCHER, S.; WELLMER, F.; NICK, P.; RÜGNER, A.; SCHÄFER, E.; HARTER, K. Nuclear Import of the Parsley bZIP Transcription Factor CPRF2 Is Regulated by Phytochrome Photoreceptors **The Journal of Cell Biology**, 144, 2, 1999.

KUHLMANN M., HORVAY K., STRATHMANN A., HEINEKAMP T., FISCHER U., STEFAN BÖTTNER, DRÖGE-LASER W. The α -Helical D1 Domain of the Tobacco bZIP Transcription Factor BZI-1 Interacts with the Ankyrin-repeat Protein ANK1 and Is Important for BZI-1 Function, Both in Auxin Signaling and Pathogen Response **The Journal of Biological Chemistry**, 278, 10, 8786–8794, 2003.

LARA, A. C. C.; BICUDO, S. J.; BRACHTVOGEL, E. L.; ABREU, M. L.; CURCELLI F. Melhoramento genético da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Cranzl.). *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, v. 4, p.55-65, 2008.

LEYVA A, JARILLO TA, SALINAS J, MARTINEZ-ZAPATER J. M. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. **Plant Physiol** 108:39–4, 1995.

LI X, FAN S, HU W, LIU G, WEI Y, HE C e SHI H. TWO CASSAVA BASIC LEUCINE ZIPPER (BZIP) Transcription Factors (MebZIP3 and MebZIP5) Confer Disease Resistance against Cassava Bacterial Blight. **Frontiers in Plant Science** 8:2110, 2017.

LIMA, A.M. **Podridão radicular da mandioca causada por phytophythium sp. propagação, metodologia de inoculação e prospecção de genes de resposta** 2017, 133 f., tese (Doutorado em agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-Pa, 2018

LIU, L.; WHITE, M.J.; MACRAE, T.H. Transcription Factors and their Genes in Higher Plants. Functional Domains, Evolution and Regulation. **European Journal of Biochemistry**, 262: 247-257. 1999.

LIU, X.; CHU, Z. Genome-wide evolutionary characterization and analysis of bZIP transcription factors and their expression profiles in response to multiple abiotic stresses in *Brachypodium distachyon*. **BMC Genomics** 16, 227, 2015.

LIU, J., LIU, L., LI, Y., JIA, C., ZHANG, J., MIAO, H., Role for the banana AGAMOUS-like gene MaMADS7 in regulation of fruit ripening and quality. **Physiol. Plant** 155, 217–231. doi: 10.1111/ppl.12348, 2015.

MATTOS, P. L. P. de.; CARDOSO, E. M. R. Cultivo da mandioca para o Estado do Pará. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistema de Produção 13.). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca3ara/importancia.htm>. Acessado em 11 jun 2018.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Front Plant Sci.** 5, 170, 2014.

NAMIAS, E.S.A. **Identificação de seqüências que codificam para proteínas do tipo bZIP em raiz de reserva de *Manihot esculenta* Crantz.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, Belém. 29 p. 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OLIVEIRA EJ, SANTANA FA, OLIVEIRA LA, SANTOS VS. Genetic parameters and prediction of genotypic values for root quality traits in cassava using REML/BLUP. **Genetics and Molecular Research: GMR** .13, 2014;

PAN, Y. XIN,H.; LI, C.; XU, X.; SU,C.; LI, J.; SONG, H.; ZHANG, X.; PAN, Y. SlbZIP38, a Tomato bZIP Family Gene Downregulated by Abscisic Acid, Is a Negative Regulator of Drought and Salt Stress Tolerance **Genes**, 8, 402, 2017.

PIERCE, B.A. **Genética: um enfoque conceitual.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. 757p.

PUONTI-KAERLAS J Cassava Biotechnology. **Biotechnol. and Gen. Engineer. Rev.** 15: 329-364, 1998.

REIS, S,P.; TAVARES, L .S.C; COSTA, C.N.M.; SANTA BRÍGIDA, A.B.; DE SOUZA, C.R.B. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under in vitro salt stress **Molecular Biology Reports** 39:6513–6519, 2012.

SILVA, D.M. de S.; MOTA, M.G. da C.; CONCEIÇÃO, C.C. da C. Avaliação de Clones de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para Produção e Qualidade de Raiz. **IV Seminário de Iniciação Científica da UFRA e X Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental.** 2006.

SHEN, H.; CAO, K. WANG, X. A conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in *Arabidopsis thaliana* interferes with the formation of

homodimer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 362: 425-430. 2007.

STRACKE, R.; FAVORY, J.J.; GRUBER, H.; BARTELNIEWOEHNER, L.; BARTELS, S.; BINKERT, M.; FUNK, M.; WEISSHAAR, B.; ULM, R. The Arabidopsis bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation **Plant, Cell and Environment** 33, 88–103, 2010.

TAYLOR L.P., BRIGGS W.R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. **Plant Cell** 2:115–127,1990.

TODAKA, D., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. **Front Plant Sci.** 6, 84, 2015.

VAN TUNEN A.J., KOES R.E., SPELT C.E., VAN DER KROL A.R., STUITJE A.R., MOL J.N.M. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated, and differential expression of flavonoid genes. **EMBO J** 7:1257–1263,1988.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.F.; SILVA, M.S.; FALEIRO, F.G. Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do Cerrado acessada por meio de descritores morfológicos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 15p, 2007.

WEI, K.; CHEN, J.; WANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, S.; LIN, Y.; PAN, S.; ZHONG,X.; XIE, D., Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. **DNA Research**,19, 463–476, 2012.

WEISSHAAR B., ARMSTRONG G. A., BLOCK A., SILVA O.COSTA.; HAHLBROCK K.; Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness **The EMBO Journal** vol.10 no.7 pp.1777- 1786, 1991.

YAO D, WEI Q, XU W, SYRENNE RD,YUAN JS, SU Z. Comparative genomic analysis of NAC transcriptional factors to dissect the regulatory mechanisms for cell wall biosynthesis. **BMC Bioinformatics.** 2012;

YOSHIDA, K.; WAKAMATSU, S.; SAKUTA, M. Characterization of SBZ1, a soybean bZIP protein that binds to the chalcone synthase gene promoter. **Plant Biotechnology**, 25: 131–140. 2008.

ZHANG, P. **Studies on Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) transformation: towards genetic improvement.** Tese (Doutorado em Ciências Naturais). 139 p. Swiss Federal Institute of Technology Zürich. 2000.

ZHANG, M. LIU, Y., SHI, H.; GUO, M.; CHAI, M.; HE.; YAN, M.; CAO, D.; ZHAO, L.; CAI, H.; QIN, Y. Evolutionary and expression analyses of soybean basic Leucine zipper transcription factor family **BMC Genomics** 19:159, 2018.

ZHOU B., LI Y., XU Z., YAN H., HOMMA S., KAWABATA S. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). **Journal of Experimental Botany** 58:1771–1781, 2007.

ZOU, M., GUAN, Y., REN, H., ZHANG, F. & CHEN, F. A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. **Plant Molecular Biology** 66, 675–683, 2008.