**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética**

**Estudo das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *Nicotiana
tabacum* L. e seu papel no desenvolvimento floral**

Lígia Tereza Bertolino

**Ribeirão Preto – SP
2014**

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética**

**Estudo das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *Nicotiana
tabacum* L. e seu papel no desenvolvimento floral**

Lígia Tereza Bertolino

**Dissertação apresentada ao
Departamento de Genética da
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena de Souza Goldman

**Ribeirão Preto – SP
2014**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bertolino, Lígia Tereza

Estudo das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *Nicotiana tabacum* L. e seu papel no desenvolvimento floral.

Lígia Tereza Bertolino – Ribeirão Preto, 2014.

120 p.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil.

Orientadora: Profª Dra. Maria Helena de Souza Goldman

1. *Nicotiana tabacum*. 2. Estigma/estilete. 3. Proteínas 14-3-3. 4. SCI1.
5. Ciclo celular. 6. Desenvolvimento floral.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

- À Profa Dra. Maria Helena de Souza Goldman, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e de realizar este trabalho. Muito obrigada pela orientação e dedicação.
- Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela oportunidade e por todo o suporte oferecido.
- À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Departamento de Biologia pela utilização de sua estrutura e pelo apoio oferecido.
- Ao CNPq, pela bolsa concedida para realização deste trabalho (Processo - 130159/2012-3).
- À CAPES, ao CNPq e à FAPESP, por todo o suporte financeiro oferecido para o desenvolvimento da pesquisa em nosso laboratório.
- À FAEPA, pelo suporte financeiro oferecido para participação em eventos científicos.
- Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, FCFRP-USP, pela utilização de estrutura de seu laboratório.
- À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões e à Profª Márcia Maria Gentile Bitondi, do Departamento de Biologia, FFCLRP-USP, pela confiança para utilização de equipamentos em seu laboratório.
- Ao Prof. Dr. Roy Edward Larson, do Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP, pela utilização do microscópio confocal.
- À Profa Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, do IAC, pela disponibilidade em me ceder reagentes quando foi necessário.
- Ao Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, do Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP, pela confiança para utilização de equipamentos em seu laboratório.
- À Elizabete Rosa Milani e a Roberta Ribeiro Costa pela ajuda na obtenção de fotos de microscopia confocal.
- A Dra Núbia Barbosa Eloy, pela ajuda nos experimentos com RNA.
- A Luiz Eduardo Viera Del Bem, pela ajuda na análise evolutiva das proteínas 14-3-3.
- À Susie Adriana Penha Nalon, pela disponibilidade e ajuda com todas as datas e documentos.
- Ao técnico Paulo Rosa Junior, pela amizade e manutenção do laboratório.

- Ao Fláuzio, pela manutenção da casa de vegetação.
- À Andrea Carla Quiapim da Silva, técnica do laboratório, obrigada por todo apoio antes e durante este trabalho e por fazer os dias de todos mais divertidos.
- À Dona Nina, por todo seu carinho de vó e pelo cafezinho de todos os dias.
- A Hebréia e Greice, pela amizade sincera, pelas conversas e risadas que demos juntas ao longo desses dois anos. Sentirei muita falta de vocês.
- Ao Pedro, por ser essa pessoa especial, que me ajudou em muitos momentos com meus problemas computacionais.
- Ao Amau, pela amizade, por ser sempre essa pessoa divertida e companheira.
- Ao Edi pela convivência, pelo apoio durante os experimentos e por todos os protocolos cedidos.
- À Francine, obrigada pela oportunidade de ensinar e aprender com você.
- A Vitória, Danilo, Lúcia, Vitor, Viviane, Fernanda, Samantha, Luís e Marcela, pessoas com as quais tive o imenso prazer de conviver, obrigada por todo o apoio e pela troca de experiências.
- Às amigas de perto e de longe, Íngua, Camilla, Couve e Pipi, pela amizade sincera, por saber que sempre poderei contar com vocês.
- A Amau, Andréa e Hebréia, em especial, por terem me ajudado a revisar este texto no último segundo.
- À Letícia, pela amizade, pela ótima convivência em nossa casa e pelas conversas sobre o futuro.
- Ao Matheus, por todo o incentivo, por estar ao meu lado e ser muito mais que um amigo.
- A toda a minha família, especialmente aos meus pais, Célia e Moacyr, pelo amor incondicional, por estarem sempre presentes e não medirem esforços para que eu realize meus sonhos.

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS	v
1. Introdução	1
1.1. A flor de Angiospermas.....	1
1.2. O gene <i>SC11</i> e o desenvolvimento do estigma e do estilete de <i>Nicotiana tabacum</i> L.	3
1.3. As proteínas da família 14-3-3	4
2. Objetivos	9
3. Material e Métodos	10
3.1. Material Vegetal	10
3.2. Sequências dos genes <i>14-3-3A</i> e <i>14-3-3D</i>	10
3.3. Obtenção de construções gênicas	11
3.3.1. Adição de sítios attB.....	11
3.3.2. Reações BP	13
3.3.3. Reações LR.....	14
3.3.4. Construções gênicas geradas	15
3.4. Multiplicação em <i>E. coli</i> e checagem de DNA plasmidial	17
3.4.1. Preparo de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	17
3.4.2. Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	18
3.4.3. Multiplicação e Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	18
3.4.4. Digestão com enzimas de restrição	19
3.4.5. Reações de Sequenciamento	20
3.5. Manipulação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.5.1. Preparo de <i>A. tumefaciens</i> eletrocompetentes	21
3.5.2. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> eletrocompetentes	21
3.5.3. Extração de DNA plasmidial de <i>A. tumefaciens</i>	21
3.5.4. Seleção das colônias positivas: checagem por PCR	22
3.6. Manipulação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.6.1. Preparo de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes	23

3.6.2. Co-transformação de <i>S. cerevisiae</i> por choque térmico.....	24
3.7. Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose	24
3.8. Quantificação de ácidos nucleicos.....	25
3.9. Análise de sítios de interação com proteínas 14-3-3s na sequência de SCI1.....	25
3.9.1. Mutação de sítios putativos de interação com 14-3-3s em SCI1.....	25
3.10. Expressão transiente em <i>N. benthamiana</i> e <i>N. tabacum</i> – Ensaios de localização subcelular e BiFC.....	27
3.11. Ensaios de duplo-híbrido em leveduras	28
3.12. Transformação de plantas e análise das plantas transgênicas.....	29
3.12.1. Obtenção de <i>N. tabacum</i> em condições estéreis	29
3.12.2. Obtenção dos transgênicos estáveis de silenciamento gênico	30
3.12.3. Extração de DNA genômico de folhas.....	31
3.12.4. PCR para checagem de transgenia.....	32
3.12.5. Determinação do nível de silenciamento gênico.....	32
3.12.6. Polinizações Controladas	36
3.12.7. Análise de Segregação.....	36
3.13. Meios de Cultura e Soluções de aminoácido e bases nitrogenadas	37
3.14. Antibióticos utilizados.....	39
3.15. Identificação de ortólogos das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D.....	40
4. Resultados.....	42
4.1. Localização subcelular das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D	42
4.2. Dimerização das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D	46
4.2.1. Ensaio de duplo-híbrido	46
4.2.2. BiFC.....	47
4.3. Confirmação da interação SCI1 x 14-3-3A por BiFC.....	50
4.4. Análise do sítio de ligação de SCI1 com proteínas 14-3-3	51
4.4.1. Análises <i>in silico</i>	51
4.4.2. Mutações e BiFCs	52
4.5. Identificação de ortólogos das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D.....	54
4.5.1. Identificação de sequências de 14-3-3s em bancos de dados.....	55
4.5.2. Análise evolutiva das proteínas 14-3-3	58
4.6. Plantas transgênicas	63

4.6.1. Plantas transgênicas com silenciamento do gene <i>14-3-3A</i>	63
4.6.2. Plantas transgênicas com silenciamento do gene <i>14-3-3D</i>	69
4.6.3. Geração T ₁ – Análises Preliminares	74
5. Discussão	77
5.1. A interação entre SCI1 e as proteínas 14-3-3	77
5.1.1. A interação com dímeros de 14-3-3s	77
5.1.2. A localização subcelular das 14-3-3s	79
5.1.3. Sítios de ligação a proteínas 14-3-3s	80
5.2. As funções das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D	81
5.2.1. Os ortólogos das 14-3-3A e D de tabaco	81
5.2.2. Fenótipos em plantas transgênicas	83
5.3. Considerações Finais	87
6. Conclusões	88
7. Referências Bibliográficas	90
Anexos	99

Estudo das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *Nicotiana tabacum* L. e seu papel no desenvolvimento floral

RESUMO

A modulação da forma e tamanho em órgãos vegetais depende do controle temporal e espacial de divisão e expansão celular. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que regulam este processo durante o desenvolvimento floral. O estudo da via de sinalização de SCI1 (*Stigma/style Cell Cycle Inhibitor 1*) pode contribuir para o entendimento do processo de crescimento das flores. Este gene produz uma proteína, localizada no nucléolo, que está relacionada à inibição da proliferação celular no estigma e no estilete de *Nicotiana tabacum*, modulando o tamanho destes órgãos florais. Experimentos feitos para a identificação de parceiros de interação de SCI1 identificaram as proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum* como candidatas à interação. A família 14-3-3 é composta de proteínas altamente conservadas, que formam dímeros em sua conformação nativa e são responsáveis pela modulação da atividade das mais variadas proteínas em resposta a sinais intracelulares. Por isso, estas proteínas estão associadas à regulação de uma série de processos, incluindo o metabolismo, transcrição, ciclo celular, entre outros. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar as proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum* e o seu papel durante o desenvolvimento floral. Os resultados aqui obtidos revelaram que a 14-3-3A possui localização citoplasmática e nuclear, enquanto a 14-3-3D se distribui apenas no citoplasma. Também foi evidenciado que estas proteínas são capazes de formar homodímeros e heterodímeros entre si. Os homodímeros de 14-3-3A estão distribuídos no citoplasma e no núcleo, enquanto os homodímeros de 14-3-3D e heterodímeros se encontram apenas no citoplasma. Adicionalmente, a interação *in vivo* entre a 14-3-3A e SCI1 foi confirmada por BiFC, apresentando localização nuclear, fora do nucléolo. Análises *in silico* da sequência de aminoácidos de SCI1 identificaram duas regiões putativas de reconhecimento por proteínas 14-3-3s. Estas regiões estão sendo analisadas funcionalmente por meio de ensaios de BiFC com sequências mutadas de SCI1. A análise deste conjunto de resultados, juntamente com outros resultados obtidos em nosso laboratório, sugere que apenas homodímeros de 14-3-3D e heterodímeros formados entre

14-3-3A e 14-3-3D sejam capazes de interagir com SCI1. Adicionalmente, a localização nuclear dessa interação difere daquelas observadas para SCI1 e para as 14-3-3s individualmente, sugerindo que as 14-3-3s migrem para o núcleo para interagir com SCI1. Nossa hipótese é de que as proteínas 14-3-3s possam modular a localização subnuclear de SCI1. Com o objetivo de levantar dados a respeito das possíveis funções desempenhadas pelas proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum*, foram identificados os grupos de possíveis ortólogos dessas proteínas em *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum* e *N. benthamiana*. Esta análise mostrou que os ortólogos às 14-3-3A e D em *Arabidopsis* estão associados ao ciclo celular, o que sugere que as proteínas de tabaco possam ter conservado essa função. Além disso, também foram produzidas plantas transgênicas silenciadas para cada uma dessas 14-3-3s de maneira independente. A análise dos fenótipos das plantas transgênicas não levou à elaboração de uma hipótese definitiva sobre a função dessas 14-3-3s no desenvolvimento floral. No entanto, algumas plantas transgênicas apresentaram estruturas menores, especialmente as pétalas, sugerindo que estas proteínas podem estar envolvidas no controle do tamanho de órgãos vegetais.

Palavras-chave: 1- Desenvolvimento. 2- Flor. 3- Família 14-3-3. 4- SCI1. 5- Modulação de tamanho.

Study of 14-3-3A and 14-3-3D proteins of *Nicotiana tabacum* L. and their role in floral development

ABSTRACT

The modulation of size and shape in plant organs depends on temporal and spatial control of cell division and expansion. However, the molecular mechanisms that regulate this process during floral development are poorly understood. The study of *SCI1* (*Stigma/style Cell Cycle Inhibitor 1*) signaling pathway can contribute to the understanding of the flower growing process. This gene produces a protein which is located in the nucleolus and is related to the inhibition of cell proliferation in the *Nicotiana tabacum* stigma and style, modulating the size of these organs. Experiments performed to identify SCI1 interaction partners have identified the *N. tabacum* 14-3-3A and 14-3-3D proteins as interaction candidates. The 14-3-3 family is composed of highly conserved proteins, which form dimers in their native conformation and are responsible to modulate the activity of a large variety of proteins in response to intracellular signals. Therefore, these proteins are associated to the regulation of several processes, including metabolism, transcription, and cell cycle, among others. In this context, the present work aimed to study the *N. tabacum* 14-3-3A and 14-3-3D proteins and their role during flower development. The results here obtained revealed that 14-3-3A is located in the nucleus and the cytosol, while 14-3-3D protein is distributed only in the cytosol. It was also shown that these proteins can form homodimers and heterodimers with each other. Homodimers of 14-3-3A are distributed in nucleus and cytosol, while 14-3-3D homodimers and heterodimers are located only in the cytosol. Furthermore, the *in vivo* interaction between SCI1 and 14-3-3A was confirmed by BiFC, showing nuclear localization, outside the nucleolus. *In silico* analyzes of SCI1 amino acid sequence identified two putative regions of recognition by 14-3-3 proteins. These regions are being evaluated by BiFC assays with SCI1 mutated sequences. The analyses of this set of results, together with other results obtained in our laboratory, suggests that only 14-3-3D homodimers and heterodimers between 14-3-3A and 14-3-3D are capable to interact with SCI1. Moreover, the nuclear localization of this interaction differs from the ones observed for SCI1 and for the 14-3-3s individually, which suggests that the 14-3-3s migrate to the nucleus to interact with SCI1. Our hypothesis is that the 14-3-3 proteins can modulate the

subnuclear localization of SCI1. To obtain data concerning the possible roles of the *N. tabacum* 14-3-3A and 14-3-3D proteins, groups of possible orthologous of these proteins in *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum* and *N. benthamiana* were identified. This analysis has shown that the orthologs of 14-3-3A and D in *Arabidopsis* are associated to the cell cycle, suggesting that the tobacco proteins might have conserved this function. Furthermore, transgenic plants silenced for each of the 14-3-3s independently were also produced. Phenotype analyzes of transgenic plants did not lead to a definitive hypothesis about the function of these 14-3-3s during floral development. However, some transgenic plants exhibited smaller structures, specially petals, which suggests that these proteins may be involved in the size control of plant organs.

Keywords: 1- Development. 2- Flower. 3- 14-3-3 family. 4- SCI1. 5- Size modulation.

ABREVIATURAS

AD (*Activation Domain* – domínio de ativação)

Ade (adenina)

atm (atmosferas, unidade de medida de pressão)

BD (*DNA Binding Domain* – domínio de ligação ao DNA)

BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*)

CDS (*Coding sequence* – sequência codificadora)

EST (*Expressed sequence tag*)

GFP (*Green Fluorescent Protein*)

His (histidina)

JTT (*Jones-Taylor-Thornton*)

LB (*Luri-Bertani Medium*)

Leu (leucina)

MS (*Murashige e Skoog medium*)

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

OD₆₀₀ (*optical density*, absorbância a 600 nm)

p35S (Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor)

pb (pares de bases)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase)

RFP (*Red Fluorescent Protein*)

rpm (rotações por minuto)

RT-qPCR (PCR em tempo real precedida por reação com transcriptase reversa)

SC (*Synthetic Complete medium*)

TC (*Tentative consensus*)

Trp (triptofano)

1. Introdução

1.1. A flor de Angiospermas

As Angiospermas surgiram durante o Cretáceo e se diversificaram rapidamente, se tornando o grupo de plantas dominante na superfície terrestre (Raven *et al*, 2007; Pires & Dolan, 2012). Elas apresentam grande abundância, possuindo cerca de 240 a 300 mil espécies. Seus membros possuem características vegetativas muito diversas, o que permitiu a invasão e adaptação aos ecossistemas mais variados (Karasawa, 2009). O sucesso apresentado por este grupo de plantas é surpreendente, e sua dominância parece ser explicada pela evolução de inúmeras características, entre elas, adaptações relacionadas à resistência à seca e ao frio (Raven *et al*, 2007; Karasawa, 2009). Adicionalmente, a evolução das flores, compostas de órgãos reprodutivos complexos, permitiu o desenvolvimento de mecanismos de polinização e de dispersão de sementes mais eficientes e especializados, colaborando para o sucesso reprodutivo e diversificação destas plantas (Pires & Dolan, 2012; Barret, 2013).

A eficiência da reprodução das Angiospermas depende do desenvolvimento adequado dos órgãos reprodutivos e da interação compatível entre pólen e pistilo (DePaoli *et al.*, 2011). A flor, estrutura central neste processo, apresenta enorme variação de forma entre as diferentes espécies. No entanto, ela é basicamente composta por quatro verticilos florais (Figura 1). Os dois verticilos externos são formados por sépalas e pétalas (estruturas estéreis), adicionalmente, estames e pistilos (estruturas férteis) compõem os dois verticilos internos. Os estames, órgãos reprodutivos masculinos, são constituídos por filetes e anteras, sendo o conjunto de estames de determinada flor denominado androceu. Já os pistilos, órgãos reprodutivos femininos, são formados por carpelos, compostos de ovário, estilete e estigma. O conjunto de pistilos de uma flor forma o gineceu (Esau, 1987), que tem função especialmente relevante no processo reprodutivo, uma vez que é responsável pelo reconhecimento e seleção dos grãos de pólen, direcionamento do tubo polínico e proteção dos óvulos e embrião (Friis *et al.*, 2006).

Figura 1. **Esquema da flor de *Nicotiana tabacum*, mostrando as estruturas presentes na flor de Angiospermas (Ferreira, 2013).**

O processo de formação de todas essas estruturas, a organogênese floral, ocorre a partir da diferenciação de meristemas de inflorescência e florais durante a fase adulta, o que envolve resposta a sinais ambientais, hormonais e genéticos (Taiz & Zeiger, 2009; Krizek & Fletcher, 2005). Esta sinalização deve ocorrer de maneira coordenada, permitindo assim, o desenvolvimento adequado em relação à identidade, forma e tamanho de todos os órgãos florais. A identidade dos verticilos é determinada pela expressão espacialmente coordenada de diferentes genes homeóticos, processo explicado pelo chamado modelo ABC (Bowman *et al*, 1991; Coen & Meyerowitz, 1991; Heijmans *et al*, 2012). Entretanto, o desenvolvimento completo da flor depende, ainda, de redes gênicas que levarão à diferenciação terminal de tecidos e à modulação da forma e tamanho dos diferentes órgãos (Krizek & Fletcher, 2005). Este processo, que envolve o crescimento das estruturas florais, é dependente do controle temporal e espacial de divisão e expansão celular (Irish, 2010; Sablowski & Dornelas, 2013). Sabe-se que ele envolve dois mecanismos; inicialmente está associado à divisão celular, acarretando o aumento no número de células. Em seguida, a divisão celular cessa e tal processo se torna dependente da expansão das células (Irish, 2010). Entretanto, a interação

entre esses dois mecanismos celulares dentro do contexto de desenvolvimento floral é pouco compreendido (Krizek, 2009; Schiessl *et al.*, 2014).

1.2. O gene *SCI1* e o desenvolvimento do estigma e do estilete de *Nicotiana tabacum* L.

Interessado em estudar aspectos do desenvolvimento floral e reprodução das Angiospermas, nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Biologia Molecular de Plantas – FFCLRP-USP, coordenado pela Prof. Dra. Maria Helena de Souza Goldman), utiliza a espécie *Nicotiana tabacum* L. como modelo. Conhecida popularmente como tabaco, essa angiosperma é uma herbácea da família Solanaceae, que se reproduz preferencialmente por autogamia. É originada da hibridação entre as espécies diplóides ($2n = 2x = 24$) *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosiformis*, formando um alotetraplóide ($2n = 4x = 48$) (Yukawa *et al.*, 2006). *N. tabacum* é um modelo de estudo amplamente utilizado devido ao seu ciclo de vida relativamente curto (4-5 meses), devido à facilidade de seu cultivo *in vitro* e de sua transformação genética. É um modelo especialmente interessante para o estudo do desenvolvimento floral e reprodução, pois possui flores grandes, com órgãos florais facilmente identificáveis. Além disso, o desenvolvimento de sua flor foi dividido em 12 estádios, que já são descritos morfologicamente na literatura (Koltunow *et al.*, 1990). Entretanto, uma dificuldade relacionada à utilização de tabaco como modelo de estudo reside no fato dessa espécie não possuir seu genoma sequenciado. Apesar disso, alguns bancos de dados como o *The Gene Index (DFCI)* e o *Solanaceae Genomics Network (SOL)* disponibilizam sequências de *ESTs* (*expressed sequence tag*) e *TCs* (*tentative consensus*), incluído as sequências da biblioteca do *TOBEST*, que apresenta *ESTs* de genes expressos no estigma e estilete (Quiapim *et al.*, 2009).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa caracterizou um gene associado ao desenvolvimento floral de *N. tabacum* (DePaoli *et al.*, 2011). *SCI1* (*Stigma/Style Cell Cycle Inhibitor 1*) codifica uma pequena proteína de 154 aminoácidos, que possui 15 sítios putativos de fosforilação e se localiza na região do nucléolo (DePaoli *et al.*, 2011). Estudos de fenótipos de plantas transgênicas de silenciamento e superexpressão de *SCI1* mostram que este gene pode estar relacionado à inibição da proliferação celular durante o desenvolvimento do estigma e do estilete, afetando diretamente o tamanho desta região.

Plantas com superexpressão de *SCI1* apresentam estigma de tamanho reduzido em comparação a plantas selvagens. Em contrapartida, plantas com níveis de expressão de *SCI1* reduzidos, apresentam aumento da região estigmática e alongamento do estilete devido ao aumento no número de células nestes tecidos (DePaoli *et al.*, 2011). Adicionalmente, a modificação de tamanho observada no estilete em plantas silenciadas, levou à alteração da relação de altura entre estigma e anteras, que pode ter consequências diretas na eficiência reprodutiva nestas plantas, uma vez que a proporção entre esses órgãos é importante para a ocorrência de autopolinização que, como já mencionado acima, é a forma preferencial de reprodução em tabaco (Weiss *et al.*, 2005).

Pouco se sabe sobre a regulação do processo de modulação da forma e tamanho dos órgãos florais, que parece estar distante de sua completa elucidação. Por isso, a caracterização de novos genes associados ao desenvolvimento floral, como *SCI1*, traz à luz novas informações, que podem ser usadas na solução deste quebra-cabeça. Com o intuito de compreender esta via de sinalização e o papel de *SCI1* na inibição da proliferação celular, a identificação de parceiros de interação da proteína *SCI1* está sendo realizada por nosso grupo de pesquisa. Entre outras proteínas encontradas, tal estudo sugere que *SCI1* se ligue a duas 14-3-3s de tabaco, a 14-3-3A e a 14-3-3D. A 14-3-3D foi identificada como parceira de interação de *SCI1* em *screenings* de duplo-híbrido e de *pull-down*. Essa interação foi, posteriormente, confirmada por ensaios de duplo-híbrido par a par, BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) e co-imunoprecipitação (Strini, dados não publicados). A proteína 14-3-3A também foi encontrada em *screenings* de duplo-híbrido e de *pull-down*, no entanto, quando testada em duplo-híbrido par a par, esta interação não foi confirmada. Não foram encontradas outras proteínas 14-3-3s nos experimentos de *screening*, sugerindo que apenas a 14-3-3D e, possivelmente, a 14-3-3A interajam com *SCI1*. Para confirmar a interação entre *SCI1* e a 14-3-3A, ainda é necessária a validação dos dados obtidos no experimento de *pull-down*.

1.3. As proteínas da família 14-3-3

As proteínas da família 14-3-3 desempenham funções importantes na manutenção de processos celulares e bioquímicos por meio da interação com proteínas-alvo fosforiladas (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; de Boer *et al.*, 2013). Mudanças na atividade e

conformação de uma proteína, muitas vezes estimulando sua interação com outras moléculas, podem ser causadas por meio da fosforilação de aminoácidos específicos. No entanto, para algumas proteínas, essa fosforilação não é suficiente para causar alterações em suas propriedades bioquímicas. Nestes casos, a interação com uma proteína 14-3-3 é requerida para que essa mudança se complete (Chevalier, 2009; de Boer *et al.*, 2013). As 14-3-3s já foram associadas à modulação de um amplo número de proteínas e, por isso, participam na regulação dos mais variados processos biológicos, como: metabolismo, transcrição, ciclo celular, apoptose, tolerância a patógenos, entre outros (Aducci *et al.*, 2002; Obsilová *et al.*, 2008; Chevalier, 2009).

Essa família é formada por proteínas conservadas, codificadas por diferentes genes, apresentando notável similaridade entre as sequências nas diferentes espécies (Wang & Shakes, 1996; Aitken *et al.*, 2011). As 14-3-3s foram encontradas em todos os eucariotos analisados até o momento, mas parecem ser ausentes em procariotos (Fu, 2000; Obsilová *et al.*, 2008). Elas formam dímeros em sua conformação nativa, podendo ser homodímeros ou heterodímeros (Jones *et al.*, 1995). Cada monômero consiste de pouco mais que nove α -hélices em arranjo antiparalelo, formando um canal capaz de abrigar a região de ligação de uma proteína alvo (Xiao *et al.*, 1995). A região N-terminal dos monômeros forma a interface onde os dímeros são formados (Figura 2). Cada monômero é capaz de interagir com um sítio proteico diferente. Dessa maneira, é possível que um dímero de 14-3-3 interaja com dois sítios de uma mesma proteína ou com dois sítios de proteínas diferentes (Xiao *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2011). Essa característica confere às 14-3-3s a capacidade de estimular o contato físico entre duas proteínas, ou de alterar a atividade de uma proteína promovendo mudanças conformacionais, de localização subcelular ou por meio do encobrimento de um sítio específico (Xiao *et al.*, 1995; Yaffe, 2002; Smith *et al.*, 2011, Obsil & Obsilova, 2011). Os sítios aos quais as 14-3-3s se ligam são, preferencialmente, sítios fosforilados, que contém fosfoserinas ou fosfotreoninas (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997). Alguns desses sítios comumente reconhecidos por 14-3-3s já foram caracterizados, eles são chamados Mode I (RSX-pS/pT-XP), Mode II (RXXX-pS/pT-XP) e Mode III (pS/pT-X-COOH) (Coblitz *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011). No entanto, sabe-se que muitas proteínas que interagem com 14-3-3s apresentam sequências que desviam consideravelmente destes consensos, podendo inclusive, não conter fosforilações (Aitken, 2011; Obsil & Obsilova, 2011).

Figura 2. **Estrutura de um dímero de 14-3-3** (Modificado de Ferl, 2004).

A sequência das diferentes isoformas das 14-3-3s pode ser dividida em três partes: uma região N-terminal variável, uma região central muito conservada e uma região C-terminal variável (Ferl, 2002; Obsil & Obsilova, 2011). A presença de uma porção grande com elevado grau de conservação entre as diferentes isoformas sugere que estas proteínas apresentem uma sobreposição de funções em um mesmo organismo (Aitken, 2011). As variações encontradas na região C-terminal seriam responsáveis por alguma especificidade no reconhecimento de proteínas-alvo (Finnie *et al.*, 1999), enquanto as variações na região N-terminal poderiam limitar o número de combinações de dímeros formados, aumentando também a especificidade destas proteínas, uma vez que os diferentes dímeros podem possuir afinidade por proteínas diferentes (Aitken, 2011; Obsil & Obsilova, 2011).

O número de isoformas de 14-3-3 presentes no genoma varia entre as diferentes espécies. Leveduras possuem apenas duas, enquanto em mamíferos sete isoformas foram identificadas (Chevalier, 2009). Em plantas este número é maior, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, que possuem genomas sequenciados há algum tempo, apresentam 13 e 8 isoformas, respectivamente. Em *Solanum lycopersicum*, que teve seu genoma sequenciado mais recentemente, foram identificadas 12 isoformas até o momento. Em *N. tabacum*, 9 isoformas estão depositadas no *NCBI*, mas esse número pode ser maior uma vez que seu genoma ainda não foi sequenciado (Rosenquist *et al.*, 2001; Konagaya *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2007; lancs.ac.uk/staff/robertmr/tft_ests.htm). Tais proteínas estão envolvidas em vias inerentes ao metabolismo das plantas, como a inativação da nitrato redutase, a regulação

do metabolismo de carboidratos e a regulação de bombas de H^+ - ATPase, além disso, desempenham funções na importação e exportação de proteínas nas organelas, no controle transcricional em respostas ao estresse e à resistência a patógenos (revisado em Roberts, 2000; Aducci *et al.*, 2002; Chevalier *et al.*, 2009; Denison *et al.*, 2011).

Estudos em *Arabidopsis* e em arroz relacionaram algumas 14-3-3 ao processo de transição entre o estado vegetativo e o florescimento (Paul *et al.*, 2008; Taoka *et al.*, 2011), mas nada se sabe sobre a função destas proteínas no processo de modulação da forma e tamanho dos órgãos florais. Em outros organismos, como leveduras e mamíferos, essas proteínas desempenham função bem estabelecida na regulação do ciclo celular (Gardino & Yaffe, 2011). Nestes organismos, a quinase Cdk1 é responsável pela progressão do ciclo durante o checkpoint G2/M. Ela é mantida inativa devido à fosforilação pela quinase Wee-1. Entretanto, a fosfatase Cdc25 tem função na desfosforilação de determinados resíduos, levando a ativação da Cdk1 e a consequente entrada na mitose. Quando um dano no DNA é identificado pela célula, a fosfatase Cdc25 é fosforilada pela quinase Chk1. Em seguida, uma 14-3-3 reconhece esse sítio fosforilado, levando à inibição da Cdc25 por meio de sua transferência para o citoplasma. Como consequência, ocorre o aumento da quantidade de Cdk1 fosforilada pela quinase Wee-1 no núcleo, o que impede a progressão para a mitose (Peng *et al.*, 1997; Lopez-Girona *et al.*, 1999; Gardino & Yaffe, 2011). Além de se ligar a Cdc25, as 14-3-3s também se ligam a Wee-1, levando a distribuição homogênea desta quinase no núcleo celular, aumentando sua atividade catalítica e levando, assim, a um forte bloqueio do ciclo celular (Gardino & Yaffe, 2011). Em plantas, a função das 14-3-3s na inibição do ciclo celular é pouco estabelecida e, aparentemente, a putativa Cdc25 de *A. thaliana* não apresenta as mesmas funções descritas para seus homólogos, indicando que a regulação do ciclo celular em plantas é potencialmente diferente do observado para outros eucariotos (Dissmeyer *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013). Apesar disso, experimentos realizados por Sorrel e colaboradores (2003) comprovam que as proteínas 14-3-3 de *A. thaliana* GRF2, GRF6 e GRF8 (GRF – *general regulatory fator*) são capazes de se ligar à Cdc25 de *Schizosaccharomyces pombe*. Foi demonstrado também que as GRF1, GRF2, GRF4, GRF5 e GRF9 de *Arabidopsis* são capazes de recuperar o mutante de levedura *rad24⁻* (o gene Rad24 em leveduras codifica uma proteína 14-3-3 que se liga à Cdc25 durante o checkpoint G2/M) (Kuromori & Yamamoto, 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que a GRF2 é capaz

de se ligar a proteína WEE-1 de *Arabidopsis* (Grønlund *et al.*, 2009), além de ser preferencialmente expressa em regiões com intensa divisão celular, como flores e raízes (Sorrel *et al.*, 2003). Dessa forma, é possível que as 14-3-3s desempenhem função de regulação do ciclo celular também em plantas, o que pode relacioná-la aos processos de proliferação celular durante o desenvolvimento.

Levando em consideração o cenário apresentado anteriormente, no qual o gene *SCI1* desempenha um papel importante na modulação do tamanho final do estigma e do estilete por meio da inibição da proliferação celular; e o atual conhecimento a respeito das proteínas da família 14-3-3 em plantas e de suas possíveis funções na regulação do ciclo celular, a caracterização das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de tabaco, focando em sua interação com *SCI1*, pode ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos associados ao crescimento em plantas, mais especificamente, os relacionados ao desenvolvimento floral.

2. Objetivos

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo estudar as proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *Nicotiana tabacum* e investigar seu papel durante o desenvolvimento floral. Adicionalmente, foram investigados alguns aspectos relacionados à interação dessas 14-3-3s e SCI1. Para tal, este estudo tentou responder especificamente as seguintes questões:

- Qual a localização subcelular das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum*?
- Essas proteínas 14-3-3 são capazes de formar homodímeros e heterodímeros entre si? Onde esses dímeros se localizam dentro da célula?
- A proteína 14-3-3A é capaz de interagir com SCI1 *in vivo*?
- Quais são os sítios de reconhecimento por 14-3-3s na sequência de SCI1?
- Quais são as proteínas ortólogas às 14-3-3A e D no genoma de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* e *N. benthamiana*?
- Plantas transgênicas de *N. tabacum*, silenciadas para 14-3-3A ou 14-3-3D, apresentam alterações fenotípicas na flor?

3. Material e Métodos

3.1. Material Vegetal

Neste estudo foram utilizadas plantas da espécie *Nicotiana tabacum*, cultivar Petit Havana SR1 e também plantas de *Nicotiana benthamiana*. As sementes de *N. tabacum* foram germinadas *in vitro* sob condições estéreis, como descrito no item 3.12.1. As sementes de *N. benthamiana* foram distribuídas em placas de Petri contendo substrato *Bioplant*, de fabricação comercial, e fertilizante. Após semeadura, foram mantidas em câmara de germinação com temperatura (22°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas. Plantas com aproximadamente 2 cm de tamanho foram transferidas para saquinhos contendo o mesmo substrato, ainda mantidas na câmara de germinação até sua utilização.

3.2. Sequências dos genes *14-3-3A* e *14-3-3D*

As sequências codificadoras dos genes *14-3-3A* e *14-3-3D* de *N. tabacum*, usadas no presente trabalho, foram amplificadas a partir de clones identificados no *screening* de uma biblioteca de cDNAs em vetor de duplo-híbrido, realizado para identificar parceiros de interação de SCI1 (Strini et al, em preparação). Estes clones, denominados D9.1 e H6.1, foram completamente sequenciados em nosso laboratório, previamente ao início deste trabalho. Eles contêm as sequências 5'UTR, codificadora e 3'UTR dos genes *14-3-3A* e *14-3-3D*. O clone D9.1 possui 1120 pares de base (pb), apresentando região codificadora de 768 pb. Sua sequência de nucleotídeos é igual à depositada no NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) para o gene *14-3-3A* de *N. tabacum* (número de acesso - AB119466) e codifica a proteína correspondente de 255 aminoácidos (número de acesso - BAD12168). A sequência do clone H6.1 possui 1053 pb, sendo 750 pb correspondentes à região codificadora, sua sequência de nucleotídeos é muito semelhante às identificadas no NCBI como *14-3-3D1* e *14-3-3D2* (número de acesso - AB119471 e AB119472), codificando a proteína de 249 aminoácidos, altamente semelhante as D1 e D2 de *N. tabacum* depositadas no NCBI (número de acesso - BAD12173 e BAD12174). O alinhamento dos clones D9.4 e H6.1 com tais sequências do NCBI podem ser visualizados no Anexo 1.

3.3. Obtenção de construções gênicas

As construções gênicas foram produzidas por meio do Sistema Gateway de recombinação (*Invitrogen*). Este sistema é baseado em reações de recombinação sítio-específica que ocorrem naturalmente no fago λ . Sequências de DNA contendo sítios de recombinação (att) podem ser transferidas para vetores contendo sítios compatíveis (Karimi *et al.*, 2002). A primeira reação de recombinação para entrada no Sistema Gateway é a reação BP, onde há recombinação dos sítios attB1 e attB2, que flanqueiam a sequência de DNA de interesse, com os sítios attP1 e attP2 presentes no vetor de entrada (attB1 X attP1; attB2 X attP2). Após a reação BP, os sítios de recombinação que flanqueiam o DNA de interesse, em vetor de entrada, passam a ser chamados de attL1 e attL2. Sequências de DNA de interesse clonadas em um vetor de entrada podem, facilmente, ser transferidas para diversos vetores de expressão construídos para uso no Sistema Gateway, os chamados vetores de destino. Neste caso, uma nova reação de recombinação é realizada, a reação LR. Os sítios attL1 e attL2 que flanqueiam o DNA de interesse recombinaem com os sítios attR1 e attR2 presentes nos vetores de destino (attL1 X attR1; attL2 X attR2), transferindo a sequência de interesse para o vetor de expressão específico.

3.3.1. Adição de sítios attB

Dentre os fragmentos utilizados em construções gênicas neste estudo, foi necessário inserir no Sistema Gateway apenas as seguintes sequências: 1) sequência codificadora (CDS) da 14-3-3A completa; 2) CDS da 14-3-3A sem códon de terminação; 3) sequência selecionada para o silenciamento gênico da 14-3-3A (RNAi-A); e 4) sequência selecionada para o silenciamento gênico da 14-3-3D (RNAi-D) (informações a respeito das sequências 3 e 4 podem ser encontradas no item 3.3.4.). Outros fragmentos aqui utilizados já se encontravam em vetores de entrada do Sistema Gateway quando este estudo foi iniciado.

Para que uma sequência gênica seja inserida em um vetor de entrada é necessário que esta possua os sítios de recombinação attB1 e attB2. Esses sítios possuem tamanho de 31pb e 30pb, respectivamente. Em nosso laboratório, já existem *primers* para inserção de ambos os sítios, contendo a sequência completa de cada um. A partir disso, a inserção destes sítios nos fragmentos de interesse foi feita por meio de duas PCRs (*polymerase chain reactions*): a primeira (PCR1) foi realizada com um par de *primers* que cobrem parte da

sequência de interesse e parte dos sítios attB, e a segunda (PCR2) utilizando os *primers* BP (com as sequências completas de cada sítio). Os *primers* utilizados nestas reações estão relacionados na tabela 1.

As reações de PCR1 foram realizadas com 10ng de DNA molde (descrito no item 3.2), 1μL de dNTPs (10mM), 2μL de *primer* senso (5pmoles/μL), 2μL de *primer* antisenso (5pmoles/μL), 0,5μL de enzima *Phusion High Fidelity DNA Polimerase* (BioLabs), 10μL de 5X Buffer HF (acompanha a enzima) e água milli-Q autoclavada em quantidade suficiente para completar 50μL de volume final. O programa usado foi: um passo inicial de desnaturação a 98°C por 30 segundos, passando para 34 ciclos de 10 segundos a 98°C (desnaturação), 30 segundos a temperatura de pareamento (57°C para as sequências de silenciamento e 60°C para a CDS da 14-3-3A), 40 segundos a 72°C (extensão) e um passo final de 72°C por 10 minutos. Em seguida, 40μL de cada reação foram aplicados em gel de agarose (ultrapura - *Invitrogen*) 1%, corado com brometo de etídio (1ng/mL). Após eletroforese (procedimento descrito no item 3.7), os fragmentos de tamanho esperado foram recortados e purificados com o *Gene Jet Gel Extraction Kit* (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante.

O DNA molde para as reações de PCR2 foram os produtos gerados pela purificação das bandas das PCRs1. As reações foram realizadas como descrito para a PCR1, no entanto, a temperatura de pareamento dos *primers* foi de 57°C em todas as reações. Em seguida, o produto das PCRs foi aplicado em gel e purificado da mesma maneira como descrito anteriormente. A concentração das amostras de DNA foi mensurada em *NanoDropTM 1000* (*Thermo Scientific*).

Tabela 1. *Primers* utilizados para inserção dos sítios attB1 e attB2 nos fragmentos a serem clonados no vetor de entrada do Sistema Gateway. A parte sublinhada equivale às bases de pareamento dos *primers* com cada fragmento de interesse a ser amplificado, o restante da sequência equivale aos sítios attB.

PCR	Fragmento	Primer	Sequência 5' – 3'
PCR1	CDS 14-3-3A	LTB-NT-D9.4-FW	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGATAGAACC <u>ATG</u> <u>GCATCGCCGCGCGAG</u>
		LTB-NT-D9.4-RV	AAGCTGGGTCTTACTGCTGCTCCTCCGCTT
	CDS 14-3-3A s/ stop codon	LTB-NT-D9.4-FW	GCAGGCTTCGAAGGAGATAGATAGAACC <u>ATG</u> <u>GCATCGCCGCGCGAG</u>
		LTB-NT-D9.4-S/S-RV	AAGCTGGGTCTCTGCTGCTCCTCCGCTTTT
	RNAi-A	1433A.NT.RNAi-FW	GCAGGCTTCTATTGA <u>ACTCTCCTGACCGTG</u>
		1433A.NT.RNAi-RV	AAGCTGGGTCTCGGAGCATCAAATACAAGGG
	RNAi-D	1433D.NT.RNAi-FW	GCAGGCTTCCTTGAAGATGAAGGGAGA
		1433D.NT.RNAi-RV	AAGCTGGGTCTGCATACGTAGATTACAGAG
PCR2	Todos	BP1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC
		BP2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC

3.3.2. Reações BP

Após obtenção de fragmentos de interesse flanqueados com sítios attB1 e attB2, estes foram inseridos no vetor pDONR221 (vetor de entrada do Sistema Gateway, Figura 3) por meio de reações BP. As reações BP foram realizadas com o *Gateway BP Clonase Enzyme Mix (Invitrogen)*. Nestas reações foram utilizadas 120 ng de inserto, 100 ng do vetor pDONR221, 2 µL de *5X BP Clonase Reaction Buffer (Invitrogen)*, 1 µL de *Gateway BP clonase Enzyme Mix (Invitrogen)* e água milli-Q estéril em volume suficiente para completar 10 µL de volume final. A reação foi mantida a temperatura ambiente *overnight*. Após esse período, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2µg/ µL) e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C para inativação da enzima.

Após reações BP, o DNA plasmidial gerado foi multiplicado e selecionado em *Escherichia coli*. Para tal, após a transformação de bactérias eletrocompetentes da cepa DH10B com o produto da BP, as células transformadas foram cultivadas em meio seletivo, permitindo, assim, a triagem de colônias bacterianas que possuíam vetor com inserto de interesse. Em seguida, algumas colônias isoladas foram escolhidas para multiplicação em

meio líquido seletivo. O DNA plasmidial foi extraído dessas culturas, e foram realizadas checagens da construção com endonucleases de restrição e sequenciamento (todos os procedimentos estão descritos detalhadamente no tópico 3.4). Apenas construções que apresentaram padrão de digestão adequado e sequência sem alterações de nucleotídeos foram utilizadas em reações LR subsequentes.

Figura 3. **Mapa do vetor pDONR221 (Invitrogen), de entrada no sistema Gateway de recombinação.** O vetor apresenta o gene que confere resistência à canamicina para seleção em bactérias. Os sítios attP1 e attP2 flanqueiam o gene *ccdB* (que inibe o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*) e o gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*). Após reação BP, os genes *ccdB* e *CmR* são substituídos pelo fragmento de interesse.

3.3.3. Reações LR

Neste estudo foram realizados dois tipos de reações LR: a recombinação para sítio simples e a recombinação para sítios múltiplos. No primeiro caso, um fragmento contido em um vetor pDONR221 foi transferido para um vetor de expressão específico. Para este tipo de reação foi utilizada a enzima *LR Clonase II (Invitrogen)*. Recombinações para sítio simples foram feitas com a adição de 150 ng de vetor de entrada (construção em pDONR221), 150 ng de vetor de destino, 1 µL de *LR Clonase II (Invitrogen)* e água milli-Q estéril para completar 5 µL de volume final. A mistura foi mantida *overnight* a temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2µg/ µL) e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C para inativação da enzima.

No caso de LR para sítios múltiplos, ocorre a recombinação de três insertos, contidos em vetores de entrada, em um único vetor de expressão. Os fragmentos entram no vetor de expressão em uma ordem pré-determinada devido à presença de diferentes sítios de recombinação tanto nos insertos quanto no vetor de destino. Esse tipo de reação foi

realizada apenas nas construções em fusão a *tail* e a *head* da GFP, descritas no próximo item. A reação foi feita com a adição de 60ng de cada um dos três vetores de entrada, 90ng de vetor de destino, 2 µL de *Clonase II Plus* e água milli-Q estéril para completar 10 µL. A mistura foi incubada a 25°C *overnight*. Após esse período, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2µg/ µL) e a reação foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 37°C para inativação da enzima.

Assim como descrito para as reações BPs, o produto das reações LR foi transformado e selecionado em *E. coli*. Após multiplicação, o DNA plasmidial foi extraído, checado por reação com endonucleases de restrição e sequenciamento (procedimentos descritos no item 3.4). Apenas construções que apresentaram padrão de digestão adequado, sequência sem alterações de nucleotídeos e em fase de leitura foram utilizadas em experimentos subsequentes.

3.3.4. Construções gênicas geradas

- Construções em fusão com GFP e RFP

Foram produzidas construções para expressão em células vegetais das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de tabaco em fusão C-terminal com a GFP (14-3-3A-GFP e 14-3-3D-GFP) e em fusão C-terminal com a RFP (14-3-3A-RFP e 14-3-3D-RFP). Nestas construções foram utilizados como insertos a CDS das 14-3-3A e D sem códon de terminação. Os vetores de destino utilizados foram pK7FWG2 (fusão com GFP) e pK7RWG2 (fusão com RFP) (Karimi *et al.*, 2002). Estes vetores permitem a expressão das proteínas de fusão, sob controle do promotor 35S, que garante taxa elevada de transcrição. Eles conferem resistência a canamicina em células vegetais e à espectomicina e à estreptomicina em células bacterianas. Essas construções foram utilizadas em análises de localização subcelular. Os mapas dos vetores pK7FWG2 e pK7RWG2 podem ser visualizados no anexo 2.

- Construções em fusão com a *head* e a *tail* da GFP

Foram produzidas construções para expressão de proteínas em fusão C-terminal à tailGFP (tGFP) e à headGFP (hGFP) (Bracha-Drori *et al.*, 2004) em células vegetais. Estas construções foram produzidas por meio da inserção em um vetor de expressão do promotor 35S, da CDS do gene interesse (sem códon de terminação) e de uma *tag* (hGFP ou tGFP)

nesta ordem. Para tal, foram utilizados os vetores pH7m34GW e pK7m34GW (<http://gateway.psb.ugent.be/>). Estes vetores conferem resistência à espectomicina e à estreptomicina em células bacterianas. Em células vegetais, o pH7m34GW confere resistência a higromicina e o pK7m34GW à canamicina. As construções em vetor de entrada contendo os insertos: promotor 35S, a tGFP e a hGFP; foram gentilmente cedidas por Dr. Lieven De Veylder (VIB, Universiteit Gent – Bélgica). Dessa maneira foram geradas as seguintes construções: 14-3-3D-hGFP e SCI1Mut1-hGFP (em pH7m34GW); 14-3-3A-hGFP e 14-3-3A-tGFP (em pK7m34GW). Essas construções foram utilizadas em experimentos de BiFC. Os mapas dos vetores pH7m34GW e pK7m34GW podem ser visualizados no anexo 2.

- Construções em fusão aos domínios BD e AD do fator de transcrição GAL4

Foram geradas construções para expressão em leveduras de proteínas em fusão N-terminal aos domínios AD (*Activation Domain*) e BD (*Binding Domain*) do fator de transcrição GAL4, para utilização em ensaio de duplo-híbrido. Foram utilizados a CDS completa das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D e os vetores pDEST32 e pDEST22, gerando as seguintes construções: AD-14-3-3A, BD-14-4-4A, AD-14-3-3D e BD-14-3-3D. O vetor pDEST32 apresenta o domínio BD, um gene da via de biossíntese de Leucina (LEU2) em leveduras e confere resistência a gentamicina em células bacterianas. O vetor pDEST22 apresenta o domínio AD, gene da via de biossíntese de triptofano (TRP1) em leveduras e confere resistência a ampicilina em bactérias. Os mapas dos vetores pDEST32 e pDEST22 podem ser visualizados no anexo 2.

-Construções para silenciamento gênico das 14-3-3A e D

Foram geradas duas construções para a produção de *hairpin* de RNA (*hpRNA*) visando a produção de duas linhagens de plantas transgênicas, sendo uma linhagem silenciada para a 14-3-3A (RNAi-A) e a outra silenciada para a 14-3-3D (RNAi-D). Tanto a construção para silenciamento da 14-3-3A quanto a de silenciamento para a 14-3-3D foram desenhadas visando a diminuição nos níveis de expressão destes genes especificamente, por isso, para tais construções foram selecionadas regiões de cada um dos genes que fossem menos conservadas entre os membros da família 14-3-3. Essas regiões foram identificadas por meio de alinhamentos realizados com o software *BioEdit*. As sequências selecionadas incluíram uma porção da região codificadora a 3' e uma região da sequência 3' UTR (sequências em

Anexo 3). O fragmento para a construção de silenciamento da 14-3-3A possui 399 nucleotídeos e foi inserido no vetor pK7GWIWG2(I). Este vetor possui um íntron clonado entre duas sequências de recombinação, as quais estão dispostas de maneira invertida entre si. Tal configuração permite a ocorrência de dois eventos independentes de recombinação, que resultam em duas sequências idênticas e complementares separadas por um íntron, permitindo a formação de um *hairpin* de RNA após transcrição (Karimi *et al.*, 2002). Este vetor confere resistência à canamicina em células vegetais e resistência à estreptomicina e espectinomicina em células bacterianas. O fragmento para a construção de silenciamento da 14-3-3D possui 432 nucleotídeos e foi inserido no vetor pH7GWIWG2(II). Este vetor possui configuração semelhante ao vetor descrito anteriormente, distinguindo-se deste por possuir junto à sequência do íntron uma sequência que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol, além disso, ele apresenta resistência à higromicina em células vegetais. Os mapas dos vetores pK7GWIWG2(I) e pH7GWIWG2(II) podem ser visualizados no anexo 2.

3.4. Multiplicação em *E. coli* e checagem de DNA plasmidial

3.4.1. Preparo de *E. coli* eletrocompetentes

Todos os procedimentos para o preparo de células competentes foram realizados em condições estéreis, em um fluxo laminar. As células de *E. coli* da cepa DH10B foram estriadas em meio LB sólido (a composição deste e de outros meio utilizados neste trabalho estão descritas no item 3.13) e incubadas a 37°C por 16-20 horas para o crescimento de colônias. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB líquido e incubada a 37°C e 220 rpm por 16-20 horas. No final desse período, 1 mL do inóculo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB líquido, que ficou a 37°C e 220 rpm de agitação até a cultura atingir absorbância a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,4 e 0,6. A cultura foi mantida no gelo por 30 minutos e depois foi transferida para 4 tubos de 50 mL cada, que foram centrifugados a 4000 rpm a 4°C em centrífuga *Eppendorf* (modelo 5810R) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensionado em 50 mL de água Mill-Q (*Millipore*) estéril e gelada. Os tubos foram centrifugados novamente por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 25 mL de água Mill-Q estéril. O volume total (100 mL) foi dividido em dois tubos de 50 mL, que foram novamente centrifugados a 4000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o

precipitado de cada tubo foi ressuspendido em 5 mL de glicerol 10% estéril, e os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições da centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de glicerol 10 % em cada tubo. O volume final (1 mL) foi dividido em alíquotas de 40 µL, posteriormente mantidas sob -80°C até o momento do uso.

3.4.2. Transformação de *E. coli* eletrocompetentes

Para a transformação de células de *E. coli* DH10B foi utilizada uma alíquota de células (40 µL) por eletroporação. Essa alíquota foi descongelada em gelo, e em seguida, foi adicionado a ela 1-2 µL do DNA de interesse. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 10 mm (*BioRad*) gelada. O conjunto foi submetido a um pulso elétrico de 1,8 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω durante 5 segundos, em eletroporador *GenePulse II* (*BioRad*). Após o pulso, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado para recuperar as células da cubeta, e todo o volume foi transferido para um tubo de ensaio. As células transformadas foram incubadas a 37°C e 200 rpm durante 40 minutos. Ao final desse período, 200-500 µL da cultura foram plaqueados em meio LB sólido complementado com antibióticos adequados para seleção do DNA plasmidial. A placa foi incubada a 37°C por 16-20 horas.

3.4.3. Multiplicação e Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi realizada por meio de dois métodos: lisozima e *Kit* comercial. A extração com lisozima foi realizada principalmente para a utilização do DNA em checagem de construções por meio de digestão com enzimas de restrição. A extração com o produto comercial, *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Fermentas*), foi realizada visando a obtenção de DNA de qualidade para utilizar em transformações e reações de sequenciamento. A extração com o *kit* foi realizada segundo as instruções do fabricante. Em ambos os métodos, a etapa inicial consistiu na multiplicação de uma colônia de *E. coli* contendo o DNA de interesse em meio LB líquido, suplementado com antibióticos adequados, a 37°C, por 16-20 horas e 220 rpm. A colônia inoculada pode ter sido obtida de uma placa resultante de transformação por eletroporação ou de estoques em glicerol. No primeiro caso, um estoque semipermanente em glicerol 25% foi feito para as colônias ainda

não estocadas precedendo a extração (Sambrook & Russell, 2001). Tais estoques foram armazenados a -80°C.

Para a extração com lisozima, um volume de 1,5 mL de cultura foi centrifugado a 13000 rpm, por 2 minutos (microcentrífuga *Eppendorf 5415 C*). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido uma vez. Depois de descartar o sobrenadante, o precipitado foi ressuscitado em 175 µL de tampão TES [Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; sacarose 15%]. Em seguida, foram adicionados 20 µL de lisozima (10 mg/µL), e a mistura ficou incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, seguidos de 15 minutos em banho-maria a 73°C. A mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos para a separação dos debris celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo os plasmídeos foi transferido a um novo tubo de 1,5 mL, onde houve a adição de 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado. A mistura ficou incubada a -80°C por 15 minutos, e em seguida o tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi feita uma lavagem com 400 µL de etanol 70%, o tubo foi novamente centrifugado a 13000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos foram mantidos abertos à temperatura ambiente até a evaporação total do etanol, e o DNA precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água deionizada estéril. As soluções contendo os plasmídeos foram armazenadas a -20°C.

3.4.4. Digestão com enzimas de restrição

Após transformadas e replicadas em *E. coli* (cepa DH10B), as construções foram checadas por meio de digestão com endonucleases de restrição. As digestões foram planejadas utilizando a ferramenta *NEBCutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>). Para cada digestão, o ideal foi escolher enzimas que possuíam sítios de clivagem dentro da sequência do inserto e também na sequência do vetor. Todas as digestões foram realizadas com enzimas da *New England BioLabs*, tampão adequado para cada enzima de restrição, RNase, *Bovine Serum Albumine* (BSA, quando recomendado pelo fabricante da enzima) e DNA plasmidial (pelo menos 1µg). Em seguida, o padrão de digestão do DNA foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% (item 3.7). O DNA com padrão de digestão adequado foi selecionado para checagem por sequenciamento.

3.4.5. Reações de Sequenciamento

Os sequenciamentos foram feitos pela Dr^a. Andréa Carla Quiapim da Silva, utilizando o sequenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os *primers* utilizados nas reações de sequenciamentos estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos *primers* utilizados no sequenciamento de acordo com a construção.

Construção	Primer	Sequência 5' – 3'
pDONR221-14-3-3A; pDONR221-14-3-3A s/ stop; pDONR221-RNAi-A e pDONR221-RNAi-D	M13-FW	GTAAAACGACGGCCAGT
	M13-RV	CAGGAAACAGCTATGAC
14-3-3A-GFP e 14-3-3D-GFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC
	GFP-RV	GAAGCACTGCACGCCGTAGGTC
14-3-3A-RFP e 14-3-3D-RFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC
	mRFP-RV	CTTGGTCACCTTCAGCTTGGC
14-3-3A-tGFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC
	Seq-tGFP	GTGTTCTGCTGGTAGTGGTCG
14-3-3A-hGFP; 14-3-3D-hGFP e SCI1Mut1-hGFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC
	Seq-hGFP	CAGCTTGCCGTAGGTGGCATC
AD-14-3-3A e AD-14-3-3D	p22-AD502-FW	TATAACGCGTTTGAATCATC
	p22-32-RV	AGCCGACAACCTTGATTCGAGAC
BDB-14-3-3A e BDB-14-3-3D	DEST32-FW	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
	p22-32-RV	AGCCGACAACCTTGATTCGAGAC
RNAi-A e RNAi-D	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC
	intron-RV	CCACTAAGCGTGACCAGATAAAC

3.5. Manipulação de *Agrobacterium tumefaciens*

A bactéria *A. tumefaciens* foi utilizada como intermediário na transformação genética de células vegetais. Esta estratégia foi utilizada em experimentos de expressão transiente em *N. benthamiana*, BiFC e na produção de plantas transgênicas de *N. tabacum*. O preparo de colônias de *A. tumefaciens* carregando uma construção de interesse envolveu procedimentos que serão descritos nos tópicos a seguir.

3.5.1. Preparo de *A. tumefaciens* eletrocompetentes

Células em estoque da cepa C58C1RifR (pGV2260) foram estriadas em uma placa contendo meio MAS sólido, que foi incubada a 28°C por 48 h. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB 2X líquido e incubada a 28°C e 150 rpm, por 16-20 horas. A cultura foi, então, centrifugada a 12000 rpm, a 4°C, por 1 minuto (centrífuga *Eppendorf 5810R*), e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuspensionado em 500 µL de ácido 4-(2-hidroxietil)-ácido-1-piperazina-etanossulfônico (HEPES) 1 mM e centrifugado novamente a 12000 rpm, em 4°C, por 1 minuto. Esse processo foi repetido duas vezes. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em 200 µL de glicerol 10% estéril, e o volume final foi dividido em alíquotas de uso de 40 µL, sendo mantidas a -80°C até o momento de uso.

3.5.2. Transformação de *A. tumefaciens* eletrocompetentes

A transformação de *A. tumefaciens* foi similar à de *E. coli* (descrita no item 3.4.2), porém existem algumas diferenças quanto às incubações. Após o pulso elétrico, as células foram incubadas a 28°C e 150 rpm, durante 4 horas. Após plaquear 50-200 µL da cultura em meio LB sólido, suplementado com antibióticos adequados para a seleção da construção de interesse, as placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

3.5.3. Extração de DNA plasmidial de *A. tumefaciens*

Uma colônia foi inoculada em meio LB suplementado com antibióticos para seleção do plasmídeo de interesse e incubada por 24 horas, a 28°C e 150 rpm. Caso o inóculo tenha sido feito a partir de uma placa de colônias recém-transformadas, foi feito também o estoque semipermanente em glicerol a 25%, que foi armazenado a -80°C. Inicialmente, um volume de 1,5 mL de cultura foi submetido à centrifugação por 2 minutos a 12000 rpm (microcentrífuga *Eppendorf 5415 C*). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 1 mL de Tampão I [NaCl 0,2 M em Tris-EDTA]. Foi realizada nova centrifugação por 2 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido mais uma vez. Depois de descartar o sobrenadante novamente, o precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de Tampão I, e foram acrescentados 200 µL de Solução I [NaOH 0,2 N; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%]. A mistura foi

homogeneizada e, em seguida, mantida em gelo por 15 minutos. Ainda no gelo, foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) gelado. A mistura foi homogeneizada manualmente e novamente mantida em gelo por 30 minutos. No final desse período, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm para separar os debris celulares do DNA plasmidial. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo, onde foi acrescido de 2 volumes de etanol, e depois mantido a -20°C por no mínimo 1 hora para ocorrer a precipitação do DNA. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70% e centrifugado novamente por 2 minutos nas mesmas condições anteriores. Depois de descartado o etanol, o tubo ficou aberto à temperatura ambiente até a evaporação total do etanol residual. O precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de água deionizada esterilizada.

3.5.4. Seleção das colônias positivas: checagem por PCR

Com o intuito de checar se as colônias de *A. tumafaciens* selecionadas realmente possuíam a construção de interesse, o DNA extraído de tais colônias foi utilizado como molde em PCR. Nesta reação foi utilizado um *primer* interno (dentro da região do fragmento de interesse) e um *primer* externo, que parecia na sequência do respectivo vetor de expressão. As PCRs foram feitas com 1 µL de DNA plasmidial, 5 µL de tampão de reação 5X (*Biotoools*), 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de *primer* senso e 1 µL de *primer* antisenso (5 µM cada), 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL da enzima *Biotoools DNA Polymerase* (1U/µL) e quantidade suficiente de água milli-Q estéril para completar o volume final de 50 µL. O programa estabelecido foi: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, passando para 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 1 minuto de pareamento dos *primers* (a temperatura variou de acordo com a construção) e 72°C por 1 minuto (extensão). Após os ciclos, a reação foi submetida a 72°C por 10 minutos e mantida a 10°C. Os produtos das PCRs foi utilizado em eletroforese em gel de agarose 1% (descrita no item 3.7) para análise dos fragmentos obtidos. O conjunto de *primers* e a temperatura de pareamento para cada checagem estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação de *primers* utilizados na checagem de colônias de *A. tumefaciens* por construção gênica.

Construção	Primer	Sequência 5' - 3'	*T _{pareamento}
14-3-3A-GFP; 14-3-3A-RFP; 14-3-A-hGFP e 14-3-3tGFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57°C
	LTB-NT-D9.4S/S-RV	AAGCTGGGTCCTGCTGCTCCTCCGCTTTT	
14-3-3D-GFP; 14-3-3D-RFP; 14-3-3D-hGFP e 14-3-3D-tGFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57°C
	AttB2H6.1-RV	AAGCTGGGTCAGCCTCGTCCATCTGCTCC	
SCI1Mut1-hGFP	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC	55°C
	qPCR-SCI1-RV	TCAGCCAAGTAGCAAATTCATTGT	
RNAi-A	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57°C
	qPCR-Nt9.4-RV	AAGCAAGAGGCTTCACTCACA	
RNAi-D	P35S-FW	ATGACGCACAATCCCACTATCC	57°C
	qPCR-NtH6.1-RV	TCAAGCCTCGTCCATCTGC	

* Refere-se à temperatura de pareamento utilizada para cada par de *primers*.

3.6. Manipulação de *Saccharomyces cerevisiae*

Células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da cepa PJ69-4a foram utilizadas em ensaios de duplo-híbrido. Para tal, foi necessário o preparo de células de levedura competentes e a transformação destas com a construção gênica de interesse. Tais procedimentos serão descritos nos tópicos a seguir.

3.6.1. Preparo de células de *S. cerevisiae* competentes

Células em estoque da cepa de leveduras PJ69-4a [MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ] (James *et al.*, 1996), que apresentam os genes repórteres HIS3 (para histidina), ADE2 (para adenina) e lacZ sob controle de promotores que respondem ao fator de transcrição GAL4, foram estriadas em placa de Petri contendo meio YPAD sólido, que foi então incubada a 30°C por 48 horas. Dessa placa, foi selecionada uma colônia isolada que foi inoculada em 20 mL de meio YPAD líquido e incubada *overnight* a 30°C e 200 rpm. Na manhã seguinte, a cultura foi diluída em dois Erlenmeyers contendo 150 mL de meio YPAD líquido cada, e a mistura foi incubada a 30°C e 200 rpm até atingir OD₆₀₀ ≥ 0,5. Posteriormente, a cultura foi dividida em 6 tubos de 50 mL e as células foram centrifugadas a 3000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R) por 5

minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado celular de cada tubo foi ressuspensionado em 5 mL de água deionizada esterilizada. Ao final desse processo, as soluções foram divididas em dois tubos de 50 mL, que foram novamente centrifugados durante 5 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em cada tubo com 750 µL da solução [TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 1 mM); LiAc 1X (acetato de lítio 100 mM; TE 0,5X)]. Foram adicionados a essa mistura 500 µL de glicerol 80%, e as células foram armazenadas em alíquotas de uso de 50 µL a -80°C.

3.6.2. Co-transformação de *S. cerevisiae* por choque térmico

Uma alíquota de 50 µL de células competentes de levedura PJ69-4a foram descongeladas em gelo, até o momento do uso, quando foram adicionados 500 ng de cada um dos DNAs de interesse e 5 µL de DNA de esperma de salmão 10 mg/mL previamente desnaturado a 100°C por 5 minutos. À mistura foram adicionados 300 µL de solução de PEG/LiAc [TE 1X; LiAc 1X; Polietileno-glicol-3350 (PEG-3350) 40%]. O tubo foi incubado em banho-maria a 30°C por 30 minutos e, após esse período, transferido para um banho-maria a 42°C, onde ficou por 15 minutos. O tubo foi então centrifugado a 7000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente (microcentrífuga Eppendorf 5415 D). O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado celular foi ressuspensionado em 200 µL de solução de NaCl 0,9%. A solução contendo as células transformadas foi plaqueada em meio SC – Leu –Trp sólido, e a placa foi incubada a 30°C por 48-72 horas.

3.7. Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE 0,5X [Tris-base 50 mM; ácido bórico 50 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0]. A mistura [TBE 0,5X; agarose 1%] foi aquecida em forno micro-ondas para a dissolução da agarose. Em seguida, a mistura foi ligeiramente resfriada e acrescida de brometo de etídio em concentração final de 1 ng/mL. Após a adição deste intercalante de DNA, a mistura foi colocada em um molde adequado para gel de agarose e para a formação dos poços para a aplicação de amostras. Depois de solidificado, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5X em quantidade suficiente para recobrir todo o gel. As amostras de DNA foram

preparadas com a adição de tampão de carregamento [azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol 0,25 %; Ficoll] 6X, em volume suficiente para sua concentração final na amostra ficar 1X. O marcador utilizado foi o *1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)*. Depois de aplicadas as amostras, o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100V durante 90-120 minutos. Após a eletroforese, o gel foi transferido ao sistema *Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak)*, no qual foi exposto à luz UV e teve sua imagem capturada.

3.8. Quantificação de ácidos nucleicos

A quantificação de amostras de DNA e de RNA foi realizada em *NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific)*, cedido gentilmente pela Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões (FFCLRP-USP). Para as dosagens, foram utilizados 2 µL de cada amostra. O grau de pureza das amostras foi considerado e analisado pelas razões A260nm/A280nm e A260nm/A230nm. Para a razão 260/280, as amostras foram consideradas “puras” quando o valor era próximo a 1,8 e 2,0, para amostras de DNA e RNA, respectivamente. Razões menores do que estes valores podem indicar presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem a luz em 280nm. Para a razão A260nm/A230nm, valores entre 2,0 – 2,2, tanto para DNA quanto para RNA, indicam amostras livres de outros contaminantes que absorvem a luz próximo ao comprimento de 230 nm, como EDTA e fenol.

3.9. Análise de sítios de interação com proteínas 14-3-3s na sequência de SCI1

Com o intuito de identificar sítios de reconhecimento por proteínas 14-3-3s na sequência de aminoácidos de SCI1, foi realizada uma análise *in silico* por meio do software online *MotifScan* (disponível em http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml). A análise foi feita à procura de sítios Mode I, uma vez que este software só disponibiliza a busca por este sítio. Ela foi feita em todos os níveis de restringência disponíveis.

3.9.1. Mutação de sítios putativos de interação com 14-3-3s em SCI1

Os sítios encontrados por meio do software *MotifScan* foram mutados com a intenção de eliminar serinas passíveis de fosforilação e que seriam alvo de reconhecimento pelas proteínas 14-3-3. Por coincidência, um dos sítios identificados já havia sido mutado na

sequência de SCI1 pelo Dr. Henrique Cestari DePaoli em outra ocasião. O sítio RSSPSSP teve todas as serinas mutadas para alaninas e foi utilizado então neste trabalho, sendo a sequência de SCI1 com esta mutação denominada SCI1Mut1. Adicionalmente, foram geradas mais duas sequência de SCI1 apresentando alterações, a denominada SCI1Mut2 possui a região SHSS mutada para AHAA, enquanto a denominada SCI1Mut3 apresenta as duas alterações presentes nas seqüências mutadas em Mut1 e Mut2. As regiões que sofreram mutação podem ser visualizadas na Figura 4.

MGSDKKTPEEKRKHKR**RSSPSSP**RDEVKSKRQNIKGDEERRKEKKDKSKKEKHK**SHSS**EEKKS
 GEKHKTSHKHKDKSKNKFEELSKDDYFSKNNEFATWLKDKKNLFFSDLSETARDLFSDFV
 IQWNKGKLD SQYYEGIATGPRSSHAWNKK

Figura 4. **Sequência de aminoácidos de SCI1, apresentando os sítios que foram alvos de mutações em destaque.** O sítio RSSPSSP foi mutado para RAAPAAP e o sítio SHSS foi mutado para AHAA.

As mutações para originar SCI1Mut2 e SCI1Mut3 foram realizadas com o *Kit QuickChange (Stratagene)*. Como molde para a PCR mutagênica foram utilizadas as sequências codificadoras de SCI1 e SCI1Mut1 inseridas no vetor de entrada do Sistema Gateway pDONR201. Os *primers* utilizados em tais PCRs foram: SCI1Mut2-FW – 3'-GAAGGAGAAGCACAAAGCCCATGCTGCTGAAGAGAAGAAGTCAGG-5' e SCI1Mut2-RV – 3'-CCTGACTTCTTCTCTTCAGCAGCATGGGCTTTGTGCTTCTCCTTC-5'. As reações utilizaram: 5 µL de *Buffer 10X* (fornecido pelo *Kit*), 1,7 µL de cada *primer* (estoque a 5 µM), 1 µL de dNTPs (fornecido pelo *Kit*), 1 µL de DNA molde, 1 µL da enzima Pfu Turbo (2,5U/ µL *Stratagene*) e água milli-Q autoclavada para completar 50 µL. As temperaturas de ciclagem utilizadas foram: 95°C por 30 segundos, seguidos de 16 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos e 68°C por 4 minutos. Em seguida, as reações foram colocadas em gelo por 2 minutos. Posteriormente, 1 µL da enzima DpnI (10U/ µL) foi adicionada ao produto da PCR. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C, o que permitiu a digestão apenas das fitas parentais do DNA molde usado na PCR. Em seguida, 1 µL do DNA resultante foi introduzido em células de *E. coli* DH10B, e checado com enzimas de restrição e sequenciamento. A sequência de SCI1Mut1 em pDONR201 foi utilizada na produção da construção SCI1Mut1-hGFP, que permitiu a análise por BiFC da interação entre SCI1Mut1 e as 14-3-3s A e D.

3.10. Expressão transiente em *N. benthamiana* e *N. tabacum* – Ensaios de localização subcelular e BiFC

A expressão transiente de proteínas em folhas de *N. benthamiana* e *N. tabacum* foi utilizada na realização de experimentos de localização subcelular e em ensaios de interação entre proteínas por BiFC. Para tal, foram utilizadas colônias de *A. tumefaciens* transformadas com as construções de interesse (descritas em 3.3.4), que foram inoculadas, do estoque em glicerol, em meio LB complementado com antibióticos e cultivadas por 48 horas, a 28°C e 150 rpm de agitação. No final desse período, 5 mL de cada cultura foram centrifugados a 8000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 500 µL de tampão [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) 10 mM; MgCl₂ 10 mM]. O processo foi repetido e, após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi novamente ressuspensionado em 500 µL do mesmo tampão. Nesse ponto, a OD₆₀₀ das células foi medida e, em seguida, a solução de células para a infiltração foi preparada. Para tal, as células foram diluídas em tampão [MES 10 mM; MgCl₂ 10 mM] para absorbância de aproximadamente 0,3. A esta mistura foi adicionada acetoseringona para concentração final de 10 mM, completando assim, a solução de infiltração. Para os experimentos de BiFC, tal solução deve conter células de *A. tumefaciens* de ambas as construções de interesse (com a hGFP e a tGFP). Neste caso, a absorbância da solução seria de 0,3 para cada cultura, totalizando 0,6.

Na porção abaxial das folhas de *N. benthamiana* e *N. tabacum* foram feitas pequenas incisões, através das quais a solução de células foi infiltrada, com o auxílio de uma seringa de 1 mL estéril. Após infiltradas, as folhas foram identificadas com etiquetas, para diferenciá-las das folhas que não haviam sido transformadas. As plantas foram deixadas a temperatura ambiente e expostas à luz natural de 48 a 72 horas. Após esse período, as folhas foram seccionadas em quadrados de aproximadamente 0,5 X 0,5 cm, colocadas em placas de Petri, e embebidas em 2 mL de 4',6-diamino-2-fenilindol -DAPI (2,5 µg/mL), sendo cobertas com papel alumínio para evitar a degradação do marcador. Em seguida, elas foram submetidas à 5 minutos de vácuo (a 15 mmHg). Esse passo permite a penetração do DAPI nas células e a formação do complexo com a molécula de DNA. Após a aplicação do vácuo, as placas, ainda cobertas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente,

lavadas com PBS 1X (tampão salina – Fosfato, de fabricação comercial LGC). Após a lavagem, os cortes foram mantidos em PBS 1X até o momento da visualização.

A visualização foi realizada em microscópio confocal (Leica SP5 ou Leica SP2, FMRP-USP). A captura de imagens dos diferentes fluoróforos foi realizada de maneira independente (em configuração *between frames*) para evitar *crosstalking*. Para a visualização do DAPI, a excitação foi feita com laser ultravioleta, no comprimento de onda de 405nm e a detecção da fluorescência foi feita no intervalo de 410-475 nm. Para a GFP, a excitação foi feita com laser de argônio, no comprimento de onda de 488 nm e a captura foi feita no intervalo entre 495-550nm. No caso da RFP, a excitação foi realizada com laser HeNe (Helium-Neon) a 543 nm e as imagens foram capturadas em uma janela de 600 a 680 nm. As imagens de diferentes canais foram sobrepostas no software do próprio confocal. Além disso, escala foi colocada no software *ImageJ*.

3.11. Ensaios de duplo-híbrido em leveduras

O ensaio de duplo-híbrido em leveduras (*Yeast Two-Hybrid*) foi utilizado para verificar a interação entre proteínas. Para tal, foram utilizadas construções (descritas em 3.3.4) utilizando as sequências codificadoras dessas proteínas em ambos os vetores pDEST32 e pDEST22, que permitem, respectivamente, a fusão aos domínios BD e AD do fator de transcrição Gal4. Neste experimento, foram utilizados três controles de interação (*kit ProQuest™ Two-Hybrid System, Invitrogen*), além de controles de auto-ativação. Os controles de interação do kit consistem na proteína de rato Krev1 associada ao BD e três versões do domínio de associação à ras da proteína RalGDS ligados ao AD. As três versões do domínio de associação à ras apresentam diferentes afinidades pela Krev1 fornecendo três tipos de controles: a sequência selvagem da proteína fornece um controle de interação forte (+++); a sequência com uma mutação na posição I77 para T77 que altera parcialmente a interação serve de controle para interações fracas (+), e a sequência com uma mutação na posição L65 para P65, que inativa a interação, serve, portanto, como controle negativo (-). Os controles de auto-ativação consistiram de leveduras co- transformadas com uma construção e um dos vetores pDEST32 e pDEST22 vazios ($\emptyset$), para testar se estava havendo ativação do sistema pelas proteínas que seriam testadas. Também foram incluídos controles com os vetores pDEST32 e pDEST22 vazios juntos.

Os ensaios realizados envolveram a co-transformação dos pares de construções a serem testadas em células de *S. cerevisiae*, cepa PJ69-4a, como descrito no item 3.6. Uma colônia oriunda de cada transformação, incluindo os controles, foi inoculada em meio SC – Leu –Trp líquido, e os inóculos foram incubados *overnight* a 30°C e 200 rpm. Após a incubação, foi medida a OD₆₀₀ de cada cultura, e as mesmas foram diluídas para uma OD₆₀₀ de 0,2 em meio SC –Leucina (Leu) –Trp (Tryptofano) para um volume final de 250 µL. Essas diluições foram feitas em microplacas de 96 poços, na linha A. Nas linhas C, E, G e H foram feitas diluições consecutivas de 1:5, resultando em OD₆₀₀ de 0,04; 0,008; 0,0016 e 0,00032, respectivamente. O conteúdo das microplacas foi replicado em placas contendo diferentes meios de cultura para avaliar as interações. O meio SC –Leu – Trp foi utilizado como controle para o crescimento das leveduras, uma vez que o vetor pDEST32 possui o gene LEU2 e o pDEST22 o gene TRP1. Também foi utilizado o meio SC –Leu –Trp –His (histidina) para avaliar se a transcrição do gene repórter HIS3 está sendo ativada, o que indica a ocorrência da restauração do fator de transcrição GAL4, por meio da interação entre as proteínas testadas.

3.12. Transformação de plantas e análise das plantas transgênicas

Foram produzidas duas linhagens de plantas transgênicas estáveis de tabaco, uma silenciada para o gene *14-3-3A* (RNAi-A) e a outra silenciada para o gene *14-3-3D* (RNAi-D). O silenciamento gênico foi alcançado via interferência por RNA, utilizando as construções e estratégia de silenciamento descritas em 3.3.4. As etapas de transformação e regeneração de plantas, além das análises realizadas com tais transgênicos serão descritas a seguir.

3.12.1. Obtenção de *N. tabacum* em condições estéreis

Em um tubo de 1,5 mL, sementes de *Nicotiana tabacum* (cultivar Petit Havana SR1) foram imersas em 1 mL de etanol 70% (preparado com água milli-Q estéril) por 1 minuto. O etanol foi retirado e, posteriormente, foram adicionados 700 µL de hipoclorito de sódio (4-6%, *Sigma*), as sementes foram deixadas nesta solução por 40 minutos, sob agitação em vortex. Em seguida, o hipoclorito de sódio foi retirado, sendo adicionado novamente 700 µL desta substância e deixando as sementes sobre agitação por 20 minutos. As sementes foram, então, lavadas cinco vezes com água milli-Q estéril e, posteriormente, distribuídas em placas de Petri contendo meio MS sólido. As placas foram mantidas em condições

adequadas de temperatura (28°C) e luminosidade (16 horas de luz e 8 horas de escuro), até a germinação das sementes. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para potes de vidro estéreis, contendo o mesmo meio de cultura, e mantidas nas mesmas condições até obtenção de folhas de tamanho adequado para transformação.

3.12.2. Obtenção dos transgênicos estáveis de silenciamento gênico

Seis semanas após a semeadura, as plantas crescidas em condições estéreis foram utilizadas para obtenção de plantas transgênicas estáveis. Suas folhas foram cortadas em pequenos discos foliares, que foram colocados em contato com 20 mL de meio MS líquido em placas de Petri (Figura 5A). Para cada transformação (RNAi-A e RNAi-D), foram utilizadas colônias de *Agrobacterium* que continham a construção de interesse para produção de moléculas de *hpRNA*. Um inóculo (meio LB líquido) de cada colônia positiva foi deixado por 48 horas sob agitação e uma alíquota de 750 µL de cada cultura, contendo *Agrobacterium*, foi acrescentada aos 20 mL de meio MS contidos nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 28°C por dois dias, na ausência de luz. Posteriormente, os discos foram lavados com água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio M-300 sólido, (suplementado com os antibióticos adequados para seleção de células transformadas: RNAi-A - canamicina, 200mg/mL e RNAi-D – higromicina 50mg/mL) para indução de calos (Figura 5B), sendo mantidas em câmara de germinação (16 horas de luz e 8 horas de escuro, a 28°C). Após aproximadamente 15 dias, os calos independentes foram isolados dos discos e distribuídos sobre uma placa contendo novamente meio M-300 adicionado de antibióticos, para maior crescimento dos calos, durante aproximadamente 15 dias. Estes calos foram identificados com números. Após crescimento, eles foram transferidos para o meio M-250 sólido (com antibióticos) para a indução de parte aérea (Figura 5C) e deixados na câmara de germinação (16 horas de luz e 8 horas de escuro, a 28°C) até a formação de brotos. Conforme os brotos eram formados, estes foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS (com antibiótico), permitindo a formação de raízes. Todos os brotos foram identificados com números permitindo a identificação do calo proveniente, isso é importante, pois plantas regeneradas a partir do mesmo calo são consideradas clones. Após início do crescimento das raízes, as plântulas foram transferidas, uma a uma, para potes maiores de vidro, contendo meio MS suplementado com antibióticos (Figura 5D), ainda mantidos na câmara de germinação para crescimento até aproximadamente 10 cm. Após

cultura *in vitro*, as plantas já enraizadas foram transferidas para saquinhos contendo terra (substrato Bioplant de fabricação comercial e fertilizante), e cobertas por saco plástico transparente e umedecido para aclimação (Figura 5E). Os saquinhos foram mantidos em câmara de germinação com temperatura (22°C), umidade (55%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas, até serem transplantadas para vasos de 10 kg e mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada (Figura 5F). Plantas SR1 foram utilizadas como controle para os experimentos. Para tanto, sementes estéreis de SR1 foram distribuídas em placas de Petri contendo meio MS sólido no mesmo período em que as plantas transformadas estavam produzindo calos, para que plantas transgênicas e plantas controle crescessem ao mesmo tempo.

Figura 5. **Obtenção das plantas transgênicas.** A) Discos foliares de *N. tabacum* (cultivar SR1). B) Calos originados das bordas dos discos foliares em meio M-300. C) Brotos originados a partir dos calos em meio de indução de parte aérea. D) Planta em meio de indução de raiz. E) Plantas transferidas para saquinhos contendo substrato e fertilizante, cobertos por saco umedecido para aclimação. F) Planta transgênica adulta em vaso.

3.12.3. Extração de DNA genômico de folhas

Com o intuito de verificar se as plantas transgênicas regeneradas realmente possuíam o transgene foram realizadas checagens por PCR. Para tanto, foi realizada extração de DNA genômico de folhas destas plantas e de plantas selvagens (SR1). Um pedaço de tecido foliar (por volta de 1 cm²) foi macerado, utilizando-se pistilos estéreis. Foram adicionados 400 µL do tampão de extração [200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS] e, em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos e

deixadas a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto (microcentrífuga Eppendorf 5415 D) e 300 µL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo. Foram adicionados 300 µL de isopropanol e as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, e posteriormente, ressuspendido em 100 µL de água milli-Q estéril e armazenados a 4°C.

3.12.4. PCR para checagem de transgenia

Os DNAs extraídos das plantas transgênicas e de SR1 foram utilizados como molde em reações de PCR. Para tal, foram misturados os seguintes itens: 2 µL de DNA molde, 2,5 µL de tampão 10X (*Biotoools*), 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL de cada *primer* (estoque a 5 µM), 1 µL de dNTPs 10 mM, 13,5 µL de água milli-Q estéril e 1 µL de DNA polimerase (*Biotoools*). As reações ocorreram nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos para desnaturação inicial do DNA genômico, 34 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 57°C por 30 segundos (pareamento) e 72°C de 1 minuto (extensão), seguidos de um período de 10 minutos a 72°C para extensão final. Os *primers* utilizados foram: RNAi-A – P35S (5'ATGACGCACAATCCCACTATCC3') e qPCR-Nt9.4-RV (5'AAGCAAGAGGCTTCACTCAC3'); RNAiD – P35S e qPCR-NtH6.1-RV (5'TCAAGCCTCGTCCATCTGC3'). O resultado da amplificação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 1%. Apenas plantas que tiveram transgenia confirmada por PCR foram levadas à casa de vegetação.

3.12.5. Determinação do nível de silenciamento gênico

O nível de silenciamento gênico obtido em cada uma das plantas transgênicas foi analisado por meio de RT-qPCR. Para tal foi necessária a realização dos seguintes procedimentos.

- Desenho de *primers*

Para amplificar especificamente fragmentos dos genes silenciados em cada linhagem de plantas transgênicas (14-3-3A ou 14-3-3D), os *primers* foram desenhados prevendo pareamento em regiões pouco conservadas de tais sequências. Para isso, os pares de *primers* foram desenhados no final da região codificadora de ambos os genes. Os *primers*

foram avaliados em relação à formação de estruturas secundárias e à temperatura de *melting* por meio do software online *NetPrimer* (disponível na página www.premierbiosoft.com/netprimer). Além da amplificação das 14-3-3s, foi realizada a amplificação de genes de referência, *GADPH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e *RPL2* (*ribosomal protein L2*). A utilização destes genes como referência em análises de RT-qPCR realizadas com RNA de tecido vegetal de tabaco foi padronizada pela Dra Fernanda Torres, que foi responsável também pelo desenho dos *primers* para amplificá-los. A relação dos *primers* utilizados está apresentada na tabela 4.

Tabela 4. Relação de *primers* utilizados na análise de expressão gênica por RT-qPCR.

Gene-alvo	Primer	Sequência 5' - 3'
14-3-3A	qPCR-14-3-3A-FW	CCTCACTTTGTGGACCTCGGAT
	qPCR-14-3-3A-RV	GCTTCACTCACATTACTGCTGCT
14-3-3D	qPCR-14-3-3D-FW	GAGGAAGCTATTGCCGAAGT
	qPCR-14-3-3D-RV	ATGTCAAGCCTCGTCCATCTG
GAPDH	GAPDH-FW_pPCR	GCATCTTTGATGCCAAGGCTGGAA
	GAPDH-RV_pPCR	TCGAGTGCTGTAGCCCATTTCGTT
RPL2	RPL2-FW_pPCR	CGGGTGTGTCACTTTCCGTTACCCG
	RPL2-RV_pPCR	ATACCCTCAGCAGCCACGAAC

- Coleta de material vegetal

Foram coletados estigmas e estiletes em estágio 10 de desenvolvimento de todas as plantas transgênicas e também de três plantas SR1 que estavam em casa de vegetação sob as mesmas condições ambientais que os transgênicos. As flores neste estágio de desenvolvimento (Koltunow *et al.*, 1990) foram coletadas e levadas ao laboratório, onde o estigma e o estilete foram separados dos ovários e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

- Extração de RNA e tratamento com DNase

O material vegetal coletado foi colocado em tubos de 2 mL, os quais estavam mergulhados em nitrogênio líquido, e macerado com a utilização de pistilos de plástico. Após maceração, este material foi utilizado para extração de RNA, com o reagente TRIzol (*Invitrogen*), seguindo as orientações do fabricante. O RNA foi quantificado em *NanoDrop*TM

1000 (*Thermo Scientific*) e armazenado a -80°C . Uma alíquota dos RNAs extraídos foi utilizada em uma eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA. Para esta eletroforese, o tampão TBE e o tampão de carregamento foram preparados com H_2O DEPC 0,1% e foi adicionado 1M/mL de isotiocianato de guanidina ao gel de agarose.

Após verificação da integridade, 20 μg de cada amostra de RNA foram tratados com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA que podem ter ocorrido durante a extração com reagente TRizol. Para tanto, utilizou-se o produto *DNA-free, DNase Treatment and Removal* (Ambion). As reações foram realizadas com 5 μL de *10X DNase I Buffer*, 1 μL de rDNase I (Ambion), 20 μg de RNA e H_2O milli-Q estéril para completar 50 μL de volume final. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C . O RNA tratado foi armazenado a -80°C .

- Detecção de contaminação por DNA genômico

Após tratamento com a DNase, o RNA foi utilizado em uma checagem, através de reações de RT-qPCR, para verificar se ainda havia contaminação por DNA genômico. Utilizando-se microplacas de 96 poços, as reações-teste foram feitas, para cada poço, com 1 μL de cada primer (5 μM), senso e antisenso, para o gene *GAPDH*, 5 μL de *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega), 2 μL de água milli-Q estéril e 1 μL de RNA tratado de cada amostra, totalizando 10 μL de reação para cada poço. As condições da termociclagem foram: um passo inicial de 50°C por 2 minutos, passando a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* – *Applied Biosystems*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, FCFRP-USP). As amostras que apresentaram amplificação indicaram presença de DNA genômico. Dessa forma, foram tratadas novamente com DNase. Após re-tratamento, uma nova reação-teste foi realizada para confirmação da completa degradação do DNA genômico presente na amostra de RNA.

- Limpeza do RNA

Com o intuito de obter um RNA livre de contaminações por reagente utilizados durante os procedimentos de extração de RNA e de tratamento com DNase, o RNA obtido passou por um processo de limpeza realizado com o produto *Clean up – Rneasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Após a limpeza, os RNAs foram quantificados em *NanoDropTM 1000* (*Thermo Scientific*) e utilizados na síntese de cDNA.

- Reação com a transcriptase reversa

As amostras de RNA foram convertidas a cDNA por reação enzimática com a transcriptase reversa (*SuperScript III* - 200U/ μ L, *Invitrogen*). Para cada reação, foram utilizados 800 ng de RNA tratado, 1 μ L de oligo dTV (50 μ M) e 1 μ L de mistura de dNTPs (10 mM cada), completando-se o volume para 12 μ L com H₂O DEPC 0,1%. As amostras foram aquecidas em termociclador a 65°C por 5 minutos, sendo imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos. Foram adicionados em cada tubo 4 μ L de tampão 5X *First-Strand Buffer*, 1 μ L de DTT (0,1 M), 1 μ L de *RNaseOUT* (40U/ μ L) e 2 μ L da enzima *SuperScript III*, totalizando um volume de 20 μ L. As amostras foram colocadas em termociclador e aquecidas a 50°C por 40 minutos, seguido por 20 minutos a 55°C e, por fim, a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

- Reações de RT-qPCR e análise dos resultados

Para determinação dos níveis de expressão do gene em estudo, foram feitas reações de RT-qPCR utilizando-se o reagente *SYBR Green*, um intercalante de DNA dupla-fita. As reações foram feitas com 1 μ L de cada *primer* (estoque 5 μ M) do gene de interesse, 5 μ L de *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega), 1 μ L de água milli-Q estéril e 2 μ L de cDNA de cada amostra (diluído 10 vezes). As condições da termociclagem foram as mesmas descritas para a detecção de DNA genômico. Como referência interna, foram utilizados os genes *GAPDH* e *RPL2*. Para cada amostra, foram feitas reações em triplicatas técnicas, permitindo a detecção de possíveis erros. As curvas de dissociação também foram adicionadas ao término das reações. Foram utilizados controles negativos (NTC = *no template control*), sem a adição de cDNA, para confirmar ausência de possíveis contaminantes nos reagentes utilizados na reação. Os resultados de cada placa foram analisados no programa *7500 Software – Version 2.0.4*. Este programa permite analisar a qualidade das réplicas técnicas, bem como o padrão das curvas de dissociação. Além disso, permite manipulações na escolha do valor do *cycle threshold* (número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência cruzar o limiar escolhido). No caso de valores de triplicatas técnicas apresentarem uma variação maior que 0,5 ciclos, o valor divergente foi omitido e, se necessário, a reação da placa foi repetida para garantir a validade dos resultados. Foram gerados gráficos de expressão relativa utilizando-se o método delta-delta Ct, normalizando a expressão de cada gene em estudo aos dois

genes de referência. A expressão em SR1 foi considerada 1 e expressão nas demais plantas foi relativizada a partir deste valor.

3.12.6. Polinizações Controladas

Polinizações controladas foram feitas com o intuito de avaliar a funcionalidade dos órgãos reprodutivos femininos e masculinos das plantas transgênicas e para realizar análise de segregação de tais plantas. Adicionalmente, as polinizações permitirão a avaliação do fenótipo da geração T_1 de cada linhagem e de plantas silenciadas para ambas as 14-3-3s. Para tal, cinco estratégias de polinização foram utilizadas: 1) pólen de cada uma das plantas transgênicas em pistilos de uma planta SR1, para observar se há alterações no grão de pólen dos transgênicos; 2) pólen de SR1 no pistilo das plantas transgênicas, para observar se há alterações no pistilo destas; 3) autopolinização das plantas transgênicas, para confirmar se estas plantas eram capazes de produzir frutos por autopolinização; 4) pólen de plantas RNAi-A em pistilo de plantas RNAi-D; e 6) pólen de plantas RNAi-D em pistilo de plantas RNAi-A, para a obtenção de plantas com silenciamento para as duas 14-3-3s.

Para a realização das polinizações foram retirados pétalas e estames de flores no estágio 11 (com anteras ainda fechadas), permitindo a exposição do pistilo. Grãos de pólen encontrados em anteras abertas de outras flores foram então colocados na superfície do estigma exposto. Após esse procedimento, um pedaço de canudo (com uma das extremidades fechadas com fita adesiva) foi encaixado no pistilo de forma a cobri-lo. As flores foram identificadas por fitas coloridas amarradas a sua base, com uma cor específica para cada um dos tipos de polinização. A fita colorida foi mantida até que os frutos estivessem secos, quando foram retirados das plantas e guardados em envelopes de papel, devidamente identificados.

3.12.7. Análise de Segregação

Foram realizadas análises de segregação de três plantas transgênicas de RNAi-A e de três plantas de RNAi-D, que apresentaram níveis elevados de silenciamento, com o intuito de avaliar o número de inserções do transgene presentes em cada uma destas plantas. Para tal, foram utilizadas sementes provenientes de cruzamentos de SR1 com estes transgênicos. Essas sementes foram esterilizadas, como descrito no tópico 3.12.1, e semeadas em condições estéreis em meio MS suplementado com os antibióticos adequados (RNAi-A -

canamicina, 200mg/mL e RNAi-D – higromicina 50mg/mL). Após semeadura, elas foram mantidas em câmara de germinação com temperatura e luminosidade controladas (28°C e 16 horas luz/ 8 horas escuro). Conforme as sementes foram germinando, foi possível observar quais eram resistentes e quais eram sensíveis aos antibióticos, uma vez que, as plântulas sensíveis não avançam em seu desenvolvimento e morrem, e as resistentes desenvolvem-se normalmente. Foi, então, contado o número de sementes germinadas e não germinadas, e dentre as germinadas, o número de plântulas sensíveis e não sensíveis. A partir da proporção de plântulas sensíveis e resistentes foi possível estimar o número de inserções presentes em cada transgênico usando o teste de χ^2 (qui-quadrado). Em paralelo, foram semeadas sementes de SR1, permitindo a avaliação da taxa de germinação dos transgênicos em relação às sementes selvagens.

3.13. Meios de Cultura e Soluções de aminoácido e bases nitrogenadas

Todos os meios de cultura, depois de preparados, foram esterilizados em autoclave por 20 minutos sob 1 atm. de pressão e 120°C (autoclave vertical 415 – Fanem).

- Meio LB (Luria-Bertani)

O meio foi feito com 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl em água deionizada. Para a preparação sólida, foi adicionado ágar bacteriológico a 1%. Depois de pronto, o meio foi dividido em garrafas de vidro, nunca ultrapassando dois terços do volume total, e foi esterilizado.

- Meio MAS (Mininum A Sucrose)

Para o meio MAS, as concentrações finais foram de 4% de meio A 1X, 0,2% de sacarose, 0,04% de $MgSO_4$ 0,0005% de tiamina dissolvidos em solução de ágar 1,5% previamente preparada e esterilizada. Os componentes desse meio são preparados separadamente:

- Meio A 5X – K_2HPO_4 0,4M, 0,5% de $(NH_4)_2SO_4$ e 0,25% de citrato de sódio dissolvidos em água deionizada, esterilizado em autoclave e armazenado a 4°C.

- Solução de sacarose 20% - esterilizada por filtração (filtro Millipore de 0,22 μm) e armazenada a 4°C.

- Solução de $MgSO_4$ 20% - esterilizada em autoclave e armazenada a -20°C.

- Solução de tiamina 10 mg/mL – esterilizada em filtro Millipore 0,22 µm e armazenada a -20°C.

- Meio YPAD (Yeast extract, Peptone, Adenine, Dextrose)

Para o meio YPAD, as concentrações finais foram: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e 0,02 % de sulfato de adenina em água deionizada. O pH foi ajustado para 6,0 com HCl 4N. Para a versão sólida, foi utilizado ágar para concentração final de 2%. O meio de cultura foi dividido em garrafas ou Erlenmeyers e autoclavado.

- Meio SC (Synthetic Complete) –TRP –LEU –HIS –URA

O meio foi feito com concentrações finais de 0,67% de Yeast Nitrogen Base, 0,135% de *mix* de aminoácidos e bases nitrogenadas (*dropout mix*) em água deionizada. O pH foi ajustado para 5,9 com NaOH 4N. Para o meio sólido, foi adicionado ágar bacteriológico para concentração final de 2 %. O meio foi dividido em garrafas e esterilizado. Depois de autoclavado, o meio foi acrescido de dextrose esterilizada para concentração final de 2 %.

O *dropout mix* utilizado resultou em meio SC –Leucina –Tryptofano –Histidina –Uracila. Para o crescimento seletivo de leveduras, os meios foram complementados com soluções de aminoácidos, dependendo do objetivo.

- Mix de Aminoácidos e bases nitrogenadas (Dropout Mix)

A mistura de aminoácidos para o preparo de meio SC sem aminoácidos específicos (*dropout mix*) foi feita de acordo com o manual para os ensaios de duplo-híbrido (*ProQuest™ Two-Hybrid System, Invitrogen*). Para o preparo de meio sem os aminoácidos Leucina (Leu, L), Tryptofano (Trp, W), Histidina (His, H) e a base nitrogenada Uracila (Ura), foram realizadas misturas contendo 1g de cada um dos aminoácidos a seguir: Alanina (Ala, A), Arginina (Arg, R), Aspartato (Asp, D), Asparagina (Asn, N), Cisteína (Cis, C), Glutamato (Glu, E), Glutamina (Gln, Q), Glicina (Gly, G), Isoleucina (Ile, I), Lisina (Lys, K), Metionina (Met, M), Fenilalanina (Phe, F), Prolina (Pro, P), Serina (Ser, S), Treonina (Thr, T), Tirosina (Tyr, Y) e Valina (Val, V) e a base nitrogenada Adenina (Ade).

- Soluções de aminoácidos e Uracila

Foram preparadas soluções dos aminoácidos Leu, Trp, His e também da base nitrogenada Uracila para complementar o meio de cultura SC. As soluções foram feitas nas concentrações: Leucina – 100 mM, Triptofano – 40 mM, Histidina 100 mM, Uracila – 20 mM. Todas as soluções foram esterilizadas através de filtração em filtros Millipore de 0,22 µm.

- Meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

Para este meio foram usados 4,4g/L de meio MS (Sigma), contendo sais e vitaminas; 30g/L de sacarose; 0,5 g/L de MES. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com KOH 4N. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 7g de ágar (DIFCO ou Sigma) para cada litro de meio líquido.

- Meio M-250

Foi preparado meio MS sólido e, após autoclavagem, foram adicionados 1µg/mL de BAP (benzilaminopurina) e 250µg/mL de cefotaxima.

- Meio M-300

Foi preparado meio MS sólido e, após autoclavagem, foram adicionados 0,1µg/mL de NAA (ácido naftaleno acético), 1µg/mL de BAP (benzilaminopurina) e 500µg/mL de cefotaxima.

3.14. Antibióticos utilizados

Para preparo dos estoques, quantidades apropriadas de cada antibiótico foram pesadas e dissolvidas em água milli-Q, sendo as soluções esterilizadas em filtro de 0,22 µm. As concentrações dos antibióticos utilizados na seleção de construções de interesse em células de bactérias e plantas estão relacionadas na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de antibiótico utilizada para seleção de construções gênicas em diferentes organismos.

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>N. tabacum</i>
Ampicilina	100 µg/mL	-	-
Canamicina	50 µg/mL	-	200 µg/mL
Gentamicina	5 µg/mL	-	-
Higromicina	-	-	50 µg/mL
Spectinomomicina	50 µg/mL	100 µg/mL	-
Streptomicina	12,5 µg/mL	300 µg/mL	-

3.15. Identificação de ortólogos das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D

Uma análise evolutiva com sequências de proteínas 14-3-3 de *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *N. benthamiana* e *N. tabacum* foi realizada com o intuito de identificar proteínas ortólogas à 14-3-3A e à 14-3-3D de tabaco. Para tal, foi realizada a identificação de proteínas 14-3-3 putativas, nas espécies em questão. Essa identificação foi possibilitada por meio de buscas em bancos de dados com o software *Blastall* 2.2.17. A busca foi realizada utilizando como *query* todas as proteínas descritas da família 14-3-3 de *A. thaliana* (Tabela 6) contra bancos de dados de proteínas, unigenes ou TCs (*tentative consensus*) das demais espécies, utilizando corte de *e-value* de 10^{-5} . No caso de *O. sativa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, que já possuem seu genoma totalmente sequenciado, foram utilizados bancos completos de proteínas, codificadas a partir de transcritos primários, obtidos no *Phytozome* (<http://phytozome.net>) (Ouyang *et al.*, 2007; Tomato Genome Consortium, 2012; Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). Para busca de 14-3-3s de *N. benthamiana*, que possui genoma disponível, mas ainda pouco curado, foi utilizado um banco de transcriptoma (Nakasugi *et al.*, 2013), “Unigenes V3”, disponível no site da Universidade de Sidney (<http://sydney.edu.au>) e, no caso de *N. tabacum*, que ainda não possui o genoma sequenciado, foram utilizados todas as sequências de TCs disponíveis no *DFCI* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>). Todas as buscas foram realizadas no mês de setembro de 2013. Os grupos de proteínas encontrados para cada espécie foram triados, eliminando-se sequências redundantes ou muito incompletas por meio de análises com ferramentas de alinhamento e construção de árvores disponíveis no programa *MEGA* 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). As sequências de *N. benthamiana* e *N. tabacum* foram traduzidas no *Expasy* (<http://expasy.org>). Após a definição das sequências de aminoácidos que seriam

utilizadas, estas foram alinhadas, juntamente com as sequências das 14-3-3s de *A. thaliana* utilizadas como *query*. O alinhamento foi realizado com a ferramenta *MUSCLE* (Edgar, 2004). Após o alinhamento foi realizada uma análise para definir qual o modelo de substituição mais adequado aos dados em questão no *MEGA 5.2*, mesmo programa utilizado na posterior obtenção de topologias. A partir destes dados foram realizadas análises evolutivas baseadas nos métodos *Neighbor Joining* (Saitou & Nei, 1987) e de máxima verossimilhança, utilizando deleção pareada, modelo de substituição JTT+G (Jones-Taylor-Thornton, com distribuição Gama discreta, G= 0,69) e valores de *Bootstrap* calculados por 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Tabela 6. Proteínas 14-3-3s de *A. thaliana* utilizadas como *query* em busca por putativas 14-3-3s em *O. sativa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *N. benthamiana* e *N. tabacum*.

Proteína	Acesso - NCBI
GRF1	AAA96254
GRF2	NP_565176
GRF3	AAA96252
GRF4	NP_564453
GRF5	NP_568325
GRF6	NP_568229
GRF7	NP_566174
GRF8	AAA79700
GRF9	NP_001031533
GRF10	NP_564167
GRF11	AAG47840
GRF12	NP_564249
GRF13	AAO38438

4. Resultados

4.1. Localização subcelular das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D

A localização subcelular das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D foi analisada por meio da expressão transiente das proteínas recombinantes 14-3-3A-GFP e 14-3-3D-GFP de maneira independente. Para tal, folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *A. tumefaciens* carregando a construção para expressão da proteína correspondente. Após aproximadamente 48 horas, as células das folhas foram coradas com DAPI e observadas em microscópio confocal. A proteína 14-3-3A-GFP foi visualizada no núcleo e no citoplasma das células vegetais (Figura 6), enquanto a proteína 14-3-3D-GFP foi visualizada majoritariamente no citoplasma (Figura 7).

Com o intuito de confirmar a distribuição citoplasmática dessas proteínas por meio da utilização de um marcador para localização subcelular, foi desenhado um novo experimento. Este se baseou na co-infiltração do vetor pCAMBIA1302, que produz a proteína GFP, com as proteínas de fusão 14-3-3A-RFP ou 14-3-3D-RFP em folhas de *N. benthamiana*. A GFP, sem estar em fusão com outras proteínas, apresenta distribuição citoplasmática e, quando expressa em grande quantidade, pode entrar no núcleo, representando uma boa referência na análise da localização das 14-3-3A e D. A sobreposição das imagens da GFP e da RFP em células expressando ambas as proteínas confirmou os dados obtidos na análise anterior (Figura 8).

Localização Subcelular – 14-3-3A

Figura 6. **Imagens da localização subcelular da proteína 14-3-3A-GFP.** A e C) Fluorescência da GFP indicando a localização nuclear e citoplasmática da 14-3-3A-GFP. B e D) Sobreposição entre a imagem da GFP e a imagem da marcação do núcleo com DAPI, evidenciando a localização nuclear. Todas as imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5.

Localização Subcelular – 14-3-3D

Figura 7. **Imagens da localização subcelular da proteína 14-3-3D-GFP.** A e C) Fluorescência da GFP indicando a localização citoplasmática da 14-3-3D-GFP. B e D) Sobreposição entre a imagem da GFP e a imagem da marcação do núcleo com DAPI. As imagens A e B foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5, e as imagens C e D foram capturadas no microscópio confocal Leica SP2.

Figura 8. Imagens da co-localização de GFP x 14-3-3A-RFP e GFP x 14-3-3D-RFP. A e D) Fluorescência da RFP indicando a localização citoplasmática e nuclear da 14-3-3A-RFP. G e J) Fluorescência da RFP indicando a localização citoplasmática da 14-3-3D-RFP. B, E, H e L) Distribuição citoplasmática e nuclear da GFP. C, F, I e M) Sobreposição entre os canais da GFP e RFP em imagens correspondentes, evidenciando a co-localização entre as proteínas recombinantes e a GFP. As imagens D, E e F foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5, enquanto as demais imagens foram capturadas no microscópio confocal Leica SP2.

4.2. Dimerização das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D

Cada 14-3-3 pode ser encontrada em mais de uma combinação de dímeros, no entanto estudos demonstram que nem todas as combinações ocorrem, e que existem associações preferenciais (Chaudhri *et al.*, 2003). Para investigar se as proteínas 14-3-3A e D formam homodímeros e/ou heterodímeros entre si, este estudo realizou ensaios de duplo-híbrido e BiFC.

4.2.1. Ensaio de duplo-híbrido

O ensaio de duplo-híbrido envolveu a co-transformação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (cepa PJ69-a) com construções para a expressão da 14-3-3A e da 14-3-3D fusionadas aos diferentes domínios (AD – domínio de ativação e BD – domínio de ligação ao DNA) do fator de transcrição GAL4. Foram realizados ensaios para verificar se a transcrição do gene repórter HIS3 foi ativada, o que indicaria a ocorrência de interação entre as proteínas testadas. Para tal, foi necessário definir, previamente, se alguma das proteínas fusionadas ao domínio BD ou AD seriam capazes de auto-ativar o sistema, ou seja, se elas poderiam ativar a transcrição do gene HIS3, apenas na presença de uma proteína de fusão. Por isso, foi realizado um ensaio para verificação de todos os controles (do sistema e de auto-ativação, descritos em Material e Métodos). Este ensaio indicou a ocorrência de auto-ativação do sistema com a construção BD-14-3-3A (Figura 9). Em decorrência disso, para que a auto-ativação não ocorresse durante os ensaios para avaliação da dimerização, foi necessária a adição de 1mM de 3-amino1,2,4-triazol (3AT) ao meio de cultura.

Leveduras co-transformadas com BD-14-3-3A x AD-14-3-3A; BD-14-3-3D x AD-14-3-3D; BD-14-3-3A x AD-14-3-3D e BD-14-3-3D X AD14-3-3A foram capazes de ativar transcrição do gene HIS3 (Figura 10), indicando que as proteínas 14-3-3A e D são capazes de formar homodímeros e heterodímeros entre si. A observação do crescimento das colônias testadas, em comparação com o crescimento dos controles + + + (interação forte) e + (interação fraca), permitiu inferir que os homodímeros da proteína 14-3-3D são formados por uma interação forte, enquanto os heterodímeros possuem uma interação fraca. Já os homodímeros da 14-3-3A apresentaram crescimento ainda inferior ao observado no controle +, indicando que este homodímero apresenta a interação mais fraca dentre todas as testadas neste estudo.

Figura 9. **Ensaio de duplo-híbrido mostrando a auto-ativação causada pela construção BD-14-3-3A (BD-A x AD-Ø, seta).** Placa Controle: Meio SC -TRP -LEU; Ensaio HIS3: Meio SC -TRP -LEU -HIS. Controles positivos: + + + (interação forte), + (interação fraca). Controle negativo: - . Testes de auto-ativação: BD-Ø x AD-Ø, BD-A x AD-Ø, BD-D x AD-Ø, BD-Ø x AD-A, BD-Ø x AD-D.

Figura 10. **Ensaio de duplo-híbrido mostrando a formação de homodímeros e heterodímeros entre a 14-3-3A e a 14-3-3D.** Placa Controle: Meio SC -TRP -LEU; Ensaio HIS3: Meio SC -TRP -LEU -HIS + 1mM de 3AT. Controles positivos: + + + (interação forte), + (interação fraca). Controle negativo: - . Controles de auto-ativação: BD-Ø x AD-Ø, BD-A x AD-Ø, BD-D x AD-Ø, BD-Ø x AD-A, BD-Ø x AD-D. Testes – Heterodímeros: AD-A x BD-D, BD-D x AD-A; Homodímeros 14-3-3A: BD-A x AD-A; Homodímeros 14-3-3D: AD-D x BD-D.

4.2.2. BiFC

Visando confirmar os dados obtidos no ensaio de duplo-híbrido e também identificar a localização subcelular destes dímeros, foram realizados ensaios de BiFC. Folhas de *N. benthamiana* foram co-infiltradas com *A. tumefaciens* carregando as seguintes construções: 14-3-3A-hGFP x 14-3-3A-tGFP; 14-3-3D-hGFP x 14-3-3D-tGFP e 14-3-3A-hGFP x 14-3-3D-

tGFP. Após aproximadamente 72 horas, as folhas foram coradas com DAPI e observadas em microscópio confocal. Todos os ensaios levaram à restauração da fluorescência da GFP, confirmando os dados obtidos nos experimentos de duplo-híbrido (Figura 11). Os homodímeros de 14-3-3A se localizaram no citoplasma e no núcleo, enquanto os homodímeros de 14-3-3D se localizaram apenas no citoplasma. Os heterodímeros também estavam localizados apenas no citoplasma.

Figura 11. Imagens do ensaio de dimerização das proteínas 14-3-3A e D por *BiFC*. A, D, G e J) Homodímeros da 14-3-3A. B, E, H e L) Homodímeros da 14-3-3D. C, F, I e M) Heterodímeros entre 14-3-3A e 14-3-3D. As fotos D, E, F, J, L, M apresentam núcleo corado com DAPI. As imagens H e L foram capturadas no microscópio confocal Leica SP5, enquanto as demais foram capturadas no microscópio confocal Leica SP2.

4.3. Confirmação da interação SCI1 x 14-3-3A por BiFC

A interação entre SCI1 e 14-3-3A foi sugerida por meio de um experimento de *screening* de *pulldown* realizado em nosso laboratório pelo doutorando Edward José Strini. Para confirmar a ocorrência dessa interação *in vivo*, este estudo testou-a por BiFC. Este experimento se deu por meio de expressão transiente das proteínas de fusão SCI1-hGFP e 14-3-3A-tGFP em folhas de *N. benthamiana*. Em paralelo, foi realizado também um ensaio com SCI1-hGFP e 14-3-3D-tGFP, que serviu como controle positivo. Após 48-72 horas de expressão, as células das folhas infiltradas foram coradas com DAPI e visualizadas em microscópio confocal. Dessa maneira, foi possível observar a restauração da fluorescência da GFP no núcleo celular, confirmando a ocorrência de interação entre SCI1-hGFP e 14-3-3A-tGFP (Figura 12). O padrão de distribuição observado é semelhante ao encontrado na interação entre SCI1 e 14-3-3D (Figura 13), nos dois casos as interações ocorrem espalhadas no núcleo.

BiFC: SCI1-hGFP x 14-3-3A-tGFP

Figura 12. Imagens de experimento de BiFC confirmando a interação entre as proteínas recombinantes SCI1-hGFP e 14-3-3A-tGFP no núcleo celular. A e D) Restauração da GFP devido à interação entre as proteínas testadas; B e E) Marcação nuclear com DAPI; C e F) Sobreposição dos dois canais (GFP e DAPI), evidenciando a localização nuclear da interação. Todas as imagens foram capturadas em microscópio confocal Leica SP5.

BiFC: SCI1-hGFP x 14-3-3D-tGFP

Figura 13. Imagens de experimento de *BiFC* mostrando a interação entre as proteínas de fusão SCI1-hGFP e 14-3-3D-tGFP no núcleo celular. A) Restauração da GFP devido à interação entre as proteínas testadas; B) Marcação nuclear com DAPI; C) Sobreposição dos dois canais (GFP e DAPI) evidenciando a localização nuclear da interação. As imagens foram capturadas em microscópio confocal Leica SP5.

4.4. Análise do sítio de ligação de SCI1 com proteínas 14-3-3

Com o intuito de caracterizar a região responsável pela interação entre SCI1 e as 14-3-3s, este estudo identificou, por meio de análises *in silico*, possíveis sítios de reconhecimento por proteínas 14-3-3 na sequência de aminoácidos de SCI1. Posteriormente, foram realizadas mutações nestes sítios, seguidas de análises de interação por BiFC (experimentos em andamento).

4.4.1. Análises *in silico*

Por meio do software *MotifScan* a sequência de aminoácidos de SCI1 foi analisada em busca de possíveis sítios de interação Mode I (RSX-pS/pT-XP, onde pS/pT indica um resíduo de serina ou treonina fosforilado). Outros sítios consensos (Mode II e Mode III) não foram analisados, pois o software não disponibilizava esta ferramenta. A análise utilizando alto e médio nível de restringência não identificou nenhum sítio. No entanto, utilizando baixa restringência, a busca resultou na identificação de três possíveis sítios de interação. Como pode ser observado na sequência de aminoácidos de SCI1, os sítios 2 e 3 se sobrepõem (Figura 14), apresentando apenas diferença no resíduo fosforilado reconhecido durante a interação. Por isso, estes dois sítios foram tratados como sendo um único nas análises funcionais subsequentes.

Sítio 1

MGSDKKTPEEKRRHKRpSSPSSPRDEVKSKRQNIKGDEERRKEKKDKSKKEKHKSHSSEEKKSGEK
 HKTKSHKHKDKSKNKFEELSKDDYFSKNNEFATWLKDKKNLFFSDLSETARDLFSDFVIQWNGKGLDSQYYEG
 IATGPRSSHAWNIKK

Sítio 2

MGSDKKTPEEKRRHKRSPSSPRDEVKSKRQNIKGDEERRKEKKDKSKKEKHKpSHSSEEKKSGEK
 HKTKSHKHKDKSKNKFEELSKDDYFSKNNEFATWLKDKKNLFFSDLSETARDLFSDFVIQWNGKGLDSQYYEG
 IATGPRSSHAWNIKK

Sítio 3

MGSDKKTPEEKRRHKRSPSSPRDEVKSKRQNIKGDEERRKEKKDKSKKEKHKShpSSSEEKKSGEK
 HKTKSHKHKDKSKNKFEELSKDDYFSKNNEFATWLKDKKNLFFSDLSETARDLFSDFVIQWNGKGLDSQYYEG
 IATGPRSSHAWNIKK

Figura 14. **Regiões putativas de interação com 14-3-3s na sequência de SCI1.** As sequências de cada sítio se encontram em destaque, onde pS indica um resíduo de Serina fosforilado.

4.4.2. Mutações e BiFCs

Baseando-se nos resultados acima, foram geradas mutações na sequência de SCI1, visando uma análise de interação com as 14-3-3A e D. As mutações realizadas visaram eliminar as possíveis fosforilações identificadas na análise do item anterior, gerando as seguintes sequências:

SCI1Mut1 – A sequência SSPSS do sítio 1 foi alterada para AAPAA;

SCI1Mut2 – A sequência SHSS dos sítios 2 e 3 foi alterada para AHAA;

SCI1Mut3 – Apresenta simultaneamente as duas mutações realizadas em SCI1Mut1 e SCI1Mut2.

Essas sequências foram colocadas em vetores de expressão em plantas, apresentando fusão C-terminal com a hGFP. Tais construções foram utilizadas na realização de experimentos de BiFC em *N. benthamiana*. Os ensaios de interação com SCI1Mut1 já foram concluídos. No entanto, as análises com SCI1Mut2 e SCI1Mut3 estão ainda em andamento.

- SCI1Mut1

Foram testadas as seguintes interações: SCI1Mut1-hGFP x 14-3-3A-tGFP e SCI1Mut1-hGFP x 14-3-3D-tGFP. Ambos os ensaios foram positivos (Figuras 15 e 16), apresentando padrão de localização nuclear, de maneira semelhante ao visualizado nos ensaios entre SCI1 e as 14-3-3 (Figuras 12 e 13). Durante estes experimentos, foram realizados simultaneamente ensaios com a sequência de SCI1 não mutada, para servir como controle positivo.

BiFC – SCI1Mut1-hGFP x 14-3-3A-tGFP

Figura 15. Imagens de experimento de BiFC mostrando a interação entre as proteínas de fusão **SCI1Mut1-hGFP e 14-3-3A-tGFP no núcleo celular**. A e D) Restauração da GFP devido à interação entre as proteínas testadas; B e E) Marcação nuclear com DAPI; C e F) Sobreposição dos dois canais (GFP e DAPI). As imagens foram capturadas em microscópio confocal Leica SP5

BiFC – SCI1Mut1-hGFP x 14-3-3D-tGFP

Figura 16. Imagens de experimento de BiFC mostrando a interação entre as proteínas de fusão **SCI1Mut1-hGFP** e **14-3-3D-tGFP** no núcleo celular. A e D) Restauração da GFP devido à interação entre as proteínas testadas; B e E) Marcação nuclear com DAPI; C e F) Sobreposição dos dois canais (GFP e DAPI). As imagens foram capturadas em microscópio confocal Leica SP5.

4.5. Identificação de ortólogos das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D

Com intuito de levantar dados a respeito das possíveis funções das proteínas 14-3-3 A e D de *N. tabacum*, este trabalho realizou uma análise comparativa com sequências de proteínas 14-3-3 em diferentes espécies, incluindo *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, e as solanáceas *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana benthamiana*. A utilização da ferramenta *Blastall* permitiu o levantamento de sequências proteicas ou de nucleotídeos em bancos de dados disponíveis na internet (detalhado na sessão Material e Métodos), possibilitando, além do uso de sequências depositadas no *GenBank*, a identificação de proteínas putativas 14-3-3s que ainda não foram estudadas. As sequências levantadas dessa forma foram triadas, eliminando-se redundâncias. Posteriormente, as sequências selecionadas foram utilizadas na construção de uma topologia, permitindo a identificação de grupos de possíveis ortólogos das 14-3-3A e D de tabaco.

4.5.1. Identificação de sequências de 14-3-3s em bancos de dados

Foram encontradas 8, 13 e 12 sequências de *O. sativa*, *S. lycopersicum* e *S. tuberosum* respectivamente (Tabela 7), nos bancos de proteínas destas espécies disponíveis no *Phytozome*. Todas essas sequências foram utilizadas nos passos posteriores da análise. No caso de *N. benthamiana*, foi utilizado o banco de dados de transcriptoma disponível na página da Universidade de Sidney. Este banco ainda não estava totalmente organizado, de maneira que foram encontradas sequências redundantes ou muito incompletas, que foram retiradas das análises. Ainda assim, algumas sequências incompletas foram utilizadas, e das 16 selecionadas (Tabela 8), nenhuma se encontrava depositada no *GenBank*. As sequências de *N. tabacum*, que ainda não possui genoma sequenciado, foram identificadas no banco de *TCs* (*tentative consensus*) disponível no *DFCI*. A busca utilizando este banco apresentou os mesmos problemas citados para o caso de *N. benthamiana*. Adicionalmente, foi necessário levar em consideração que este banco é possivelmente incompleto, por possuir apenas *ESTs*. Por isso, além das sequências selecionadas após busca com o *Blastall*, foram adicionadas sequências já descritas na literatura e depositadas no *GenBank*, mas que não haviam sido encontradas. Dessa forma, foram selecionadas 27 sequências (Tabela 9), inclusive de proteínas homeólogas (correspondentes aos “dois” genomas que compõem o genoma alotetraplóide de tabaco). As proteínas homeólogas foram incluídas na análise, no entanto, para efeito de discussão, elas serão tratadas como um único “tipo” de proteína (por exemplo: as proteínas 14-3-3B1 e B2 de tabaco são homeólogas, mas serão tratadas como 14-3-3B, referindo-se as duas).

Tabela 7. Proteínas da família 14-3-3 encontradas nos bancos de dados de sequências proteicas (com apenas transcritos primários) de *Oryza sativa*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*.

Organismo	Acesso – Phytozome	Nome ¹	GenBank
<i>O. sativa</i>	LOC_Os08g37490.1	GF14A	Q84J55
<i>O. sativa</i>	LOC_Os02g36974.1	GF14B	AAB07456
<i>O. sativa</i>	LOC_Os08g33370.2	GF14C	AAB07457
<i>O. sativa</i>	LOC_Os11g34450.1	GF14D	AAB07458
<i>O. sativa</i>	LOC_Os02g36974.1	GF14E	Q6EUP4
<i>O. sativa</i>	LOC_Os03g50290.2	GF14F	Q06967
<i>O. sativa</i>	LOC_Os01g11110.2**	-	-
<i>O. sativa</i>	LOC_Os11g39540.1	GF14H	Q2R1D5
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc11g010470.1.1	TFT1	CAA65145
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc12g057110.2.1	TFT2	CAA65146
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc02g063070.2.1	TFT4	CAD43308
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc04g012120.2.1*	TFT5	CAA65148
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc04g074230.2.1*	TFT7	CAA65150
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc12g010860.1.1	TFT8	CAA67372
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc07g053260.2.1	TFT9	CAA67373
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc04g076060.2.1	TFT10	CAA67374
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc03g034180.2.1	TFT11	XP_004234565
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc05g012420.2.1	TFT12	XP_004239061
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc01g010360.2.1	-	XP_004228408
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc04g074510.2.1**	-	-
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc11g010200.1.1**	-	-
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400028334*	16R	Y11685
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400040823	20R	X87370
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400034008	29G	X97724
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400031028*	30G	Y11686
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400053669	34G	Y11687
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400028189	35G	Y11688
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400041832	-	-
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400022845	-	XP_006338086
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400035476	-	XP_006348856
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400011378	-	XP_006364862
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400049355	-	XP_006348703
<i>S. tuberosum</i>	PGSC0003DMP400013765	-	XP_006350029

¹ Nome utilizado na literatura corrente. * Sequências que apresentam diferenças de um aminoácido em relação às correspondentes anotadas no *GenBank*. ** LOC_Os01g11110.2 é similar à Os-GF14G (acesso BAD73105); Solyc04g074510.2.1 é similar à TFT3 (acesso CAA65147); Solyc11g010200.1.1 é similar à TFT6 (acesso CAA65149).

Tabela 8. Proteínas da família 14-3-3 encontradas no banco de dados de transcriptoma *N. benthamiana*.

Organismo	Acesso - Univ. de Sidney
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K605752218
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585715313
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K785652106
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585715101
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K665802322
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585725017
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K805658675
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585681891 ^P
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585727603
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585712721
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585721573
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K625772793
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K585709668 ^P
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K805659199
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K805656628
<i>N. benthamiana</i>	Nbv3K645787745 ^P

^P Sequências parciais.

Tabela 9. Proteínas da família 14-3-3 encontradas no banco de dados de TCs de *N. tabacum*.

Organismo	Acesso – DFCI	Nome ¹	GenBank
<i>N. tabacum</i>	-	A1	BAD12168
<i>N. tabacum</i>	TC122966	B1	BAD12169
<i>N. tabacum</i>	TC122971	B2	BAD06618
<i>N. tabacum</i>	TC122969	C1	BAD12171
<i>N. tabacum</i>	TC123426	C2	BAD12172
<i>N. tabacum</i>	TC123114	D1	BAD12173
<i>N. tabacum</i>	TC151693	D2	BAD12174
<i>N. tabacum</i>	TC124736	E1	BAD12176
<i>N. tabacum</i>	TC123525	E2	BAD12177
<i>N. tabacum</i>	TC127045	F1	BAD12178
<i>N. tabacum</i>	-	F2	BAD12554
<i>N. tabacum</i>	TC124845	G1	BAD12179
<i>N. tabacum</i>	TC122988	H1	BAD12180
<i>N. tabacum</i>	TC122988	H2	BAD12181
<i>N. tabacum</i>	-	I1	BAD12182
<i>N. tabacum</i>	TC123121	I2	BAD12183
<i>N. tabacum</i>	TC125542	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC122980	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC127529	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC147567	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC142413 ^P	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC123030	-	BAB68527
<i>N. tabacum</i>	TC133811	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC127254	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC123381	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC123179	-	-
<i>N. tabacum</i>	TC135077	-	-

¹Nome utilizado na literatura corrente. ^P Sequências parciais.

4.5.2. Análise evolutiva das proteínas 14-3-3

Por meio do software *Muscle*, todas as sequências relacionadas no item anterior e as de *A. thaliana* (GRF1-GRF13, relacionadas em Material e Métodos, item 3.15) foram alinhadas. Em seguida, foi realizada uma análise no programa *MEGA 5.2* (Tamura *et al.*, 2011) para escolha do método de substituição de aminoácidos mais apropriado a estes dados, sendo o modelo JTT+G (Jones-Taylor-Thornton, com distribuição Gama discreta, G=

0,69) considerado o mais adequado. Os dados gerados pelo alinhamento foram utilizados em uma análise filogenética baseada no método de distância *Neighbor Joining* (Saitou & Nei, 1987). Foi utilizada deleção pareada e valores de *Bootstrap* calculados por 1000 réplicas (Felsenstein, 1985), gerando a topologia apresentada na Figura 17. Os grupos onde se encontram as proteínas 14-3-3A e D de tabaco podem ser melhor visualizados nas Figuras 18 e 19. Adicionalmente, uma árvore foi inferida por máxima verossimilhança, baseando-se também no modelo de substituição JTT (topologia apresentada no anexo 4). Os dois métodos geraram árvores semelhantes, principalmente nos grupos que englobam as proteínas 14-3-3A e D, no entanto, as topologias não são idênticas. Não houve mudança em relação à identificação dos ortólogos nas duas árvores.

A interpretação da árvore obtida por *Neighbor Joining* possibilitou a identificação da sequência de tabaco TC122980 como homeóloga à proteína 14-3-3A, além dos possíveis ortólogos destas proteínas: TFT5 de *S. lycopersicum*, 20R de *S. tuberosum* e Nbv3K665802322 de *N. benthamiana*. Adicionalmente, as GRF1, GRF2 e GRF4 de *A. thaliana* são as possíveis ortólogas das 14-3-3A, 14-3-3H e 14-3-3F de *N. tabacum*. A proteína GF14A de *O. sativa* é ortóloga das 14-3-3 A, H, F, B e C. Os ortólogos da proteína 14-3-3D identificados foram: TFT1 de *S. lycopersicum*, 35G de *S. tuberosum* e Nbv3K585727603 de *N. benthamiana*. Adicionalmente, a GRF6 e a GRF8 de *A. thaliana* são ortólogas das 14-3-3D e G. Associações entre estas proteínas e alguns processos biológicos, descritas na literatura, podem ser encontrados nas Tabela 10 e 11. Nenhuma das sequências encontradas apresenta função específica conhecida durante o desenvolvimento floral, no entanto, as sequências de *Arabidopsis* consideradas ortólogas as 14-3-3 A e 14-3-3D de *N. tabacum* aparecem associadas ao ciclo celular.

Figura 17. Topologia inferida por *neighbor joining* mostrando as relações evolutivas entre proteínas 14-3-3 de *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum tuberosum* (St), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Valores de *Bootstrap* são apresentados em cada nó. O grupo colorido de verde, reúne possíveis ortólogos da proteína 14-3-3A de tabaco. O grupo colorido de roxo reúne possíveis ortólogos da proteína 14-3-3D de tabaco.

Figura 18. **Detalhe do grupo que reúne os possíveis ortólogos da proteína 14-3-3A de tabaco: St-20R, SI-TFT5, Nb-Nbv3K665802322, At-GRF2, At-GRF1, At-GRF4 e Os-GF14A.** É possível identificar a sequência Nt-TC122980 como provável homeólogo da 14-3-3A. Siglas: *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum tuberosum* (St), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Valores de *Bootstrap* são apresentados em cada nó.

Figura 19. Detalhe do grupo que reúne os possíveis ortólogos da proteína 14-3-3D de tabaco: Nb-Nbv3K585727603, SI-TFT1, St-35G, At-GRF6 e At-GRF8. Siglas: *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum tuberosum* (St), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Valores de *Bootstrap* são apresentados em cada nó.

Tabela 10. Informações sobre funções ou associações específicas das 14-3-3s consideradas ortólogas às proteínas 14-3-3A de tabaco.

Organismo	Proteína	Dados levantados na literature	Fonte
<i>O. sativa</i>	GF14A	- Expressão aumentada em condição de estresse salino	Nohzadeh <i>et al.</i> , 2007
<i>A. thaliana</i>	GRF1	- Associada a processo de metabolismo do N e S - Restaura o mutante Rad24- de <i>S. pombe</i>	Shin <i>et al.</i> , 2011; Kuromori e Yamamoto, 2000
<i>A. thaliana</i>	GRF2	- Se liga a CDC25 de levedura - Restaura o mutante Rad24- de <i>S. pombe</i> - Interage com a proteína Wee1 - Regula a Nitrato Redutase	Sorrel <i>et al.</i> , 2003 Grønlund <i>et al.</i> , 2009 Lambeck <i>et al.</i> , 2012
<i>A. thaliana</i>	GRF4	- Associada à regulação do transporte de íons - Restaura o mutante Rad24- de <i>S. pombe</i>	Jahn <i>et al.</i> , 1997; Kuromori e Yamamoto, 2000
<i>S. lycopersicum</i>	TFT5	- Regula enzimas relacionadas à defesa	Li <i>et al.</i> , 2013
<i>S. tuberosum</i>	20R	- Regula o metabolismo de carboidratos e a Nitrato Redutase	Szopa <i>et al.</i> , 2002

Não foram encontradas informações específicas a respeito da proteína Nbv3K665802322.

Tabela 11. Informações sobre funções ou associações específicas das 14-3-3s consideradas ortólogas às proteínas 14-3-3D de tabaco.

Organismo	Proteína	Dados levantados na literature	Fonte
<i>A. thaliana</i>	GRF6	- Possui efeito na resposta por ABA	Peethambaran <i>et al.</i> , 2012
		- Associada à tolerância à seca e a patógenos	Yang <i>et al.</i> , 2009
		- Se liga à CDC25 de levedura.	Sorrel <i>et al.</i> , 2003
<i>A. thaliana</i>	GRF8	- Associada a processo de metabolismo do N e S.	Shin <i>et al.</i> , 2011
		- É capaz de se ligar a CDC25 de levedura	Sorrel <i>et al.</i> , 2003
<i>S. lycopersicum</i>	TFT1	- Regula enzimas relacionadas à defesa	Taylor <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2013

Não foram encontradas informações específicas a respeito da proteína St-35G e Nb-Nbv3K585727603.

4.6. Plantas transgênicas

Na tentativa de identificar o papel das proteínas 14-3-3A e D durante o desenvolvimento floral de tabaco, foram produzidos dois grupos de plantas transgênicas silenciadas via interferência por RNA (RNAi). O primeiro grupo denominado RNAi-A, é composto de plantas com silenciamento do gene 14-3-3A, enquanto o segundo grupo, denominado RNAi-D, possui plantas silenciadas para o gene 14-3-3D.

4.6.1. Plantas transgênicas com silenciamento do gene 14-3-3A

Foram regeneradas 16 plantas a partir dos discos foliares infectados com a construção para silenciamento do gene 14-3-3A. Tais plantas foram denominadas: A1.1, A2.1, A3.1, A4.1, A5.1, A6.1, A7.1, A9.1, A11.1, A12.1, A14.1, A15.1, A16.1, A20.1 e A20.2. A confirmação da presença do transgene por *PCR* mostrou que, com exceção das plantas A7.1 e A12.1, todas as demais possuíam a banda de tamanho esperado (fragmento de 432 pb). Nestas duas plantas não foi possível amplificar a região do inserto a partir de seu DNA genômico (Figura 20). Esses DNAs foram utilizados na amplificação do gene da Actina para verificar um possível problema com o DNA molde. A amplificação do gene da Actina ocorreu normalmente (dados não mostrados). No caso da planta A12.1, é possível que tenha ocorrido um rearranjo genômico, devido ao tamanho do fragmento amplificado, que é muito maior do que o esperado. No entanto, no caso da planta A7.1, não houve a amplificação de nenhum fragmento, por isso, é possível que ela não tenha sido transformada.

Figura 20. Géis de agarose 1% mostrando fragmentos amplificados para checagem da transgenia das plantas de RNAi-A. O fragmento esperado possuía 432 pb. Canaletas: M - marcador de tamanho molecular (1kb Plus DNA Ladder – Invitrogen); NTC – *no template control*; SR1 – amplificação com DNA de planta selvagem (controle negativo); restante das canaletas – amplificação com DNA das plantas do grupo RNAi-A.

Apenas as plantas confirmadas como transgênicas foram levadas à casa de vegetação. As plantas A1.1 e A4.1 não foram utilizadas nas análises posteriores pois foram regeneradas tardiamente em relação às demais, o que dificultaria as análises de fenótipo, uma vez que tais plantas se encontravam em estádios de desenvolvimento diverso do restante do Grupo RNAi-A. Os transgênicos A7.1 e A15.1 foram contaminados por uma doença que atacou diversas plantas presentes na casa de vegetação durante tal período, e por isso, foram descartados. Dessa forma, as análises prosseguiram com nove plantas transgênicas: A2.1, A3.1, A9.1, A11.1, A13.1, A14.1, A16.1 A20.1, A20.2, sendo as plantas A20.1 e A20.2 provavelmente clones, já que são provenientes do mesmo calo.

- Nível de Silenciamento – Transgênicos RNAi-A

O nível de expressão de *14-3-3A* em plantas transgênicas foi determinado por meio de *RT-qPCR*. O cDNA foi sintetizado a partir de RNA do estigma e do estilete em estágio 10 do desenvolvimento floral, de plantas transgênicas e de SR1 (controle não transgênico). Todos os RNAs utilizados tiveram sua integridade checada por meio de gel de agarose com isotiocianato de guanidina (em Anexo 5). A expressão de *14-3-3A* nas plantas transgênicas foi calculada em relação à expressão deste gene observada em SR1, que foi considerada como 1 (Figura 21). A planta A2.1 exibiu silenciamento de aproximadamente 50%, enquanto os demais transgênicos exibiram silenciamento ainda mais pronunciado, sendo estes

maiores que 80%. Apenas o transgênico A14.1 não apresentou os níveis de expressão de *14-3-3A* reduzidos, possuindo inclusive expressão mais elevada em relação às plantas selvagens.

Figura 21. **Nível de expressão de *14-3-3A* das plantas transgênicas do grupo RNAi-A.** SR1 – Planta selvagem. A expressão de *14-3-3A* em plantas transgênicas é calculada em relação à expressão em SR1, que foi considerada como 1. Como genes de referência foram utilizados GAPDH e RPL2.

- Análises Fenotípicas – Transgênicos RNAi-A

As plantas transgênicas foram avaliadas em relação à sua morfologia externa e comparadas com plantas SR1 mantidas sob as mesmas condições ambientais. Dentre as plantas do grupo RNAi-A, apenas os indivíduos A9.1, A20.1 e A20.2 apresentaram alterações fenotípicas macroscópicas. Estes transgênicos exibiram níveis de silenciamento do gene *14-3-3A* maiores de 90%, e é importante lembrar que as plantas A20.1 e A20.2 são clones. A seguir são descritas as principais características destes transgênicos:

Transgênico A9.1 (Figura 22) – Planta de aparência frágil, apresentava baixa estatura e folhas pequenas. As folhas da base possuíam aparência murcha e envelhecida em relação às folhas de plantas selvagens (SR1) de mesma idade. Produzia poucas flores, que possuíam morfologia alterada. Não foi observada a formação de frutos naturalmente, apenas por meio de polinização controlada (manual). Contudo, estes frutos eram menores do que os produzidos por plantas selvagens. As flores da primeira florada exibiam pétalas alongadas, com contorno mais retilíneo, não apresentando a protuberância típica da corola da flor de

tabaco. Ainda apresentavam encurtamento dos filetes e estiletos e, algumas flores, possuíam estigma com três septos. Nas demais floradas, os botões continuavam a exibir corola retilínea, contudo, esta passou a apresentar tamanho reduzido, acompanhando os filetes e estiletos encurtados. O estigma possuía morfologia típica de tabaco.

Figura 22. **Morfologia alterada do transgênico A9.1 em relação ao fenótipo selvagem típico (SR1).** A) Flores da primeira florada em estágio 10 de desenvolvimento; B) Flores da segunda florada em estágio 11 de desenvolvimento. C) Transgênica A9.1 e planta selvagem na casa de vegetação e D) Estigma com três septos de A9.1 ao lado de estigma de planta selvagem.

Transgênicos A20.1/A20.2 – Plantas sem alterações macroscópicas nos órgãos vegetativos. Apresentaram flores com pétalas de tamanho levemente reduzido em relação às de plantas selvagens em todas as floradas (Figura 23). Algumas flores também apresentavam alongamento do estilete (Figura 24). Reproduziam-se normalmente, formando frutos e sementes férteis.

Figura 23. Flores do transgênico A20.1 com corola reduzida em comparação a flores de SR1. A e B) Flores no estágio 11 de desenvolvimento; C e D) Flores no estágio 12 de desenvolvimento.

Figura 24. Flores do transgênico A20.2 com corola reduzida e estilete alongado em comparação a flores de planta SR1. A) e B) Flores no estágio 11 de desenvolvimento; C) e D) Flores no estágio 12 de desenvolvimento.

- Análise de Segregação

Após a conclusão das análises fenotípicas e de expressão, foram realizadas polinizações controladas, objetivando a obtenção de sementes transgênicas para posterior análise da geração T_1 . Foram realizadas autopolinizações; polinizações cruzadas entre SR1 e T_0 ; e também entre T_0 de plantas silenciadas para 14-3-3A e T_0 de plantas silenciadas para 14-3-3D. As sementes produzidas pelos cruzamentos SR1 x T_0 foram utilizadas em um teste de segregação, visando detectar o número provável de inserções do transgene no genoma das plantas.

Este teste se baseia na proporção da prole que possuirá o inserto, dependendo do número de transgenes que tiverem sido integrados do genoma do parental. Para tal, uma hipótese é testada utilizando-se o teste de qui-quadrado (χ^2). O número esperado de indivíduos que possuem ou não o inserto é baseado na proporção teórica considerando a

segregação independente do transgene. Por exemplo, no caso da integração de apenas um inserto, espera-se que a prole proveniente do cruzamento transgênico x selvagem se apresente na proporção 1:1 (1 transgênico para 1 selvagem). Dessa forma, é importante ressaltar que este teste não é capaz de detectar a presença de dois ou mais transgenes ligados geneticamente.

Esta análise foi realizada com os transgênicos A16.1, A20.2 e A13.1. O transgênico A9.1 não foi avaliado pois apenas um fruto pequeno foi obtido por meio das polinizações controladas e este foi armazenado para futuras análises. Sementes provenientes do cruzamento das plantas mencionadas acima, com SR1, foram semeadas em meio com canamicina. Foi observada a quantidade de plântulas resistentes e sensíveis a este antibiótico, uma vez que a construção gênica utilizada confere resistência à canamicina. O teste de χ^2 foi realizado considerando $\alpha = 5\%$ e grau de liberdade (GL) = 1 e valor crítico de $\chi^2 = 3,841$. Foram testadas várias hipóteses (H_0) até que se determinasse o provável número de inserções (Tabela 12). Dessa maneira, as análises mostraram que o transgênico A16.1 possuía apenas um inserto, sendo a segregação neste caso de 1:1. Enquanto a planta A13.1 apresentava duas inserções, com segregação de 3:1 (três resistentes para uma sensível), e A20.2 possuía 5 inserções, com segregação de 31:1 (31 resistentes para uma sensível).

Relacionando os dados obtidos nesta análise de segregação e os níveis de expressão de *14-3-3* observados no experimento de *RT-qPCR*, podemos verificar que embora o transgênico A20.2 possua cinco inserções, o nível de silenciamento foi menor do que o observado em A16.1, que possui apenas 1 inserto. Em organismos transgênicos, o nível de expressão do transgene sofre influência do número de cópias inseridas, mas isso não significa que o nível de expressão será proporcional ao número de cópias (Hobbs *et al.*, 1990). Adicionalmente, o local de inserção do transgene também tem influência no nível de expressão deste (Dean *et al.*, 1988).

Tabela 12. Análise de segregação de plantas de silenciamento do gene *14-3-3A*. Teste de χ^2 com $\alpha=5\%$ e GL=1.

Inserções	Planta	Sementes	R – Obs	S - Obs	R - Esp	S – Esp	χ^2	H ₀
1	A13.1	128	102	26	64	64	45,125	Rejeitada
2	A13.1	128	102	26	96	32	1,500	<u>ACEITA</u>
3	A13.1	128	102	26	112	16	7,143	Rejeitada
1	A16.1	153	83	70	76,5	76,5	1,105	<u>ACEITA</u>
2	A16.1	153	83	70	114,75	38,25	35,139	Rejeitada
1	A20.2	253	245	8	126,5	126,5	222,012	Rejeitada
2	A20.2	253	245	8	189,75	63,25	64,349	Rejeitada
3	A20.2	253	245	8	221,37	31,62	20,166	Rejeitada
4	A20.2	253	245	8	237,2	15,8	4,107	Rejeitada
5	A20.2	253	245	8	245,1	7,9	0,001	<u>ACEITA</u>

R – Obs – Total de plântulas resistentes observadas; S – Obs – Total de plântulas sensíveis observadas; R – Esp – Total de resistentes esperadas e S – Esp – Total de sensíveis esperadas.

O procedimento realizado visando a análise de segregação evidenciou as baixas taxas de germinação nas sementes provenientes dos cruzamentos entre SR1 e os transgênicos A13.1 e A16.1, como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13. Taxa de germinação em sementes de cruzamento entre SR1 e T₀ RNAi-A.

Cruzamento	Sementes	Germinadas	Taxa de Germinação
SR1 x A13.1	270	128	47,40%
SR1 x A16.1	258	153	59,30%
SR1 x A20.2	270	253	93,70%
SR1 x SR1	300	266	88,66%

4.6.2. Plantas transgênicas com silenciamento do gene *14-3-3D*

Foram regeneradas 22 plantas a partir dos discos foliares infectados com a construção para silenciamento do gene *14-3-3D*. Essas plantas foram denominadas: D2.1, D.2.2, D5.1, D6.1, D8.1, D9.1, D11.1, D12.1, D13.1, D13.2, D18.1, D19.1, D20.1, D23.1, D23.2, D26.1, D28.1, D29.1, D30.1, D31.1, D32.1 e D32.2. A amplificação da região do inserto (fragmento de 578 pb), a partir de DNA genômico das plantas regeneradas, mostrou que todas elas eram transgênicas (Figura 25). Após tal confirmação, as plantas foram levadas à casa de vegetação. Os indivíduos D5.1, D6.1, D28.1, D29.1 e D31.1 foram eliminados das análises posteriores por terem sido regeneradas tardiamente em relação às demais plantas

ou por terem adoecido na casa de vegetação, como relatado para algumas plantas de RNAi-A. Dessa forma, as análises prosseguiram com 17 plantas, sendo 14 transgênicos independentes, ou seja, regenerados de calos diferentes, não sendo, portanto, considerados clones.

Figura 25. Géis de agarose 1% mostrando fragmentos amplificados para checagem da transgenia das plantas de RNAi-D. O fragmento esperado possuía 578 pb. Canaletas: M - marcador de tamanho molecular (1kb Plus DNA Ladder – *Invitrogen*); NTC – *no template control*; SR1 – amplificação com DNA de planta selvagem (controle negativo); restante das canaletas – amplificação com DNA das plantas do grupo RNAi-D.

- Nível de Silenciamento – Transgênicos RNAi-D

A expressão de *14-3-3D* no estigma e no estilete (em estágio 10) de plantas RNAi-D foi determinada por *RT-qPCR*, revelando o nível de silenciamento em cada transgênico (Figura 26). A análise foi realizada de maneira semelhante ao descrito para os transgênicos RNAi-A. O gel mostrando a integridade dos RNAs utilizados pode ser verificado no Anexo 5. O transgênico D11.1 não apresentou os níveis de expressão de *14-3-3D* reduzidos e D9.1 apresentou pouca redução. Em contrapartida, todos os demais transgênicos apresentaram níveis de silenciamento superiores a 60%, e o total de oito transgênicos apresentaram a expressão de *14-3-3D* reduzida em mais de 80%.

Figura 26. **Nível de silenciamento das plantas transgênicas do grupo RNAi-D em comparação com SR1.** A expressão de *14-3-3D* foi calculada em relação à expressão em plantas SR1, que foi considerada como 1. Foram utilizados como genes de referência *GAPDH* e *RPL2*.

- Análises Fenotípicas – Transgênicos RNAi-D

As plantas transgênicas foram avaliadas em relação à sua morfologia externa e comparadas com plantas SR1 mantidas sob as mesmas condições ambientais. Os indivíduos D13.1 e D26.1 apresentaram alterações fenotípicas macroscópicas. Dentre todos os transgênicos RNAi-D, estes foram os que exibiram níveis mais elevados de silenciamento. A seguir são descritas as principais características destes transgênicos:

Transgênico D13.1 (Figura 27) – Planta de tamanho diminuto como um todo. Apresentava baixa estatura, folhas e caule de dimensões reduzidas. Todas as flores eram consideravelmente menores do que as de SR1. Estas possuíam cálice, corola, filetes, anteras, estigmas e ovários pequenos. O estilete era menor do que o observado em SR1, no entanto, sua diminuição foi proporcionalmente menor do que a observada em outros órgãos florais, por isso, a relação de altura entre as anteras e o estigma foi alterada. A planta não produzia frutos naturalmente, apenas com polinização controlada (manual). Estes frutos produziam sementes férteis.

Figura 27. **Morfologia alterada do transgênico D13.1 em relação ao fenótipo selvagem típico (SR1).** A e B) Flores em estágio 11 de desenvolvimento; C e D) Flores em estágio 12 de desenvolvimento; E) Detalhe de estigmas de D13.1 e de SR1; F) Anteras de D13.1 e de SR1; G) Plantas selvagens e planta D13.1 na casa de vegetação.

Transgênico D26.1 (Figura 28) – Planta com características vegetativas normais. As flores possuíam tamanho reduzido, principalmente as pétalas. Reproduzia-se normalmente, produzindo sementes férteis.

Figura 28. **Flores do transgênico D26.1 em comparação a flores de SR1.** A) e B) Flores no estágio 11 de desenvolvimento; C) e D) Flores no estágio 12 de desenvolvimento.

-Análise de Segregação

Assim como descrito para os transgênicos RNAi-A, foram realizadas polinizações controladas com as plantas RNAi-D, objetivando a obtenção de sementes dos transgênicos para posterior análise da geração T₁. As sementes produzidas pelos cruzamentos SR1 x T₀ foram utilizadas em um teste de segregação, visando detectar o número provável de inserções do transgene no genoma das plantas. A análise foi realizada com os transgênicos D2.1, D13.1 e D26.1. Sementes foram semeadas em meio MS com higromicina e foi observada a quantidade de plântulas resistentes e sensíveis a este antibiótico, uma vez que a construção gênica utilizada confere resistência a tal substância. O teste de χ^2 foi realizado considerando $\alpha = 5\%$, grau de liberdade (GL) = 1 e valor crítico de $\chi^2 = 3,841$. Foram testadas as hipóteses (H₀) de uma única inserção e de duas inserções no genoma das plantas (Tabela 14). As análises sugeriram que os três transgênicos testados apresentavam apenas um inserto, sendo a segregação teórica para este caso de 1:1 (um resistente para um sensível).

Tabela 14. Análise de segregação de plantas de silenciamento do gene *14-3-3D*. Teste de χ^2 com $\alpha=5\%$ e GL=1.

Inserções	Planta	Sementes	R - Obs	S - Obs	R - Esp	S - Esp	χ^2	H ₀
1	D2.1	214	114	100	107	107	0,91589	<u>ACEITA</u>
2	D2.1	214	114	100	160,5	53,5	53,8879	Rejeitada
1	D13.1	229	108	121	114,5	114,5	0,73799	<u>ACEITA</u>
2	D13.1	229	108	121	171,75	57,25	94,6507	Rejeitada
1	D26.1	207	111	96	103,5	103,5	1,08696	<u>ACEITA</u>
2	D26.1	207	111	96	155,25	51,75	50,4493	Rejeitada

R – Obs: Total de plântulas resistentes observadas; S – Obs: Total de plântulas sensíveis observadas; R – Esp: Total de resistentes esperadas e S – Esp: Total de sensíveis esperadas.

O procedimento realizado durante a análise de segregação permitiu também a observação das taxas de germinação nas sementes provenientes dos cruzamentos entre os transgênicos RNAi-D e SR1 (Tabela 15).

Tabela 15. Taxa de germinação em sementes de cruzamento entre SR1 e plantas RNAi-D.

Cruzamentos	Sementes	Germinadas	Taxa de Germinação
SR1 x D2.1	271	214	78,96%
SR1 x D13.1	273	229	83,88%
SR1 x D26.1	247	207	83,80%
SR1 x SR1	300	266	88,66%

4.6.3. Geração T₁ – Análises Preliminares

Após a obtenção de sementes provenientes de polinizações controladas, parte destas foram semeadas em meio MS, utilizando antibióticos apropriados (canamicina e/ou higromicina) para seleção de sementes transgênicas. Foram semeadas três sementes de cada um dos seguintes cruzamentos:

Autoplonizações – A3.1 x A 3.1, A13.1 x A13.1, A20.2 X A20.2, D2.1 x D2.1, D13.1 x D13.1, D26.1 x D26.1.

SR1 x Transgênicas – SR1 x A13.1, SR1 x A16.1, SR1 x A20.2, SR1 x D2.1, SR1 x D13.1, SR1 x D26.1.

RNAiA x RNAiD – D2.1 x A20.2, A13.1 x D26.1, A20.2 x D13.1.

As sementes germinadas não possuíam modificações morfológicas evidentes, entretanto, após 37 dias de crescimento, foram observadas alterações no tamanho em plantas dos cruzamentos A13.1 x D26.1; A20.2 x D13.1; D13.1 x D13.1 (Figura 29). Essas plantas não foram observadas na fase adulta.

Figura 29. Plantas da geração T₁, 37 dias após a germinação, apresentando redução de tamanho em relação a plantas SR1. A) Plântula SR1 e plântula derivada do cruzamento A13.1 x D26.1; B) Plântula SR1 e plântula derivada do cruzamento A20.2 x D13.1; e C) Plântula SR1 e plântula derivada do cruzamento D13.1xD13.1.

- Localização subcelular de SCI1 em plantas transgênicas T₁

Com o intuito de observar se em plantas com níveis reduzidos de 14-3-3A e D ocorre modificação no padrão de localização subcelular de SCI1, foram realizados experimentos de expressão transiente da proteína de fusão SCI1-GFP em folhas de plantas transgênicas de silenciamento. Foram utilizadas plantas provenientes dos cruzamentos A20.2 x A20.2; D13.1 x D13.1 e A20.2 x D13.1, que foram germinadas *in vitro* em meio MS suplementado com os antibióticos canamicina e/ou higromicina. As folhas infiltradas foram coradas com DAPI e observadas em microscópio confocal 48 horas após a infiltração. A observação da fluorescência da proteína GFP revelou que não ocorreram alterações na localização de SCI1 (Figura 30). Tanto nas plantas transgênicas quanto em SR1, SCI1 foi observado no nucléolo.

Localização de SCI1-GFP + DAPI

Figura 30. **Localização subcelular de SCI1-GFP em plantas transgênicas.** A, B e C) SR1. D, E e F) A20.2 x A20.2. G, H e I) D13.1 x D13.1. J, L e M) A20.2 x D13.1.

5. Discussão

5.1. A interação entre SCI1 e as proteínas 14-3-3

5.1.1. A interação com dímeros de 14-3-3s

As 14-3-3s são capazes de interagir e modular a função de um grande número de proteínas celulares (de Boer *et al.*, 2013). Como consequência, elas atuam regulando importantes processos biológicos associados a vias metabólicas, desenvolvimento, controle de transcrição, ciclo celular, entre outros (Aducci *et al.*, 2002; Chevalier, 2009). Elas formam dímeros (Jones *et al.*, 1995) que podem interagir simultaneamente com duas proteínas distintas ou com dois sítios de uma mesma proteína (Xiao *et al.*, 1995; Yaffe *et al.*, 1997). Dessa maneira, podem atuar estimulando o contato físico entre duas proteínas ou alterando a atividade de uma proteína, por meio da mudança de sua conformação, de sua localização subcelular, ou encobrimento de uma região específica (Obsil & Obsilova, 2011).

Dados obtidos no presente trabalho e pelo doutorando Edward José Strini (pertencente ao nosso grupo de pesquisa) demonstram que as proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum* são capazes de se ligar a proteína SCI1, sugerindo que essas 14-3-3s regulem de alguma maneira sua atividade. A interação entre SCI1 e 14-3-3A foi sugerida em *screening* de duplo-híbrido e por um experimento de *pull-down* que utilizou a proteína recombinante SCI1-GFP e extrato de proteínas nucleares de estigma e estilete de tabaco (Strini, dados não publicados). Contudo, resultados negativos foram obtidos quando esta interação foi testada por ensaio de duplo-híbrido par a par. Posteriormente, ensaios realizados no presente estudo demonstraram a ocorrência desta interação *in vivo* por BiFC. Dentre as técnicas utilizadas, *pull-down* e BiFC são capazes de detectar a interação via complexo proteico e envolvem a presença de proteínas presentes na célula vegetal. Entretanto, o ensaio de duplo-híbrido só identifica interações diretas e é realizado em leveduras (Braun *et al.*, 2013).

Devido às características de tais ensaios, é importante considerar que as proteínas 14-3-3 formam dímeros em sua conformação nativa, e que os diferentes dímeros podem possuir afinidade por proteínas específicas (Liang *et al.*, 2008; Aitken, 2011). Uma vez que estudos demonstraram que nem todas as combinações de dímeros são observadas *in vivo* (Chaudhri *et al.*, 2003; Wilker *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006), a possibilidade da formação de

homodímeros e heterodímeros entre as proteínas 14-3-3A e D foi avaliada no presente trabalho, mostrando que as 14-3-3s aqui estudadas podem formar tanto homodímeros quanto heterodímeros entre si. Dessa forma, sabendo que em um ensaio de duplo-híbrido outras 14-3-3s de plantas não estão presentes para formar heterodímeros com a 14-3-3A, é possível concluir que apenas homodímeros são formados em tal experimento. A vista disso, o resultado negativo obtido em duplo-híbrido ao testar a interação SCI1 x 14-3-3A, sugere que os homodímeros de 14-3-3A não são capazes de se ligar a SCI1. No entanto, uma vez que foram obtidos resultados positivos ao testar essa interação por BiFC e *pull-down*, é possível levantar a hipótese de que a proteína 14-3-3A precisa formar um heterodímero para que a interação com SCI1 ocorra, ou que seu homodímero esteja interagindo com SCI1 por meio de um complexo proteico.

Por outro lado, a interação entre SCI1 e 14-3-3D foi confirmada por *pull-down*, duplo-híbrido, BiFC e co-imunoprecipitação (Strini, dados não publicados). Por isso, é possível concluir que os homodímeros da 14-3-3D são capazes de se ligar a SCI1 (Figura 31 A). Entretanto, isso não descarta a possibilidade de que a 14-3-3D forme heterodímeros que também interajam com SCI1. Como os experimentos de interação proteína-proteína em larga escala (*screening* de duplo-híbrido e *pull-down*), realizados em nosso laboratório, não encontraram outras 14-3-3s como possíveis parceiros de interação de SCI1, este estudo levanta a hipótese de que os heterodímeros formados entre 14-3-3A e 14-3-3D também se liguem a SCI1 (Figura 31 B). Para confirmar se SCI1 realmente é capaz de interagir com esses heterodímeros, como aqui proposto, seria interessante a realização de um experimento de triplo híbrido (Y3H) (Brachmann & Boeke, 1997; Tirode *et al.*, 1997) utilizando a proteína 14-3-3A como ponte.

Figura 31. **Modelo proposto para a interação entre SCI1 e as 14-3-3s.** A) SCI1 seria capaz de interagir com os homodímeros de 14-3-3D; B) e também com os heterodímeros de 14-3-3D x 14-3-3A.

5.1.2. A localização subcelular das 14-3-3s

Os resultados de BiFC obtidos neste trabalho mostram que as interações entre SCI1 e as 14-3-3A e D ocorrem no núcleo, enquanto as proteínas envolvidas nestas interações possuem diferentes padrões de distribuição quando não estão ligadas ao seu parceiro de interação. Embora ocorram exceções, as proteínas 14-3-3 são conhecidas por apresentar distribuição citosólica (Muslin & Xing, 2000). Essa localização preferencial é observada, principalmente, quando as 14-3-3s não estão ligadas a seus alvos, e pode ser alterada quando essas interações ocorrem (Paul *et al.*, 2005; Chevalier, 2009). O padrão observado neste trabalho se assemelha ao descrito na literatura. A proteína 14-3-3A apresenta localização nuclear e citoplasmática, e o mesmo foi observado em relação aos seus homodímeros. Entretanto, os heterodímeros com a 14-3-3D são restritos ao citoplasma e ausentes do núcleo. A proteína 14-3-3D se encontra distribuída majoritariamente no citoplasma, sendo também esta a localização observada no caso dos seus homodímeros e dos heterodímeros com a 14-3-3A. Levando em consideração a hipótese de que os homodímeros da 14-3-3D e os heterodímeros formados entre as 14-3-3A e 14-3-3D interagem com SCI1, esses resultados indicam uma mudança de localização dessas 14-3-3s, do citoplasma para o núcleo, em decorrência desta interação.

Além do verificado para as proteínas 14-3-3, a distribuição primária de SCI1 também difere daquela observada durante a interação. Como descrito em DePaoli *et al.* (2011), SCI1 se concentra na região do nucléolo, o que também indica uma mudança na sua localização no momento da interação com as 14-3-3s. No caso de SCI1, uma possível interpretação seria de que as 14-3-3s estariam modulando sua atividade por meio da mudança de sua localização subcelular, e dessa maneira, estariam impedindo sua função no nucléolo, ou ainda, possibilitando a atividade de SCI1 fora dele e a sua interação com outras proteínas ali presentes. Esse tipo de efeito na localização subcelular de proteínas em decorrência da interação com 14-3-3s já foi descrito para muitas proteínas alvo (Muslin & Xing, 2000). No entanto, ainda são necessários mais estudos para afirmar que as 14-3-3s sejam responsáveis pela mudança de localização SCI1.

5.1.3. Sítios de ligação a proteínas 14-3-3s

As proteínas da família 14-3-3 são conhecidas por se ligarem preferencialmente a alvos fosforilados em resposta a sinais intracelulares (Chevalier, 2009). Alguns estudos revelaram que estes alvos possuem motivos característicos de ligação às 14-3-3s, contendo fosfoserinas ou fosfotreoninas. Os primeiros motivos consensos caracterizados foram: Mode I - (RSX-pS/pT-XP) e Mode II - RXXX-pS/pT-XP, onde pS/pT representa um serina ou uma treonina fosforilada e X qualquer aminoácido, existindo uma tendência para a presença de alguns aminoácidos específicos (Yaffe *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2011). Posteriormente, foi identificado o chamado consenso Mode III - pS/pT-X-COOH, localizado na região C-terminal de proteínas. A ligação de 14-3-3s a este sítio encobre o sinal de retenção no retículo endoplasmático e redireciona as proteínas alvo à superfície da membrana (Coblitz *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011). Dentre estes motivos, o consenso Mode I está presente na maioria dos parceiros das 14-3-3s conhecidos, sendo que em plantas existe a tendência de que esta sequência seja LX(R/K)SX-pS-XP (Aitken, 2011). Embora se assuma que as 14-3-3s se liguem preferencialmente a estas sequências, muitas proteínas alvo apresentam motivos de reconhecimento por 14-3-3s que diferem consideravelmente destes consensos, existindo ainda, peptídeos não fosforilados que interagem com alta afinidade com as 14-3-3s (Aitken, 2011; Obsil & Obsilova, 2011). O presente estudo encontrou três sítios putativos de interação com 14-3-3s na sequência de aminoácidos de SCI1. Estes sítios foram encontrados por meio de uma busca por motivos Mode I realizada com o software *Motifscan*, que não possui ferramentas para realização de buscas pelos motivos Mode II e III. Os três sítios encontrados diferem das sequências consenso descritas até então, entretanto o sítio 1 é mais semelhante à sequência Mode I típica de plantas.

Como apresentado na seção Resultados, os sítios 2 e 3 se sobrepõem e foram tratados aqui como uma única possível região de interação. Dessa forma, de acordo com este estudo, SCI1 possui duas regiões putativas para interação com proteínas 14-3-3. Outras proteínas com mais de um motivo de reconhecimento por 14-3-3s já foram descritas na literatura (Yaffe, 2002). Essas moléculas seriam capazes de se ligar simultaneamente às duas subunidades de um dímero de 14-3-3 (Yaffe, 2002; Obsilová *et al.*, 2008). Para muitas delas, um dos motivos seria dominante, de maneira que na sua ausência, o segundo motivo não seria capaz de promover a interação. Entretanto, uma vez que o sítio dominante esteja

ligado a uma subunidade de uma 14-3-3, o sítio secundário é capaz de interagir com o outro monômero (Yaffe, 2002). A análise da interação entre as 14-3-3s e as sequências mutadas de SCI1 (SCI1Mut1, SCI1Mut2 e SCI1Mut3) poderá determinar se os dois sítios de reconhecimento de 14-3-3, preditos na sequência de SCI1, são realmente responsáveis por essa interação. A análise das regiões putativas de interação individualmente (SCI1Mut1 e SCI1Mut2) seguida de uma análise em conjunto (SCI1Mut3) poderá indicar, inclusive, se as regiões são igualmente necessárias para a interação, ou se existe um sítio dominante. Até o momento, apenas as interações SCI1Mut1 x 14-3-3A e SCI1Mut1 x 14-3-3D foram avaliadas. Os experimentos de BiFC mostraram que a mutação no sítio 1 não foi capaz de impedir a interação, sugerindo que este sítio não seja essencial para a ocorrência da ligação.

5.2. As funções das proteínas 14-3-3A e 14-3-3D

5.2.1. Os ortólogos das 14-3-3A e D de tabaco

Os genes de diferentes genomas podem ser representados por meio de um sistema de famílias gênicas homólogas, compostas de genes ortólogos e parálogos (Tatusov *et al.*, 1997). Ortólogos são genes homólogos presentes em diferentes espécies que evoluíram a partir de uma sequência ancestral por meio de um evento de especiação (ortho – exato). Enquanto parálogos são genes homólogos que resultam de um evento de duplicação dentro de um genoma (para – em paralelo) (Fitch, 1970). Geralmente, se assume que ortólogos preservam a função de seu gene precursor, apresentando, portanto, as mesmas funções biológicas em diferentes espécies (Theißen, 2002). Por outro lado, genes parálogos recém-duplicados apresentam funções redundantes dentro do mesmo genoma. Essa situação, em longo prazo, pode levar a evolução de novas funções por uma das cópias, levando a divergência funcional entre os genes parálogos (Fitch, 2000; Theißen, 2002). Dessa maneira, distinguir sequências ortólogas daquelas que apresentam outros tipos de homologia é um passo importante, quando se deseja inferir a função biológica de um gene ou proteína ainda não caracterizada, com base em anotações realizadas em outros genomas (Kristensen, 2011). No caso de sequências que apresentam alta similaridade entre espécies e poucas duplicações ao longo de sua história evolutiva, assume-se, com alta confiabilidade, que os ortólogos apresentam funções semelhantes (Fang *et al.*, 2010). Entretanto, em famílias

gênicas que apresentam um grande número de duplicações e/ou deleções ao longo da evolução, os genes ortólogos podem apresentar divergência funcional (Fang *et al.*, 2010).

A análise comparativa entre sequências proteicas da família 14-3-3 de *A. thaliana*, *O. sativa* e as solanáceas *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *N. benthamiana* e *N. tabacum*, realizada neste estudo, permitiu a identificação de grupos de ortólogos das proteínas 14-3-3A e D de tabaco. Nas solanáceas foram identificadas como possíveis ortólogas da 14-3-3A as proteínas: TFT5 de *S. lycopersicum*; 20R de *S. tuberosum* e Nbv3K665802322 de *N. benthamiana*. Em *A. thaliana*, as proteínas GRF1, GRF2 e GRF4 formam um grupo de ortólogos com as proteínas 14-3-3A, H e F de *N. tabacum*. Em *O. sativa* GF14A aparece como possível ortóloga das proteínas 14-3-3A, H, F, B e C de tabaco. No caso da proteína 14-3-3D foram identificadas as seguintes sequências ortólogas em solanáceas: TFT1 de *S. lycopersicum*; 35G de *S. tuberosum* e Nbv3K585727603 de *N. benthamiana*. Adicionalmente, as GRF6 e GRF8 de *A. thaliana* foram identificadas formando um grupo de ortólogos com as proteínas 14-3-3D e G.

Como apresentado nas Tabelas 10 e 11 da seção Resultados, nenhum dos ortólogos encontrados tem função relacionada ao desenvolvimento floral descrita. Apenas a GRF2 de *Arabidopsis* parece ter níveis de expressão elevados nos órgãos florais (Sorrel *et al.*, 2003). Dentro do grupo dos ortólogos da 14-3-3A, e também no caso dos ortólogos da 14-3-3D, as proteínas apresentaram funções distintas entre as correspondentes nas diferentes espécies. Este fato pode estar associado à presença de uma divergência funcional entre as proteínas ortólogas, ou ao fato de que as 14-3-3 participam de múltiplos processos, que podem depender inclusive da formação de heterodímeros específicos. Mas é possível que se deva, também, à falta de dados da literatura a respeito das funções específicas dessas isoformas, principalmente no caso das solanáceas. Apesar desta dificuldade, a função de regulação do metabolismo do nitrogênio foi relacionada a três ortólogos da proteína 14-3-3A: a 20R de batata e as GRF1 e GRF2 de *Arabidopsis*, indicando que tal proteína de tabaco também pode estar relacionada a este processo, que é um dos mais bem estudados em plantas, dentre os regulados por proteínas 14-3-3 (Chevalier, 2009; Lambeck *et al.*, 2012).

A maioria dos dados relacionados à função de proteínas 14-3-3s na literatura foi obtida a partir de estudos na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, e por isso, o presente trabalho conseguiu associar as proteínas 14-3-3s de *Arabidopsis* a um maior número de

funções quando comparado aos dados levantados para as outras espécies. Foram encontradas três sequências de *A. thaliana* (GRF1, GRF2 e GRF4) ortólogas a um grupo de proteínas de tabaco, que inclui a 14-3-3A. Situação semelhante foi observada para as sequências GRF6 e GRF8, que são ortólogas às 14-3-3D e G. Esta relação, onde um grupo de proteínas de um organismo é considerado ortólogo de um grupo de proteínas em um segundo organismo, é frequentemente observada em análises evolutivas de famílias proteicas (Fitch, 2000; Theißen, 2002). Ela reflete a ocorrência de eventos de duplicação independentes, após a separação entre os grupos. De tais sequências ortólogas de *Arabidopsis* indicadas, todas já foram vinculadas ao ciclo celular de alguma maneira. Já foi demonstrado que a proteína GRF2 interage com a WEE1 de *Arabidopsis* (Grønlund *et al.*, 2009), proteína conhecida por sua função de inibição do ciclo celular por meio da regulação de *checkpoints*. Contudo, ainda não se sabe qual a função desta interação na progressão do ciclo celular de plantas. Além disso, as proteínas GRF2, GRF6 e GRF8 são capazes de se ligar a Cdc25 de *S. pombe* (Sorrel *et al.*, 2003), e as proteínas GRF1, GRF2 e GRF4 são capazes de restaurar o mutante *rad24⁻* (mutante para uma 14-3-3) na mesma levedura, levando ao funcionamento adequado do ciclo celular (Kuromori & Yamamoto, 2000). Apesar de ainda não ter sido identificada em plantas uma proteína com função análoga a Cdc25 de leveduras, o fato de algumas 14-3-3s de *Arabidopsis* conseguirem se ligar a Cdc25 de leveduras e restaurar mutantes *rad24⁻* sugere que houve a conservação de uma função relacionada ao ciclo celular ao longo da evolução destes organismos. Como consequência, é possível que estas 14-3-3s também realizem funções durante os *checkpoints* em plantas. Dessa forma, estes dados sugerem que as 14-3-3A e D de tabaco também apresentem a conservação desta função no ciclo celular. Para confirmar se as proteínas 14-3-3A e D de tabaco apresentam a mesma função de seus ortólogos em *A. thaliana*, seria interessante verificar se elas também são capazes de se ligar a WEE1 de plantas e a Cdc25 de leveduras de maneira semelhante ao observado para seus ortólogos.

5.2.2. Fenótipos em plantas transgênicas

A inferência de sequências ortólogas em genomas anotados é um caminho para levantar informações a respeito da função potencial de genes e proteínas ainda não estudados. No entanto, esta é uma análise preliminar e não pode ser considerada

conclusiva. Por isso, outras estratégias devem ser utilizadas para corroborar os resultados obtidos nestas análises *in silico* ou para relacionar tais genes e proteínas a uma característica ou processo. Uma ferramenta importante na determinação de função gênica é a geração de linhagens mutantes e a análise de seu fenótipo. Algumas espécies, como *Arabidopsis thaliana*, possuem bancos de mutantes (Alonso *et al.*, 2003), no entanto, para espécies que não apresentam essa facilidade, a estratégia de silenciamento gênico via interferência por RNA (RNAi) vem sendo utilizada com sucesso (McGinnis, 2010). Esta foi a ferramenta utilizada neste trabalho com o intuito de investigar a função dos genes *14-3-3A* e *14-3-3D* durante o desenvolvimento do estigma e do estilete de *N. tabacum*. Esta técnica permite o silenciamento específico de um gene alvo ou de um grupo de genes pertencentes à mesma família gênica (Waterhouse e Helliwell, 2003). Como o objetivo deste trabalho foi acessar a função destas *14-3-3s* de maneira individual, as duas construções gênicas utilizadas visavam conduzir o silenciamento específico para os genes *14-3-3A* e *14-3-3D*, respectivamente. Foram geradas então as linhagens RNAi-A e RNAi-D, que foram, posteriormente, cruzadas para futura observação do fenótipo do silenciamento combinado entre as duas *14-3-3s*.

A estratégia de silenciamento gênico via interferência por RNA foi eficaz na produção de plantas com níveis de expressão reduzidos para os genes *14-3-3A* e *14-3-3D*. A maioria das plantas obtidas apresentou silenciamento superior a 80%. Apenas as plantas A14.1 e D11.1 não apresentaram silenciamento dos genes correspondentes, o que pode ser decorrente de um artefato na detecção da expressão gênica, uma vez que moléculas de *hairpin* de RNA que ainda não foram processadas podem estar sendo amplificadas no PCR em tempo real. Tal problema pode ter ocorrido, pois a região de amplificação no PCR coincide com parte da sequência escolhida para a construção do *hairpin*. Este não é o desenho experimental ideal. A região amplificada para análise de expressão das *14-3-3s* deveria estar fora do *hairpin* para garantir a ausência deste tipo de artefato na análise de expressão gênica. No entanto, devido ao alto nível de similaridade entre as sequências gênicas das *14-3-3s* não foi possível realizar este experimento de outra maneira. Para evitar a ocorrência de *off-targets* e aumentar a chance de que apenas uma isoforma da família *14-3-3* fosse silenciada, foi necessário aumentar a especificidade do *hpRNA* em relação ao seu alvo, por isso, a região menos conservada das sequências do gene foi escolhida para construção do *hairpin*. Da mesma maneira, o experimento de *RT-qPCR* não deve amplificar

fragmentos de nenhuma outra 14-3-3 para que o nível de silenciamento seja determinado. Por isso, também foi necessário desenhar os *primers* nesta região. Como alternativa para verificar o nível de silenciamento, este estudo poderia ter realizado um *Western Blot*. Apesar da possibilidade da ocorrência da amplificação do *hpRNA*, apenas duas plantas não apresentaram níveis de expressão reduzidos. Por isso, outra possibilidade a ser levantada seria a de ocorrência de metilação do transgene nestas plantas ao invés da amplificação do *hpRNA*.

O fenótipo das plantas transgênicas obtidas foi avaliado somente em relação a possíveis alterações macroscópicas, focando principalmente na morfologia e arquitetura dos órgãos florais. Apenas dois transgênicos independentes da linhagem RNAi-A apresentaram este tipo de alteração: A9.1 e A20.1/A20.2. O transgênico A9.1 apresentou alterações visíveis tanto nos órgãos vegetativos quanto nos órgãos florais. A flor apresentou mudanças drásticas de forma, mas ainda assim, era capaz de produzir frutos quando polinizada artificialmente. Em contrapartida, os transgênicos A20.1 e A20.2 apresentaram apenas uma leve alteração no tamanho das pétalas. Apesar de essas plantas terem apresentado altos níveis de silenciamento, a variação nas modificações fenotípicas observadas dificulta a elaboração de uma hipótese a respeito da função da proteína 14-3-3A ou de sua interação com SCI1 durante o desenvolvimento floral. Ainda é possível ressaltar que outras plantas com altos níveis de silenciamento, como a planta A16.1, não apresentaram nenhuma alteração fenotípica macroscópica em relação a plantas SR1.

No caso da linhagem RNAi-D, os dois transgênicos com maior nível de silenciamento apresentaram alterações morfológicas. A planta D26.1 apresentou redução no tamanho da flor, sendo esta mais pronunciada no comprimento da corola, enquanto a planta D13.1 apresentou tamanho reduzido como um todo e alteração na relação de altura entre estigma e anteras. A mudança de posição entre estes órgãos reprodutivos parece ter dificultado o processo de autopolinização nesta planta, que produzia frutos apenas por processo de polinização controlada. Apesar de distintas, as modificações observadas em ambas as plantas estão relacionadas à variação de tamanho, o que pode ser decorrente de uma alteração no ciclo celular, por isso, seria interessante investigar se a redução de tamanho nos tecidos afetados é causada por uma diminuição na quantidade ou na dimensão de células. De maneira semelhante ao obtido na linhagem RNAi-A, outras plantas com alto nível

de silenciamento do gene *14-3-3D* não apresentaram nenhum tipo de modificação morfológica macroscópica. No entanto, é importante ressaltar que alterações em genes relacionados à regulação do ciclo celular, podem muitas vezes, levar ao fenômeno de compensação, onde a diminuição no número de células é compensada pelo aumento no tamanho destas, resultando em órgãos de tamanho normal (Horigushi & Tsukaya, 2011; Sablowski & Dornelas, 2013). Por isso, seria interessante a realização de análises de microscopia em plantas T_1 , com intuito de verificar se este fenômeno pode ter sido desencadeado devido ao silenciamento da *14-3-3D*.

No entanto, de maneira geral, as alterações morfológicas, observadas entre as plantas que apresentaram fenótipo alterado dentro das duas linhagens (A9.1, A20.1/A20.2, D13.1 e D26.1), não foram consistentes e dificultaram a análise funcional dos genes *14-3-3A* e *14-3-3D*. Isso pode ser decorrente do fato de as *14-3-3s* apresentarem inúmeros efeitos pleiotrópicos, e certa redundância funcional entre várias isoformas, o que pode levar a co-optação de outras *14-3-3s* para funções desempenhadas pelas proteínas silenciadas. Não obstante essas particularidades, existem estudos bem sucedidos na observação de fenótipos para plantas silenciadas para uma isoforma específica de *14-3-3* (Szopa, 2002). Uma alternativa no caso do presente trabalho seria a avaliação de plantas provenientes do cruzamento entre as linhagens RNAi-A e RNAi-D.

Em análises preliminares, com plantas provenientes de cruzamentos da geração T_0 , sementes de três cruzamentos de cada linhagem foram avaliadas, mostrando que as sementes dos cruzamentos SR1 x A16.1 e SR1 x A13.1 apresentam baixas taxas de germinação. Esse resultado é um indicativo de que o silenciamento de *14-3-3A* pode estar afetando o processo de germinação das sementes. Por isso, seria interessante testar um maior número de cruzamentos das linhagens de RNAi-A e de cruzamentos recíprocos, possibilitando assim a verificação destes resultados, para que se inicie uma investigação mais aprofundada. Análises preliminares também indicaram a ocorrência de alterações no tamanho em plântulas dos cruzamentos A13.1 x D26.1; A20.2 x D13.1; D13.1 x D13.1 após 37 dias de cultivo, mostrando que elas podem estar se desenvolvendo mais lentamente ou apresentando uma alteração em seu tamanho.

5.3. Considerações Finais

O presente trabalho teve como objetivo estudar as proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum* e os possíveis papéis desempenhados por elas durante o desenvolvimento floral. Além de, colaborar na caracterização molecular da 14-3-3A e da 14-3-3D de tabaco, os resultados aqui obtidos contribuíram para o entendimento de como a interação entre SCI1 e as 14-3-3 ocorre, e permitiram a elaboração de algumas hipóteses a respeito desse assunto. Foi possível determinar que as proteínas 14-3-3A e D encontram-se distribuídas majoritariamente no citoplasma, mas que a 14-3-3A também pode ser encontrada no núcleo celular. Também foi verificado que essas proteínas 14-3-3 são capazes de formar homodímeros e heterodímeros entre si. Adicionalmente, com base nos resultados aqui obtidos e também em análises realizadas pelo doutorando Edward José Strini, este estudo levanta a hipótese de que apenas os homodímeros da 14-3-3D e os heterodímeros 14-3-3A x 14-3-3D são capazes de interagir com SCI1. Tais dímeros estão localizados no citoplasma, mas interagem com SCI1 no núcleo celular, indicando que as 14-3-3s são capazes de entrar no núcleo para desempenhar essa função. Ainda não foi possível determinar como as 14-3-3s modulam a atividade de SCI1, entretanto, sabemos que SCI1 também interage com as 14-3-3s no núcleo celular, mas que quando não está ligado às 14-3-3s apresenta localização restrita ao nucléolo (DePaoli *et al.*, 2011). Outro ponto que pode ser importante para determinar como as 14-3-3s modulam a atividade de SCI1 é a identificação de seus sítios de ligação. Em relação à função das 14-3-3s no desenvolvimento de tabaco, este estudo sugere que as 14-3-3A e D possam apresentar funções no controle do ciclo celular entre outras, assim como em seus ortólogos de *Arabidopsis*. No entanto, para corroborar esta hipótese seria interessante relacionar estas 14-3-3s com outras proteínas conhecidas por atuar no ciclo celular de plantas e, também, aprofundar as análises funcionais por meio da observação de fenótipos das plantas T₁ geradas neste estudo.

6. Conclusões

No presente trabalho foram estudadas as proteínas 14-3-3A e 14-3-3D de *N. tabacum* e o seu papel durante o desenvolvimento floral. A partir dos resultados aqui obtidos, foi possível chegar as seguintes conclusões:

- A proteína 14-3-3A se localiza no citoplasma e no núcleo, enquanto 14-3-3D se distribui no citoplasma;
- Essas 14-3-3s são capazes de formar homodímeros e heterodímeros entre si por duplo-híbrido e BiFC. Os homodímeros de 14-3-3D são formados por meio de uma interação forte, enquanto os heterodímeros e os homodímeros da 14-3-3A apresentam uma interação fraca.
- Os homodímeros de 14-3-3A estão localizados no citoplasma e no núcleo, os homodímeros de 14-3-3D e os heterodímeros formados entre 14-3-3A e 14-3-3D estão localizados somente no citoplasma;
- A proteína 14-3-3A é capaz de interagir com SCI1 *in vivo*;
- É possível que os homodímeros de 14-3-3D e os heterodímeros formados entre 14-3-3A e 14-3-3D interajam com SCI1, mas provavelmente, os homodímeros de 14-3-3A não são capazes de se ligar a tal proteína;
- A interação entre SCI1 e as 14-3-3s ocorre no núcleo celular, fora do nucléolo, diferindo da localização observada para as 14-3-3s e para SCI1 individualmente.
- Existem dois sítios putativos de interação com proteínas 14-3-3s na sequência de SCI1.
- Todas as proteínas consideradas ortólogas as 14-3-3A e D em *Arabidopsis* foram relacionadas ao ciclo celular, sugerindo que o mesmo possa ocorrer em seus correspondentes em tabaco;

- As plantas silenciadas para os genes *14-3-3A* e *14-3-3D*, de maneira independente, não apresentaram fenótipos consistentes. No entanto, algumas plantas transgênicas apresentaram estruturas menores, especialmente as pétalas, sugerindo que estas proteínas podem estar envolvidas no controle do tamanho de órgãos vegetais.

7. Referências Bibliográficas

- Aducci, P., Camoni, L., Marra, M., Visconti, S. (2002) From Cytosol to Organelles: 14-3-3 Proteins as Multifunctional Regulators of Plant Cell. *Iubmb Life*, **53**(1), 49-55.
- Aitken, A. (2011) Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Seminars in cell & developmental biology*, **22**(7), 673-680.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**(5633), 653-657.
- Barrett, S.C. (2013) The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**(1765), 20130913.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., Meyerowitz, E.M. (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, **112**(1), 1-20.
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S, Ohad N. (2004) Detection of protein–protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* **40**, 419–427
- Brachmann, R.K. e Boeke, J.D. (1997) Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**(5), 561-568.
- Braun, P., Aubourg, S., Van Leene, J., De Jaeger, G., Lurin, C. (2013) Plant Protein Interactomes. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 161-187.
- Chaudhri, M., Scarabel, M., Aitken, A. (2003) Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, **300**(3), 679-685.
- Chevalier, D., Morris, E.R., Walker, J.C. (2009) 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 67-91.
- Coblitz, B., Shikano, S., Wu, M., Gabelli, S.B., Cockrell, L.M., Spieker, M., Hanyu, Y., Fu, H., Amzel, L.M., Li, M. (2005) C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(43), 36263-36272.
- Coen, E.S. e Meyerowitz, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353**(6339), 31-37.

- de Boer, A.H., van Kleeff, P.J., Gao, J. (2013) Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma*, **250**(2), 425-440.
- DePaoli, H.C., Brito, M.S., Quiapim, A.C., Teixeira, S.P., Goldman, G.H., Dornelas, M.C., Goldman, M.H.S. (2011) Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. *New Phytologist*, **190**(4), 882-895.
- Dean, C., Jones, J., Favreau, M., Dunsmuir, P., Bedbrook, J. (1988) Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic acids research*, **16**(19), 9267-9283.
- Denison, F.C., Paul, A.-L., Zupanska, A.K., Ferl, R.J. (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in cell & developmental biology*, **22**(7), 720-727.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., De Veylder, L., Novak, B., Schnittger, A. (2010) The regulatory network of cell-cycle progression is fundamentally different in plants versus yeast or metazoans. *Plant Signal Behav*, **5**(12), 1613-1618.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, **5**(1), 113.
- Esau, K. (1987) *Anatomy of seed plants*. New York, NY: Edgar Blucher LTD.
- Fang, G., Bhardwaj, N., Robilotto, R., Gerstein, M.B. (2010) Getting started in gene orthology and functional analysis. *PLoS computational biology*, **6**(3), e1000703.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**(4), 783-791.
- Ferl, R.J., Manak, M.S., Reyes, M.F. (2002) The 14-3-3s. *Genome Biology*, **3**(7), 3010.1-3010.7.
- Ferl, R.J. (2004) 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiologia Plantarum*, **120**(2), 173-178.
- Ferreira, P.B. (2013) Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2, de *Nicotiana tabacum*. Monografia de Conclusão de Curso, Ribeirão Preto, SP. pp.80.
- Finnie, C., Borch, J., Collinge, D.B. (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant molecular biology*, **40**(4), 545-554.

- Fitch, W.M. (1970) Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Biology*, **19**(2), 99-113.
- Fitch, W.M. (2000) Homology: a personal view on some of the problems. *Trends in genetics*, **16**(5), 227-231.
- Friis, E.M., Pedersen, K.R., Crane, P.R. (2006) Cretaceous angiosperm flowers: innovation and evolution in plant reproduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **232**(2), 251-293.
- Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C. (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **40**(1), 617-647.
- Gardino, A.K. e Yaffe, M.B. (2011) 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Seminars in cell & developmental biology*, **22**(7), 688-695.
- Grønlund, A.L., Dickinson, J.R., Kille, P., Harwood, J.L., Herbert, R.J., Francis, D., Rogers, H.J. (2009) Plant WEE1 kinase interacts with a 14-3-3 protein, GF14 omega but a mutation of WEE1 at S485 alters their spatial interaction. *The Open Plant Science Journal*, **3**, 40-48.
- Heijmans, K., Morel, P., Vandenbussche, M. (2012) MADS-box genes and floral development: the dark side. *Journal of Experimental Botany*, **63**(15), 5397-5404.
- Waterhouse, P. M., e Helliwell, C. A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, **4**(1), 29-38.
- Hobbs, S.L., Kpodar, P., DeLong, C.M. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant molecular biology*, **15**(6), 851-864.
- Horiguchi, G. e Tsukaya, H. (2011) Organ size regulation in plants: insights from compensation. *Frontiers in plant science*, **2**, 1-6.
- Irish, V. F. (2010) The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*, **61**, 1014–1028.
- Jahn, T., Fuglsang, A.T., Olsson, A., Brüntrup, I.M., Collinge, D.B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M.G., Larsson, C. (1997) The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H (+)-ATPase. *The Plant Cell Online*, **9**(10), 1805-1814.
- James, P., Halladay, J., Craig, E.A. (1996) Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.

- Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A. (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo-and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *Febs Letters*, **368**(1), 55-58.
- Karasawa, M.M.G. (2009) Diversidade reprodutiva de plantas: uma perspectiva evolutiva e bases genéticas. Editora SBG, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP: pp113
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**(5), 193-195.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., Goldberg, R.B. (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *The Plant Cell*, **2**(12), 1201.
- Konagaya, K.-i., Matsushita, Y., Kasahara, M., Nyunoya, H. (2004) Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology*, **70**(4), 221-231.
- Kristensen, D.M., Wolf, Y.I., Mushegian, A.R., Koonin, E.V. (2011) Computational methods for Gene Orthology inference. *Briefings in bioinformatics*, **12**(5), 379-391.
- Krizek, B.A. (2009) Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**(1), 17-22
- Krizek, B.A. e Fletcher, J.C. (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, **6**(9), 688-698.
- Kuromori, T. and Yamamoto, M. (2000) Members of the *Arabidopsis* 14-3-3 gene family trans-complement two types of defects in fission yeast. *Plant Science*, **158**(1), 155-161.
- Lambeck, I.C., Fischer-Schrader, K., Niks, D., Roeper, J., Chi, J.-C., Hille, R., Schwarz, G. (2012) Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(7), 4562-4571.
- Liang, X., Butterworth, M.B., Peters, K.W., Walker, W.H., Frizzell, R.A. (2008) An obligatory heterodimer of 14-3-3 β and 14-3-3 ϵ is required for aldosterone regulation of the epithelial sodium channel. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(41), 27418-27425.
- Li, W., Yadeta, K.A., Elmore, J.M., Coaker, G. (2013) The *Pseudomonas syringae* effector HopQ1 promotes bacterial virulence and interacts with tomato 14-3-3 proteins in a phosphorylation-dependent manner. *Plant Physiology*, **161**(4), 2062-2074.

- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., Russell, P. (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, **397**(6715), 172-175.
- McGinnis, K.M. (2010) RNAi for functional genomics in plants. *Briefings in functional genomics*, **9**(2), 111-117.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Muslin, A.J. e Xing, H. (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular signalling*, **12**(11), 703-709.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**(6), 889-897.
- Nakasugi, K., Crowhurst, R.N., Bally, J., Wood, C.C., Hellens, R.P., Waterhouse, P.M. (2013) De Novo Transcriptome Sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, **8**(3), e59534.
- Nohzadeh, M.S., Habibi, R.M., Heidari, M., Salekdeh, G.H. (2007) Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **71**(9), 2144-2154.
- Obsil, T. and Obsilova, V. (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions. In *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier: **22**(7), 663-672.
- Obsilova, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., Obsil, T. (2008) 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiological Research*, **57**(3), S11-S21.
- Ouyang, S., Zhu, W., Hamilton, J., Lin, H., Campbell, M., Childs, K., Thibaud-Nissen, F., Malek, R.L., Lee, Y., Zheng, L. (2007) The TIGR rice genome annotation resource: improvements and new features. *Nucleic acids research*, **35**(suppl 1), D883-D887.
- Paul, A.-L., Folta, K.M., Ferl, R.J. (2008) 14-3-3 proteins, red light and photoperiodic flowering. *Plant Signaling Behavior*, **3**, 511-515.
- Paul, A.-L., Sehnke, P.C., Ferl, R.J. (2005) Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* seems to be driven by client interactions. *Molecular biology of the cell*, **16**(4), 1735-1743.
- Peethambaran, B., Chi Li, T., Dzugan, P., Xiang, W., Balsamo, R. (2012) Physiological and Mechanical Role of 14-3-3 Lambda in *Arabidopsis thaliana* during Drought Stress. *Journal of Agricultural Sciences*, **4**(8), 149-163.

- Peng, C.-Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., Piwnica-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**(5331), 1501-1505.
- Pires, N.D. e Dolan, L. (2012) Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **367**(1588), 508-518.
- Potato Genome Sequencing Consortium (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, **475**(7355), 189-195.
- Quiapim, A.C., Brito, M.S., Bernardes, L.A., Malavazi, I., DePaoli, H.C., Molfetta-Machado, J.B., Giuliatti, S., Goldman, G.H., Goldman, M.H.S. (2009) Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. *Plant Physiology*, **149**(3), 1211-1230.
- Raven, P.H. (2007) *Biologia Vegetal*. 7ª Edição, Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
- Roberts, M.R. (2000) Regulatory 14-3-3 protein–protein interactions in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**(5), 400-405.
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C., Sommarin, M. (2001) Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiology*, **127**(1), 142-149.
- Sablowski, R. e Dornelas, M.C. (2013) Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany*, 10.1093/jxb/ert354.
- Saitou, N. e Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, **4**(4), 406-425.
- Sambrook, J., Russel, DW. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York, NY: Cold Spring Harbor.
- Schiessl, K., Muiño, J.M., Sablowski, R. (2014) Arabidopsis JAGGED links floral organ patterning to tissue growth by repressing Kip-related cell cycle inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10.1073/pnas.1320457111.
- Shin, R., Jez, J.M., Basra, A., Zhang, B., Schachtman, D.P. (2011) 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *Febs Letters*, **585**(1), 143-147.
- Smith, A.J., Daut, J., Schwappach, B. (2011) Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. *Physiology*, **26**(3), 181-191.

- Sorrell, D.A., Marchbank, A.M., Chrimes, D.A., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., Francis, D., Grierson, C.S., Halford, N.G. (2003) The Arabidopsis 14-3-3 protein, GF14 ω , binds to the *Schizosaccharomyces pombe* Cdc25 phosphatase and rescues checkpoint defects in the rad24- mutant. *Planta*, **218**(1), 50-57.
- Szopa, J. (2002) Transgenic 14-3-3 isoforms in plants: the metabolite profiling of repressed 14-3-3 protein synthesis in transgenic potato plants. *Biochemical Society Transactions*, **30**(4), 405-410.
- Taiz, L. e Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre, RS: pp.820.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**(10), 2731-2739.
- Taoka, K.-i., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S. (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, **476**(7360), 332-335.
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V., Lipman, D.J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science*, **278**(5338), 631-637.
- Taylor, K.W., Kim, J.-G., Su, X.B., Aakre, C.D., Roden, J.A., Adams, C.M., Mudgett, M.B. (2012) Tomato TFT1 is required for PAMP-triggered immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence. *PLoS pathogens*, **8**(6), e1002768.
- Theißen, G. (2002) Orthology: secret life of genes. *Nature*, **415**(6873), 741-741.
- Tirode, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J., Egly, J.M. (1997) A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(37), 22995-22999.
- Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, **485**(7400), 635-641.
- Wang, W. e Shakes, D.C. (1996) Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *Journal of molecular evolution*, **43**(4), 384-398.

- Weiss, J., Delgado-Benarroch, L., Egea-Cortines, M. (2005) Genetic control of floral size and proportions. *International Journal of Developmental Biology*, **49**(5/6), 513.
- Wilker, E.W., Grant, R.A., Artim, S.C., Yaffe, M.B. (2005) A structural basis for 14-3-3 functional specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(19), 18891-18898.
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S.J. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature*, **376**(6536), 188-191.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**(7), 961-971.
- Yaffe, M.B. (2002) How do 14-3-3 proteins work?—Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *Febs Letters*, **513**(1), 53-57.
- Yang, X., Wang, W., Coleman, M., Orgil, U., Feng, J., Ma, X., Ferl, R., Turner, J.G., Xiao, S. (2009) Arabidopsis 14-3-3 lambda is a positive regulator of RPW8-mediated disease resistance. *The Plant Journal*, **60**(3), 539-550.
- Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundström, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M. (2006) Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(46), 17237-17242.
- Yao, Y., Du, Y., Jiang, L., Liu, J.-Y. (2007) Molecular Analysis and Expression Patterns of the 14-3-3 Gene Family from *Oryza Sativa*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, **40**(3), 349-357.
- Yoshiyama, K.O., Sakaguchi, K., Kimura, S. (2013) DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. *Biology*, **2**(4), 1338-1356.
- Yukawa, M., Tsudzuki, T., Sugiura, M. (2006) The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics*, **275**(4), 367-373.

website: lancs.ac.uk/staff/robertmr/tft_ests.htm

<http://gateway.psb.ugent.be>

Anexo 1 – Alinhamento – Clones D9.4 e H6.1

Anexo 1.1. Alinhamento entre a sequência do clone D9.4 e a sequência 14-3-3A1 depositada no *NCBI* (acesso - AB119466) (ClustalW – www.genome.jp/tools/clustalw/). Códon de iniciação e terminação estão grifados em cinza.

```

D9.4      GGTCTGAATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGTTGGTCCACATTCTCTCAACTTTCTCTTTC
A1        -----CCCCAAAACTGCTCTCTTTCCACATTCTCTCAACTTTCTCTTTC
              * * * *****

D9.4      TAAAACTCTTCCTCTTTTTTCTAGCACACAGACCTTCAATGGCATCGCCGCGCAGGAGAA
A1        TAAAACTCTTCCTCTTTTTTCTAGCACACAGACCTTCAATGGCATCGCCGCGCAGGAGAA
              *****

D9.4      CGTGTACCTGGCGAAGCTTGCTGAGCAAGCCGAACGCTACGAGGAGATGGTAGAGTTCAT
A1        CGTGTACCTGGCGAAGCTTGCTGAGCAAGCCGAACGCTACGAGGAGATGGTAGAGTTCAT
              *****

D9.4      GGAGAAAGTCGTTCGCGCCGGCGACGACGAACCTACCGTCGAGGAACGCAACCTCCTCTC
A1        GGAGAAAGTCGTTCGCGCCGGCGACGACGAACCTACCGTCGAGGAACGCAACCTCCTCTC
              *****

D9.4      CGTCGCGTACAAAAATGTGATCGGAGCGAGGCGAGCGTCTGGCGCATAATCTCATCGAT
A1        CGTCGCGTACAAAAATGTGATCGGAGCGAGGCGAGCGTCTGGCGCATAATCTCATCGAT
              *****

D9.4      CGAGCAGAAAGAAGAGAGTCGCGGTAACGAAGATCACGTGGCCTCCATTAAAACCTACAG
A1        CGAGCAGAAAGAAGAGAGTCGCGGTAACGAAGATCACGTGGCCTCCATTAAAACCTACAG
              *****

D9.4      ATCTAAGATCGAATCTGAATTGACTTCGATCTGCAATGGTATCCTTAAGTTGCTCGATTC
A1        ATCTAAGATCGAATCTGAATTGACTTCGATCTGCAATGGTATCCTTAAGTTGCTCGATTC
              *****

D9.4      AAAACTCATTGGCACCCTGCTACCGGTGACTCTAAGGTTTTCTATTGAAAATGAAGGG
A1        AAAACTCATTGGCACCCTGCTACCGGTGACTCTAAGGTTTTCTATTGAAAATGAAGGG
              *****

D9.4      AGATTATTACAGGTACTTGGCTGAGTTCAAACCGGAGCTGAGAGAAAAGAAGCCGCCGA
A1        AGATTATTACAGGTACTTGGCTGAGTTCAAACCGGAGCTGAGAGAAAAGAAGCCGCCGA
              *****

D9.4      GAATACTCTTTCGGCTTACAAGTCGGCTCAGGATATTGCTAATGTTGAATTAGCCCCCTAC
A1        GAATACTCTTTCGGCTTACAAGTCGGCTCAGGATATTGCTAATGTTGAATTAGCCCCCTAC
              *****

D9.4      ACATCCAATCCGATTGGGGCTAGCTCTCAATTTCTCAGTGTTTTACTATGAGATATTGAA
A1        ACATCCAATCCGATTGGGGCTAGCTCTCAATTTCTCAGTGTTTTACTATGAGATATTGAA
              *****

D9.4      CTCTCCTGACCGTGCTTGTAACTCTGCCAAACAGGCATTTGATGAGGCTATTGCGGAGCT
A1        CTCTCCTGACCGTGCTTGTAACTCTGCCAAACAGGCATTTGATGAGGCTATTGCGGAGCT
              *****

D9.4      TGACACCCTGGGAGAGGAGTCCTACAAGGATAGCACTTTGATTATGCAACTTCTTCGTGA
A1        TGACACCCTGGGAGAGGAGTCCTACAAGGATAGCACTTTGATTATGCAACTTCTTCGTGA
              *****

D9.4      TAACCTCACTTTGTGGACCTCGGATATGCAGGATGATGGAAGTATGAGATCAAAGAACC
A1        TAACCTCACTTTGTGGACCTCGGATATGCAGGATGATGGAAGTATGAGATCAAAGAACC
              *****

D9.4      ATCAAAAGCGGAGGAGCAGCAGTAATGTTGAGTGAAGCCTCTTTGCTTAGGATTGAATCCT

```



```

A1      ATCAAAAGCGGAGGAGCAGCAGTAATGTGAGTGAAGCCTCTTTGCTTAGGATTGAATCCT
*****

D9.4    ATGGCATAACTTTGCTCATTGATCGAAATTTGCTGTTGTGTAGTTCTGAATTCCTGAA
A1      ATGGCATAACTTTGCTCATTGATCGAAATTTGCTGTTGTGTAGTTCTGAATTCCTGAA
*****

D9.4    TTGTAATACCTAAAAGCACTGTTTCTTGCCATTTGTGTTTTTCAGCAAAGATTACTTTTT
A1      TTGTAATACCTAAAAGCACTGTTTCTTGCCATTTGTGTTTTTCAGCAAAGATTACTTTTT
*****

D9.4    CTCTCGGTATTTCCCTTGTATTTGGATGCTCCAGTGAAACTCTCTTATTTCTGCGGAAATG
A1      CTCTCGGTATTTCCCTTGTATTTGGATGCTCCAGTGAAACTCTCTTATTTCTGCGGAAATG
*****

D9.4    AATCTCTGTTTTTACAGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-
A1      AATCTCTGTTTTTACAGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-
*****

```

Anexo 1.2. Alinhamento entre a sequência do clone H6.1 e a sequência 14-3-3D2 depositada no *NCBI* (acesso - AB119472). (ClustalW – www.genome.jp/tools/clustalw/). Códon de iniciação e terminação estão grifados em cinza.

```

H6.1    GGTGGGTCTGAATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGTTGGAACGAAACAAAAAAAAAAAAAA
D1      -----AAAAA
*****

H6.1    AACCTCTCTCT-AAAAGCACCAAGAGAAAAAATAAAAAATCTCCGGCGAATCTCCGAC
D1      AACCTCTCTCTGAAAAACACCAAGAAAAAAA-----AAACTCCGGCGAATCTCCGAC
*****

H6.1    GATGGCCGTACCGGAAAATTTAACCAGAGAGCAGTGCCTATACTTAGCAAAGCTCGCCGA
D1      GATGGCCGTGCGCGAAAATTTAACCAGAGAGCAGTGCCTATACTTAGCAAAGCTCGCCGA
*****

H6.1    GCAAGCCGAGCGTTACGAGGAGATGGTAAAATTCATGGACCGCCTCGTAGCCGTCTCGGG
D1      GCAAGCCGAGCGTTACGAGGAGATGGTAAAATTCATGGACCGCCTCGTAGTCGTCTCCGG
*****

H6.1    TTCCTCTGAACCTAAGTGTAGAGGAGCGAAATCTCCTCTCGGTAGCGTATAAGAACGTAAT
D1      TTCCTCTGAACCTAAGCGTTGAAGAGCGAAACCTCCTCTCAGTAGCGTATAAGAACGTAAT
*****

H6.1    CGGTTCACTTCGAGCCGCGTGGAGGATAGTATCGTCAATTGAGCAAAGGAAGAAGGGAG
D1      CGGTTCACTTCGAGCCGCGTGGAGGATAGTATCGTCAATTGAGCAAAGGAAGAAGGGAG
*****

H6.1    GAAGAACGACGAACACGTGGTTTTAGTGAAGGATTATAGATCTAAGGTTGAATCTGAGCT
D1      GAAGAACGAGGAACACGTGGTTCTAGTGAAGGATTATAGATCTAAGGTTGAATCTGAGCT
*****

H6.1    TAGTGATGTTTGTGCTGGAATTTTGAAGATTTTGGATCAGTATTTGATTCCTTCAGCTTC
D1      TAGTGATGTTTGTGCTGGAATTTTGAAGATTTTGGATCAATATTTGATTCCTTCAGCTTC
*****

H6.1    TGCTGGTGAGTCGAAGGTGTTTTACTTGAAGATGAAGGGAGATTATTATCGTTATTTGGC
D1      GGTGGTGAATCGAAGGTGTTTTACTTGAAGATGAAGGGAGATTATTATCGTTATTTGGC
*****

H6.1    TGAATTTAAAGTTGGTAATGAACGTAAGGAAGCTGCTGAGGATACTATGCTTGCCTACAA
D1      TGAATTTAAAGTTGGTAATGAACGTAAGGAAGCTGCTGAGGATACTATGCTTGCCTACAA

```

```

*****
H6.1      AGCTGCTCAGGACATCGCCCTTGCTGAGCTTGCCCCAACACATCCTATACGACTTGGGCT
D1        AGCTGCTCAGGACATCGCCCTTGCTGAGCTTGCCCCAACACATCCTATACGACTTGGGCT
*****

H6.1      AGCTCTCAACTATTTCAGTATTCTACTATGAGATTCTGAATGCATCAGAAAAAGTATGCAG
D1        AGCTCTGAACATATTTCAGTATTCTACTATGAGATTCTGAATGCATCAGAAAAAGCATGCAG
*****

H6.1      CATGGCTAAACAGGCCTTTGAGGAAGCTATTGCCGAACCTGGACACTTTGGGGGAGGAATC
D1        CATGGCTAAACAGGCCTTTGAGGAAGCTATTGCCGAACCTGGACACTTTGGGGGAGGAATC
*****

H6.1      CTATAAAGATAGCACCCCTTATCATGCAGTTATTGAGGGACAATCTCACTCTCTGGACTTC
D1        CTATAAGGATAGCACCCCTTATCATGCAGTTATTGAGGGACAATCTCACCCCTCTGGACTTC
*****

H6.1      CGATATGCAGGAGCAGATGGACGAGGCTTGACATTAAACTGCTCCTTCGGGGGGTGGGCT
D1        CGATATGCAGGAGCAGATGGACGAGGCTTGACATTAAACTGCTCCTCCAGGAGGTGGGC-
*****

H6.1      CAAATTTACACAGCAACTCTGTAATCTACGTATGCAACTGATAGCTTTTGTAAATTTAT
D1        --AATGTCACACAGCAACTCTGTAATCTACATATGCAACTGATAACTTTTGTAAATTTAT
      ***

H6.1      TTCTCATGCCTACTTTGATAATTATCTTATTCAAACCTCTGGTTTGAACTTAATATTTT
D1        TTCTCATGCCTACTTTGATAATTATCTTATTCAAACCTCTGGTTTGAACTTAATGCTTTT
*****

H6.1      AATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
D1        AGTTTATTTCTCGAAAAAAAAA-----
      *      *

```

Anexo 1.3. Alinhamento entre a sequência do clone H6.1 e a sequência 14-3-3D1 depositada no NCBI (acesso - AB119471). (ClustalW – www.genome.jp/tools/clustalw/). Códon de iniciação e terminação estão grifados em cinza.

```

H6.1      GGTGGGTCGAATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGTTGGAACGAAACAAAAAAAAAAAA
D1        -----

H6.1      AACCTCTCTCTAAAAGCACCAAGAGAAAAAATAAAAAA-----TCTCCGGCGAATCTC
D1        -----CTCTAAAAACACCAAGAGAAAAAGGCAAAAAAACAATTCTCCGGCCAATATC
      *****

H6.1      CGACGATGGCCGTACCGGAAAATTTAACCAGAGAGCAGTGCCTATACTTAGCAAAGCTCG
D1        CGACGATGGCCGTACCGGAAAATTTAACCAGAGAGCAGTGCCTATACTTAGCAAAGCTCG
      *****

H6.1      CCGAGCAAGCCGAGCGTTACGAGGAGATGGTAAAATTCATGGACCGCCTCGTAGCCGTCT
D1        CCGAGCAAGCCGAGCGTTACGAGGAGATGGTAAAATTCATGGACCGCCTCGTAGCCGTCT
      *****

H6.1      CGGGTTCCTCTGAACTAACTGTAGAGGAGCGAAATCTCCTCTCGGTAGCGTATAAGAACG
D1        CGGCTTCCTCAGAGCTAACCGTAGAGGAGCGAAACCTCCTCTCGGTGGCATATAAGAACG
      ***

H6.1      TAATCGGTTCACTTCGAGCCGCGTGGAGGATAGTATCGTCAATTGAGCAAAAGGAAGAAG
D1        TAATCGGCTCACTTCGAGCCGCGTGGAGGATAGTTTCGTCAATTGAGCAAAAGGAAGAAG
      *****

```

```

H6.1      GGAGGAAGAACGACGAACACGTGGTTTTAGTGAAGGATTATAGATCTAAGGTTGAATCTG
D1         GTAGGAAGAACGAGGAACACGTGGTTCTAGTGAAGGATTATAGATCTAAGGTTGAATCTG
          * *****
H6.1      AGCTTAGTGATGTTTGTGCTGGAATTTTGAAGATTTTGGATCAGTATTTGATTCCTTCAG
D1         AGCTTAGTGATGTTTGTGCTGGAATTTTGAAGATTTTGGATCAGTATTTGATTCCTTCG
          ***** *
H6.1      CTTCTGCTGGTGAGTCAAGGTGTTTACTTGAAGATGAAGGGAGATTATTATCGTTATT
D1         CTGCTGCTGGCGAGTCAAAGGTGTTTACTTGAAGATGAAGGGAGATTATTATCGTTATT
          ** *****
H6.1      TGGCTGAATTTAAAGTTGGTAATGAACGTAAGGAAGCTGCTGAGGATACTATGCTTGCCT
D1         TGGCTGAATTTAAAGTTGGTAATGAACGTAAGGAGGCTGCTGAGGACACTATGCTTGCCT
          *****
H6.1      ACAAAGCTGCTCAGGACATCGCCCTTGCTGAGCTTGCCCCAACACATCCTATACGACTTG
D1         ACAAAGCTGCTCAGGACATCGCCCTTGCTGAGCTTGCCCCAACACATCCTATACGACTTG
          *****
H6.1      GGCTAGCTCTCAACTATTCAGTATTCTACTATGAGATTCTGAATGCATCAGAAAAAGTAT
D1         GGCTAGCTCTCAACTATTCAGTATTCTACTATGAGATTCTGAATGCATCAGAAAAAGCAT
          ***** **
H6.1      GCAGCATGGCTAAACAGGCCTTTGAGGAAGCTATTGCCGAAGCTGGACACTTTGGGGGAGG
D1         GCAGCATGGCTAAACAGGCCTTTGAGGAAGCTATTGCCGAAGCTGGACACTTTGGGGGAAG
          ***** *
H6.1      AATCCTATAAAGATAGCACCTTATCATGCAGTTATTGAGGGACAATCTCACTCTCTGGA
D1         AATCCTACAAGGATAGCACCTTATCATGCAGTTATTGAGGGACAATCTCACTCTCTGGA
          ***** **
H6.1      CTTCCGATATGCAGGAGCAGATGGACGAGGCTTGACATTAAA-----CTGCTCCTTCG
D1         CTTCCGATATGCAGGAGCAGATGGACGAGGCTTGACAAAGAAAGTAGAACTGCTCGTCTA
          **** ***** ***
H6.1      GGGGTGGGCTCAAATTTACACAGCAACTCTGTAATCTACGTATGCAACTGATAGCTTT
D1         GGAGGTGACCTCAAATGTACACAGCAACTCTGTAATCTACATATGTGACTGATAACTTT
          ** **** *****
H6.1      TGTAATTTTATTTCTCATGCCTACTTTGATAATTATCTTATTCAAACCTCTGGTTTGAAC
D1         TGTAATTTTATTTCTCATGCCTACTTTGATAATTATCTTATTCAAACCTCTGGTTTGAAC
          *****
H6.1      TTAATATTTTAAATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
D1         TTAATGTTTCAATTTAAAAAAAAA-----
          *****

```

Anexo 1.4. Alinhamento entre a sequência de aminoácidos produzida pelo clone H6.1, e as proteínas 14-3-3 D1 e D2 depositadas no *NCBI* (acesso - BAD12173 e BAD12174). (ClustalW – www.genome.jp/tools/clustalw/).

```

D1      MAVPENLTREQCLYLAKLAEQAERYEEMVKFMDRLVAVSASSELTV EERNLLSVAYKNVI
D2      MAVPENLTREQCLYLAKLAEQAERYEEMVKFMDRLVAVSGSSELTV EERNLLSVAYKNVI
H6.1    MAVPENLTREQCLYLAKLAEQAERYEEMVKFMDRLVAVSGSSELTV EERNLLSVAYKNVI
          *****
D1      GSLRAAWRIVSSIEQKEEGRKNEEHVVLVKDYRSKVESELSDVCAGILKILDQYLIPSA
D2      GSLRAAWRIVSSIEQKEEGRKNEEHVVLVKDYRSKVESELSDVCAGILKILDQYLIPSA
H6.1    GSLRAAWRIVSSIEQKEEGRKNEEHVVLVKDYRSKVESELSDVCAGILKILDQYLIPSA
          *****
D1      AGESKV FYLKMKG DYRYLA EFVKV GNERKEA EDTMLAYKAAQDIALAELAPTHPIRLGL

```

D2	AGESKVFYFKMKGDYYRYLAEFKVGNERKEAAEDTMLAYKAAQDIALAELAPTHPIRLGL
H6.1	AGESKVFYFKMKGDYYRYLAEFKVGNERKEAAEDTMLAYKAAQDIALAELAPTHPIRLGL *****
D1	ALNYSVFYYEILNASEKACSMKQAFEEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTS
D2	ALNYSVFYYEILNASEKACSMKQAFEEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTS
H6.1	ALNYSVFYYEILNASEKVCMAKQAFEEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTS *****.*****
D1	DMQEQMDEA
D2	DMQEQMDEA
H6.1	DMQEQMDEA *****

Anexo 2 – Vetores utilizados

Anexo 2.1. Mapa do vetor pK7FWG2 para expressão de proteína recombinante em fusão C-terminal à GFP em células vegetais. O vetor possui as sequências LB e RB (*Left Border* e *Right Border*, respectivamente), que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A. tumefaciens* contendo tal vetor. O vetor confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias e à canamicina (Kan) para seleção em células vegetais. Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene *ccdB* (que inibe o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*). Após reação LR, o gene *ccdB* é substituído pelo fragmento de interesse, que será expresso sob controle do promotor 35S e fusionado a proteína GFP. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Anexo 2.2. Mapa do vetor pK7RWG2 para expressão de proteína recombinante em fusão C-terminal à RFP em células vegetais. O vetor possui as sequências LB e RB, que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A.tumefasciens* contendo tal vetor. Confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias e à canamicina (Kan) para seleção em células vegetais. Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene *ccdB*, que é substituído pelo fragmento de interesse após reação LR. A proteína recombinante é expressa sob controle do promotor 35S e fusionada a proteína RFP. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Anexo 2.3. Mapa do vetor pK7M34GW utilizado em LR triplas. Este vetor também possui as sequências LB e RB, que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A.tumefaciens* contendo tal vetor. Confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias e à canamicina (Kan) para seleção em células vegetais. Os sítios de recombinação flanqueiam o gene *ccdB*, que é substituído pelos fragmentos de interesse após reação LR. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Anexo 2.4. Mapa do vetor pH7M34GW, utilizado LR triplas. O vetor possui as sequências LB e RB, que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A.tumefaciens*. O vetor confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/SpR) para seleção em bactérias e a para higromicina (Hyg) para seleção em células vegetais. Os sítios de recombinação flanqueiam o gene *ccdB*, que é substituído pelos fragmentos de interesse após reação LR. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Anexo 2.5. Mapa do vetor pDEST32 (*Invitrogen*) utilizado para expressão em leveduras. A proteína recombinante é expressa em fusão N-terminal ao domínio BD do fator de transcrição Gal4, sob controle do promotor constitutivo P_{ADH1} . O vetor confere resistência à gentamicina em células bacterianas e em leveduras, codifica proteína da via de biossíntese da Leucina (LEU2). Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene *ccdB* e o gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*).

Anexo 2.6. Mapa do vetor pDEST22 (*Invitrogen*) utilizado para expressão em leveduras. A proteína recombinante é expressa em fusão N-terminal ao domínio AD do fator de transcrição Gal4, sob controle do promotor constitutivo P_{ADH1} . O vetor confere resistência à ampicilina em células bacterianas e em leveduras, codifica proteína da via de biossíntese do Triptofano (TRP1). Os sítios attR1 e attR2 flanqueiam o gene *ccdB* e o gene de resistência ao cloranfenicol (*CmR*).

Anexo 2.7. Mapa do vetor pK7GWIWG2 (I) para expressão de *hpRNA* em células vegetais. O vetor possui as sequências LB e RB, que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A.tumefaciens*. Apresenta um íntron entre duas sequências de recombinação, as quais estão dispostas de maneira invertida entre si, permitindo a expressão de um *hpRNA*. A expressão está sob controle do promotor 35S. Confere resistência à canamicina (Kan) em células vegetais e resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sp/SmR) em células bacterianas. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Anexo 2.8. Mapa do vetor pH7GWIWG2 (II) para expressão de *hpRNA*. O vetor possui as sequências LB e RB, que delimitam a sequência que é transferida para o genoma de plantas durante infecção com *A.tumefaciens*. O vetor apresenta um íntron e a sequência que confere resistência a cloranfenicol (CmR) entre duas sequências de recombinação, as quais estão dispostas de maneira invertida entre si, permitindo a produção de um *hpRNA*. A expressão é controlada pelo promotor 35S. Confere resistência à higromicina (Hyg) em células vegetais e resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sp/SmR) em células bacterianas. Fonte: <http://gateway.psb.ugent.be/>.

Anexo 3 – Sequências selecionadas para o silenciamento gênico

Anexo 3.1. Sequência de cDNA da 14-3-3A, mostrando a região utilizada para a construção de silenciamento gênico. Códon de iniciação (ATG) e códon de terminação (TAA) aparecem com um sublinhado. A sequência grifada em cinza foi utilizada para o silenciamento da 14-3-3A, a região dos *primers* utilizados para sua amplificação aparece com sublinhado duplo.

```
GGTCGAATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGTTGGTCCACATTCTCTCAACTTTCTCTTTCTAAACTCTTCCTCT
TTTTCTAGCACACAGACCTTCAATGGCCATCGCCGCGCGAGGAGAACGTGTACCTGGCGAAGCTTGCTGAGCAAGC
CGAACGCTACGAGGAGATGGTAGAGTTCATGGAGAAAGTCGTGCGCGCCGGCGACGACGAACCTACCGTCGAGGA
ACGCAACCTCCTCTCCGTCGCGTACAAAAATGTGATCGGAGCGAGGCGAGCGTCGTGGCGCATAATCTCATCGAT
CGAGCAGAAAGAAGAGAGTTCGCGGTAAACGAAGATCACGTGGCCTCCATTTAAACCTACAGATCTAAGATCGAATC
TGAATTGACTTCGATCTGCAATGGTATCCTTAAAGTTGCTCGATTCAAACCTCATTTGGCACCGCTGCTACCGGTGA
CTCTAAGGTTTTCTATTTGAAAAATGAAGGGAGATTATTACAGGTACTTGGCTGAGTTCAAACCGGAGCTGAGAG
AAAAGAAGCCGCCGAGAATACTCTTTTCGGCTTACAAGTCGGCTCAGGATATTGCTAATGTgAaTTAGCCCCCTAC
ACATCCAATCCGATTGGGGCTAGCTCTCAATTTCTCAGTGTTTTACTATGAGATATTGAACCTCTCCTGACCGTG
TTGTAATCTCGCCAAACAGGCATTTGATGAGGCTATTGCGGAGCTTGACACCCTGGGAGAGGAGTCTTACAAGGA
TAGCACTTTGATTATGCAACTTCTTCGTGATAACCTCACTTTGTGGACCTCGGATATGCAGGATGATGGAACCTGA
TGAGATCAAAGAACCATCAAAAAGCGAGGAGCAGCAGTAATGTGAGTGAAGCCTCTTTGCTTAGGATTGAATCCT
ATGGCATAACTTTGCTCATTGATCGAAATTTGCTGTTTGTGTAGTTCTGAATTCCTGAATTGTAATACCTAAAA
GCACTGTTTCTTGCCATTTGTTGTTTTTCAGCAAAGATTACTTTTTCTCTCGGTATTTCCCTTGATTTGGATGCT
CCAGTGAACTCTCTTATTTTCGTGGAAATGAATCTTGTGTTTTACAGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Anexo 3.2. Sequência de cDNA da 14-3-3D, mostrando a região utilizada para a construção de silenciamento gênico. Códon de iniciação (ATG) e códon de terminação (TGA) aparecem com sublinhado simples. A sequência em grifada em cinza foi utilizada para o silenciamento da 14-3-3D, a região dos *primers* utilizados para amplificação estão com sublinhado duplo.

```
GGTGGGTGGAATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGTTGGAACGAAACAAAAAAAAAAAAAAAAACCTCTCTCTAAAA
GCACCAAGAGAAAAAATAAAAAATCTCCGGCGAATCTCCGACGATGGCCGTACCGGAAAATTTAACAGAGAG
CAGTGCCCTATACTTAGCAAAGCTCGCCGAGCAAGCCGAGCGTTACGAGGAGATGGTAAAATTCATGGACCGCTC
GTAGCCGTCTCGGGTTCTCTGAACTAACTGTAGAGGAGCGAAATCTCCTCTCGGTAGCGTATAAGAACGTAATC
GGTTCACCTTCGAGCCGCGTGGAGGATAGTATCGTCAATTGAGCAAAAGGAAGAAGGGAGGAAGAACGACGAACAC
GTGGTTTTAGTGAAGGATTATAGATCTAAGGTTGAATCTGAGCTTAGTGATGTTTGTGCTGGAATTTTGAAGATT
TTGGATCAGTATTTGATTCCCTTCAGCTTCTGCTGGTGAGTCAAGGTGTTTTTACTTGAAGATGAAGGGAGATTAT
TATCGTTATTTGGCTGAATTTAAAGTTGGTAATGAACGTAAGGAAGCTGCTGAGGATACTATGCTTGCCCTACAAA
GCTGCTCAGGACATCGCCCTTGCTGAGCTTGCCCCAACACATCCTATACGACTTGGGCTAGCTCTCAACTATTCA
GTATTCTACTATGAGATTCTGAATGCATCAGAAAAAGTATGCAGCATGGCTAAACAGGCCTTTGAGGAAGCTATT
GCCGAACCTGGACACTTTGGGGGAGGAATCCTATAAAGATAGCACCCTTATCATGCAGTTATTGAGGGACAATCTC
ACTCTCTGGACTTCCGATATGCAGGAGCAGATGGACGAGGCTTGAATTTAACTGCTCCTTCGGGGGGTGGGCTC
AAATTTACACAGCAACTCTGTAATCTACGTATGCAACTGATAGCTTTTGTAAATTTTATTTCTCATGCCTACTTT
GATAATTATCTTATTCAAACCTCTGGTTTGAACTTAATATTTTTTAATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ACC
```

Anexo 4 – Topologia inferida por Máxima Verossimilhança

Anexo 4.1. Topologia inferida por máxima verossimilhança mostrando as relações evolutivas entre proteínas 14-3-3 de *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum tuberosum* (St), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Valores de *Bootstrap* são apresentados em cada nó. O grupo colorido de verde, reúne possíveis ortólogos da proteína 14-3-3A de tabaco. O grupo colorido de roxo reúne possíveis ortólogos da proteína 14-3-3D de tabaco.

Anexo 4.2. Topologia inferida por máxima verossimilhança, detalhe do grupo que reúne os possíveis ortólogos da proteína 14-3-3A de tabaco: St-20R, SI-TFT5, Nb-Nbv3K665802322, At-GRF2, At-GRF1, At-GRF4 e Os-GF14A. É possível identificar a sequência Nt-TC122980 como provável homeólogo da 14-3-3A. Siglas: *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum tuberosum* (St), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Valores de *Bootstrap* são apresentados em cada nó.

Anexo 4.3. Topologia inferida por máxima verossimilhança, detalhe do grupo que reúne os possíveis ortólogos da proteína 14-3-3D de tabaco: Nb-Nbv3K585727603, SI-TFT1, St-35G, At-GRF6 e At-GRF8. Siglas: *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum tuberosum* (St), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Valores de *Bootstrap* são apresentados em cada nó.

Anexo 5 – Integridade de RNA

Anexo 5.1. Eletroforese em gel de agarose 1% com amostras de RNA de plantas transgênicas RNAi-A. O TBE utilizado foi preparado com H₂O DEPC e adicionado de 1M/mL de isotiociano de guanidina. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio.

Anexo 5.2. RNA de plantas transgênicas RNAi-D em gel de agarose 1%. O TBE utilizado foi preparado com H₂O DEPC e adicionado de 1M/mL de isotiociano de guanidina. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio.