

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JONATA ALEX RIBEIRO CHRISTINO

Estudo do envolvimento de flavonóides na sinalização induzida por luz em raízes de  
*Arabidopsis thaliana*

Porto Alegre

2019

**JONATA ALEX RIBEIRO CHRISTINO**

Estudo do envolvimento de flavonóides na sinalização induzida por luz em raízes de  
*Arabidopsis thaliana*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como parte dos requisitos necessários para a  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin  
Coorientadora: Ma. Yohanna Evelyn Miotto

Porto Alegre

2019

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao professor Felipe Maraschin por toda paciência, pelos conselhos, pelas conversas, pela inspiração e principalmente por ter sempre mantido as portas abertas para mim proporcionando a oportunidade de trabalhar nesse projeto no qual pude expandir meus conhecimentos. Sou grato pela tua orientação atenta, sempre disposto a ajudar. Com certeza minha experiência acadêmica, acumulada durante esses anos, foi melhorada imensamente devido à tua supervisão.

Quero agradecer à minha coorientadora, Yohanna, não só por ter me acompanhado desde o início do projeto e contribuído impecavelmente para o meu aprendizado, mas também por ser sempre tão gentil e atenciosa comigo, tu és uma grande amiga. Te agradeço por ter me adotado, confiado em mim e me ajudado a concluir esse trabalho do qual eu me orgulho muito.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de fisiologia vegetal pela amizade, por terem me acolhido e dado um lugar no grupo, vocês ajudaram a me sentir conectado à algum lugar de novo.

À minha família agradeço aos meus pais e minha avó pelo incentivo, desde pequeno, aos estudos, pelo carinho, pelos sacrifícios que fizeram e especialmente por terem me criado tão inquieto, não fosse por tudo isso, eu não teria tido tantas oportunidades durante o meu caminho. Quero agradecer também a minha namorada pelo companheirismo e pelo carinho interminável que tens comigo, obrigado por sempre torcer pelo meu sucesso, me incentivar e, principalmente, por cuidar de mim enquanto eu escrevia.

Agradeço também os meus amigos do curso, o time dos copeiros: Daniel, Rodolfo, Thomaz, Magnus e Gutierrez pela parceria, pelas conversas e por toda diversão que tivemos durante a graduação. Especialmente o Daniel, o Rodolfo e o Thomaz, vocês se tornaram amigos indispensáveis para mim.

Ao professor Arthur Germano Fett-Neto, muito obrigado por ser tão empolgado pela ciência e transmitir isso a todos ao seu redor, é muito bom poder ter contato com alguém assim. Esse entusiasmo com certeza me contagiou e sou grato por partilhar disso também.

## Resumo

Luz é um fator importante no controle do desenvolvimento vegetal. O efeito da luz sobre o crescimento da planta pode ser observado pelos resultados do desenvolvimento fotomorfogênico ou do desenvolvimento escotomorfogênico. Trabalhos anteriores já identificaram diversos componentes sinalizadores dependentes de luz em *Arabidopsis thaliana* envolvidos na regulação do desenvolvimento vegetal, como sacarose, auxina, e o fator de transcrição HY5. O fator de transcrição bZIP HY5 é considerado um regulador central dos genes envolvidos na fotomorfogênese e um indutor direto da rota metabólica de flavonóides, cuja produção e acúmulo está diretamente relacionada à presença de luz. Parte dos genes que codificam enzimas da via de biossíntese dos flavonóides é induzida diretamente por HY5. Plântulas mutantes perda de função para a enzima F3H (Flavanona 3-hidroxilase, *tt6-3*) apresentam um fenótipo alterado no desenvolvimento das raízes, com um encurtamento da raiz primária e um aumento no número de raízes laterais, fenótipo que também é observado no mutante *hy5*. Dessa forma, é possível que o fenótipo observado no mutante *hy5* seja o resultado da sua deficiência de induzir a síntese de flavonóides. Portanto, a fim de elucidar se a formação de raízes laterais no mutante *hy5* é dependente de flavonóides, o objetivo deste trabalho é expressar constitutivamente *AtHY5* em um mutante de perda de função para o gene codificador da enzima F3H. Nesse trabalho, a sequência codificadora completa do gene *AtHY5* foi clonada no vetor binário pH7WG2 para expressão sob controle do promotor constitutivo 35S CaMV em plantas de *Arabidopsis*. Diferentes genótipos (*hy5* e *tt6*) foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens*. Neste trabalho foram obtidas 6 plantas *hy5* e 7 plantas *tt6-3* transformadas com a construção 35S::*HY5*. A avaliação dos níveis de expressão de *HY5* nas plantas T1 através de RT-qPCR, identificou a superexpressão de *HY5* em algumas linhagens. O material gerado neste trabalho irá auxiliar na compreensão do papel dos flavonóides como participantes na sinalização fotomorfogênica em raízes dependente de *HY5*.

Palavras-chave: *HY5*, desenvolvimento de raiz, raiz lateral, auxina, transparent testa

## Abstract

Light is a key factor controlling plant development. The effect of light over plant growth is results in the photomorphogenic or skotomorphogenic growth in which seedlings display a de-etiolated or etiolated phenotype, respectively. Previous works on *Arabidopsis thaliana* identified various potential light signaling components involved in plant development regulation, such as sucrose and auxin. The transcription factor bZIP HY5, is a major regulator of photomorphogenic genes and a direct activator of the flavonoid pathway, whose synthesis and accumulation are directly related to light presence. Most of the genes in the flavonoid biosynthetic pathway are specifically induced by HY5. Loss of function mutant for F3H (Flavanone 3-hydroxylase, *tt6-1*) presents an altered root development, with a shorter main root and more lateral root formation, a phenotype that is also observed in *hy5* mutants. This suggests a role for flavonoids inducing primary root growth, as well as suppressing lateral root formation. Thus, it is possible that the phenotype observed in *hy5* mutants is a result of their inability to induce the biosynthesis of flavonoids. Therefore, in order to elucidate if the formation of lateral roots in the *hy5* mutant is dependent of flavonoids we aim to overexpress HY5 in the *tt6* background, which lacks a key enzyme of the flavonoid pathway. In this work, the complete coding sequence of AtHY5 was cloned into the binary vector pH7WG2 for expression under the control of the constitutive promoter 35S CaMV in *Arabidopsis* plants. We obtained 6 transgenic 35::HY5 plants in the *hy5* and 7 plants in the *tt6* background. The expression levels of HY5 were evaluated through RT-qPCR and were identified some good overexpressors. The materials here obtained will help to elucidate the role of flavonoids as signaling compounds in the root photomorphogenic growth dependent on HY5.

Keywords: HY5, root growth, lateral root, auxin, transparent testa

## Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura e rota de biossíntese de flavonóides. 6  
Figura 2: Esquema representativo do gene HY5. 9  
Figura 3: Amplificação da sequência codificadora do gene AtHY5 e seleção dos clones de pENTR/D-TOPO - AtHY5. 12  
Figura 4: Mapa do vetor binário pH7WG2-AtHY5 13  
Figura 5: Seleção das colônias transformadas com o plasmídeo pH7WG2 - AtHY5. 14  
Figura 6: Alinhamento da sequência codificadora de HY5 e sequenciamento do vetor de expressão pH7WG2-AtHY5. 15  
Figura 7: Seleção das colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com pH7WG2-AtHY5.PCR para verificar a presença do vetor de expressão. 16  
Figura 8: Confirmação por PCR do estado transgênico das plantas transformadas com *pH7WG2-AtHY5*. 17  
Figura 9: Expressão relativa de *AtHY5* em diferentes linhagens transformadas dos mutantes *hy5* e *tt6*. 18  
Figura 10. Modelo hipotético do papel de HY5 e F3H na regulação do desenvolvimento do sistema radicular em *Arabidopsis thaliana*. 21

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Percepção de luz	1
1.2 Desenvolvimento de raízes em resposta a luz	2
1.3 O fator de transcrição HY5	2
1.4 Flavonóides	4
<b>2 OBJETIVOS</b>	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	7
3.1 Material vegetal e condições de crescimento	8
3.2 Extração de ácidos nucléicos e síntese de cDNA	8
3.3 Obtenção da sequência de HY5	8
3.4 Clonagem de AtHY5 no sistema Gateway	9
3.5 Transformação e seleção de <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
3.6 Avaliação da superexpressão HY5	10
<b>4 RESULTADOS</b>	12
4.1 Amplificação da sequência codificante de HY5	12
4.2 Obtenção do plasmídeo binário pH7WG2-AtHY5	13
4.3 Transformação genética de <i>Arabidopsis thaliana</i> com o vetor pH7WG2-AtHY5	16
4.4 Avaliação dos níveis de expressão de HY5 nas linhagens transformadas	17
<b>5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS</b>	18
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	22

# 1 INTRODUÇÃO

## *1.1 Percepção de luz*

A luz é um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal. É um sinal que não só serve como fonte de energia, mas também funciona como um indicativo de tempo e espaço. A planta consegue deduzir se existe algo ao seu redor em função da qualidade, direção, intensidade e da duração de luz que recebe. Juntamente com a temperatura, a luz pode definir o ciclo circadiano, o que é crítico para ocorrência de processos fisiológicos no tempo certo, e também é um indicativo do período do dia e das diferentes estações do ano atuando como um fator ambiental chave nos processos de desenvolvimento, crescimento e reprodução nos vegetais (Sanchez-Retuerta, 2018). A habilidade das plantas em monitorar e se ajustar às condições luminosas é possível devido ao desenvolvimento de um sistema complexo de fotorreceptores durante sua evolução, que são responsáveis por perceber sinais luminosos e convertê-los em respostas fisiológicas nas células (Leivar e Monte, 2014). Devido a isso, as plantas passaram a ter capacidade de modular diversas vias de sinalização envolvendo hormônios específicos, visando otimizar o seu crescimento e desenvolvimento (Quail, 2002; Lau e Deng, 2012).

A percepção de luz pelos fotorreceptores define duas estratégias de desenvolvimento que a planta pode adotar. No escuro, a plântula investe suas reservas energéticas no alongamento do hipocótilo, em detrimento do desenvolvimento dos cotilédones e da raiz, dando origem a plântulas estioladas, com os cotilédones fechados na estrutura de gancho (Xu, et al. 2015). O alongamento excessivo do hipocótilo é uma forma da plântula de maximizar o processo de busca por luz. A presença do gancho apical facilita a superação de obstáculos que possam estar impedindo o contato com a luz, protegendo o meristema apical caulinar. Por outro lado, a exposição à luz desencadeia a fotomorfogênese que consiste na expansão dos cotilédones e alongamento radicular, inibição do alongamento do hipocótilo, produção e acúmulo de clorofila que permitem a realização de fotossíntese (Josse e Halliday, 2008).



### ***1.2 Desenvolvimento de raízes em resposta a luz***

Em decorrência da grande influência da luz sob o crescimento e desenvolvimento vegetal, ocorrem grandes mudanças na expressão gênica. Mais especificamente, sabe-se que durante a fotomorfogênese as modificações no padrão de expressão podem envolver aproximadamente 35% do genoma de *Arabidopsis* (Gangappa e Botto, 2016). Além disso, uma grande parte desses genes codifica fatores de transcrição envolvidos em cascatas de sinalização dependentes de luz, como os da família bZIP, que se ligam em elementos responsivos a luz para regular expressão gênica (Lee, et al. 2007).

Enquanto que em animais a transmissão de informação ocorre pelo sistema nervoso, em plantas, os tecidos vasculares, juntamente com os compostos transportados por eles desempenham esse papel de comunicação nos vegetais (Notaguchi e Okamoto, 2015). A percepção da luz na parte aérea é capaz de estimular o crescimento das raízes abaixo do solo, na escuridão (Morelli e Ruberti, 2002), sugerindo a existência de um sistema complexo de sinalização entre parte aérea e raízes. Algumas substâncias já foram identificadas como possíveis sinais móveis responsáveis pelo diálogo entre as diferentes partes da planta, por exemplo sacarose, auxina e fatores de transcrição (Ko e Helariutta, et al. 2017).

### ***1.3 O fator de transcrição HY5***

A expressão diferencial de genes promove respostas biológicas e específicas à trajetória de desenvolvimento dos organismos, esses processos são regulados por uma grande variedade de fatores de transcrição. Muitos fatores envolvidos na transição de desenvolvimento no escuro para fotomorfogênese já foram identificados em *Arabidopsis* (Chen e Rajewsky, 2007), dentre eles, alguns fatores de transcrição chave como ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), que possui um papel central na regulação do desenvolvimento dependente de luz (Oyama, 1997).

HY5 é um membro da família bZIP de fatores de transcrição que atua promovendo a fotomorfogênese, mediando processos como proliferação celular, assimilação de nutrientes, alongamento celular e desenvolvimento do cloroplasto (Koornneef et al., 1980; Oyama et al., 1997; Ang et al., 1998; Jing et al., 2013). Além desse papel, HY5 ainda participa de outras rotas de sinalização como fitormônios, defesa e biossíntese de metabólitos secundários (Gangappa e Botto, 2016). Trabalhos sugerem que HY5 pode influenciar cerca de 9000 genes

em *Arabidopsis*, ou seja, um terço do seu genoma (Quail, 2002; Sullivan e Deng, 2003). Portanto, esse fator de transcrição é considerado um agente central na coordenação da sinalização da luz e expressão gênica, conectando diferentes processos. HY5 possui duas isoformas que ocorrem de acordo com seu estado de fosforilação, a sua forma desfosforilada apresenta maior atividade biológica com maior afinidade por seus alvos. A isoforma fosforilada está mais presente na ausência de luz servindo como reserva do fator de transcrição durante a transição de escuro para luz (Gangappa e Botto, 2016). A sua atividade depende da interação física com seus alvos que podem funcionar como promotores ou inibidores da fotomorfogênese. Uma das moléculas mais importantes e mais conhecidas que interagem com HY5 é CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), um repressor chave do desenvolvimento regulado por luz que marca HY5 para degradação proteolítica no escuro (Deng e Osterlund, 2000). Essa interação ocorre no núcleo celular entre a porção N-terminal de HY5 e o complexo sinalossomo COP9 (CSN), além disso, a presença de luz também está relacionada com as duas proteínas, influenciando diretamente a localização subcelular do repressor. No escuro, COP1 se encontra no núcleo participando do complexo protéico responsável pela degradação de alvos, como HY5 (Lau e Deng, 2012). A estabilidade de HY5 é juntamente regulada, conforme a variação da luz, devido à relação com COP1, evidenciando um mecanismo de regulação dinâmico para modulação dos níveis do fator de transcrição dependente de luz e conseqüentemente um maior controle sob alongamento da plântula (Gangappa e Botto, 2016).

Mutantes perda-de-função HY5 geram fenótipos anormais em *Arabidopsis*, em que a planta apresenta características de estiolamento mesmo estando na luz, como alongamento do hipocótilo, redução no acúmulo de clorofila nos cotilédones e baixo acúmulo de antocianinas (Holm et al., 2002). Além da parte aérea, as raízes dos mutantes também apresentam alterações morfológicas e limitações em responder a hormônios e estímulos externos (Vandenbussche et al., 2007). A característica fenotípica mais proeminente nesse mutante, quando exposto a luz, é o elevado número de raízes laterais e a dinâmica de desenvolvimento destas, uma vez que apresentam taxa de crescimento acelerada e maior comprimento em comparação com o selvagem (Cluis, et al. 2004).

Um dos papéis regulatórios de HY5 está relacionado com a indução de genes da rota metabólica de flavonóides, isso pode ocorrer de forma direta, quando ocorre ligação entre

HY5 e a região promotora desses genes, ou indireta, através da associação com outros fatores de transcrição, como MYB12, induzindo a produção das proteínas envolvidas, sugerindo a comunicação entre fotorreceptores, HY5 e flavonóides (Gangappa e Botto, 2016).

#### ***1.4 Flavonóides***

Devido ao contínuo contato com diferentes estresses que organismos vegetais enfrentam, uma série de metabólitos secundários são formados em resposta para modular defesa e desenvolvimento, entre estes estão os flavonóides (Bhatia, et al. 2018). Os flavonóides são compostos polifenólicos com papel de proteção nos tecidos vegetais contra condições ambientais adversas, incluindo alta irradiância de luz, baixas temperaturas e infecções por patógenos (Schulz, et al. 2016). A síntese dessas moléculas acontece a partir da fenilalanina, da qual se ramifica a via metabólica dos flavonóides com atividade específica das enzimas chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), flavonóide 3'-hidroxilase (F3'H) e flavonol sintase (FLS; Kim et al. 2017; Figura 1a). Compostos flavonóides são caracterizados pela presença de dois anéis benzeno ou por um anel pirano e, em função de sua diversidade estrutural, devido a diferentes conformações no esqueleto da molécula, podem ser classificados em diversas classes, algumas delas são os flavonóis, flavonas, isoflavonas e antocianinas (Saito et al. 2013; Figura 1b). O acúmulo desses polifenóis ocorre em diferentes quantidades nas folhas e caule das plantas, dependendo principalmente de condições como intensidade de luz e estado nutricional desses indivíduos (Azari et al, 2010). Estudos anteriores já mostraram o efeito fotoprotetor de flavonóis contra luz UV-B (Agati et al, 2013). O processo regulatório da rota de biossíntese também está associado com variações no ambiente, uma vez que essas variações levam a respostas adaptativas para sobrevivência, sendo a luz uma das principais condições. Por exemplo, quando plântulas de *Arabidopsis* são crescidas no escuro, a produção de flavonóides não está ativa, diferente do que ocorre na presença de luz, na qual ocorre uma grande indução na transcrição dos genes relacionados às enzimas da via de biossíntese (Buer et al. 2004).

Levando em consideração as funções descritas dos flavonóides, a regulação de sua síntese é controlada por fatores exógenos e endógenos através de uma rede de fatores de transcrição (Wang et al. 2016). HY5 é um fator de transcrição chave que induz o acúmulo de

flavonóides através da sua atividade promotora sob os genes da rota de biossíntese desses compostos, o que acontece majoritariamente na presença de luz (Gangappa e Botto, 2016). Já foi demonstrado que os genes codificadores das enzimas CHALCONE SYNTHASE (CHS), CHALCONE ISOMERASE (CHI), FLAVANONE 3-HYDROXYLASE (F3H) e FLAVONOL SYNTHASE (FLS) da rota de biossíntese de flavonóides são induzidos por HY5 em resposta a luz (Shin et al. 2007). Estudos prévios já demonstraram que flavonóis possuem relação com o crescimento e com a resposta fototrópica da raiz em *Arabidopsis* (Pollastri e Tattini, 2011). A regulação feita por esses compostos se dá em função de uma redistribuição de auxina nas raízes, promovendo fototropismo (Silva-Navas, 2016). Além disso, esse acúmulo induz um desbalanço entre o processo de diferenciação e proliferação celular, afetando também o transporte de auxina e conseqüentemente o crescimento da raiz (Silva-Navas, 2016).

Os mutantes *transparent testa (tt)*, recebem essa denominação devido à incapacidade de acumular flavonóides apresentando ausência de pigmentação na camada externa das sementes (Bharti, 2003). Esses mutantes são uma ferramenta apropriada para o estudo da regulação e interação de flavonóides nas plantas, uma vez que não possuem genes codificantes para componentes essenciais da via de biossíntese dos flavonóides como enzimas ou fatores regulatórios. Dentre as mutações nas enzimas iniciais da rota de biossíntese de flavonóides, o mutante *tt6* que codifica a enzima flavona 3-hidroxilase apresentou um aumento no número de raízes laterais quando comparado com a planta selvagem (Buer e Djordjevic, 2009).

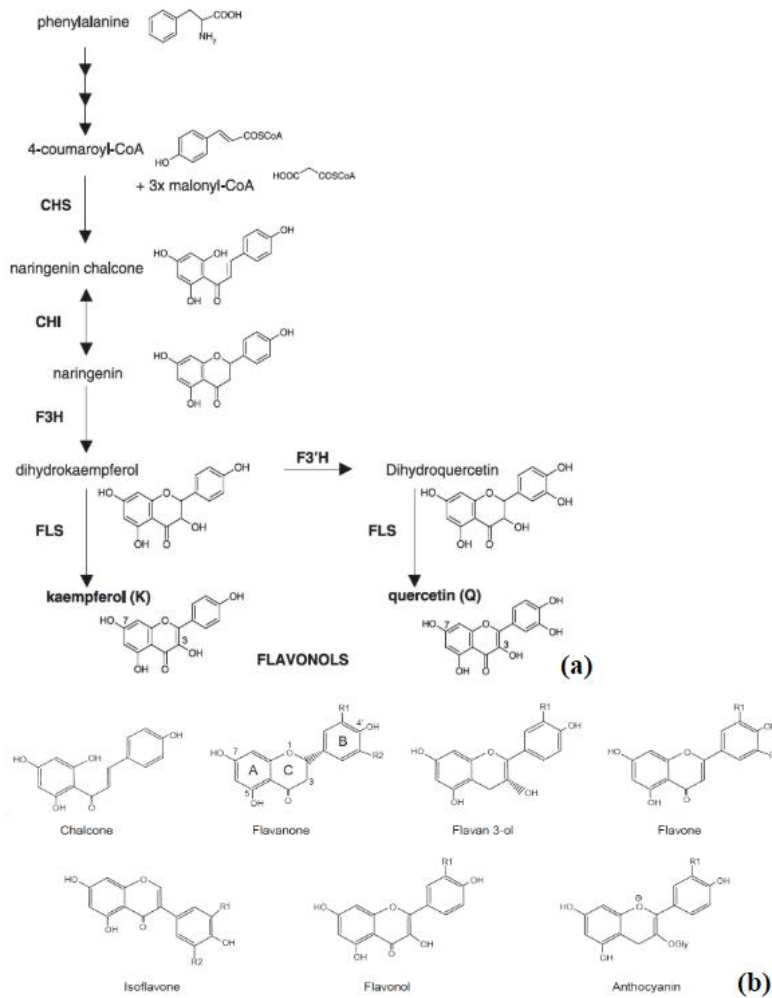


Figura 1: Estrutura e rota de biossíntese de flavonóides. (a) Diagrama da rota de biossíntese dos flavonóides. Chalcona Sintase (CHS), Chalcona Isomerase (CHI), Flavanona 3-Hidroxilase (F3H), Flavonol Sintase (FLS), flavonóide 3'-Hidroxilase (F3'H). (b) Estrutura química das principais classes de flavonóides. Figura adaptada de Kim, et al. 2017 e Saito, et al. 2013.

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo geral***

Obtenção de plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando HY5 nos mutantes *tt6* e *hy5*.

### ***2.2 Objetivos específicos***

- Amplificar a sequência codificadora de *HY5* a partir do cDNA de Arabidopsis;
- Clonar *AtHY5* no vetor binário de expressão *pH7WG2*;
- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor de expressão *pH7WG2-AtHY5*;
- Transformar os mutantes *tt6* e *hy5* de Arabidopsis com a construção *pH7WG2-AtHY5* via *floral-dip*;
- Selecionar transformantes positivos e avaliar os níveis de expressão de *HY5* por RT-qPCR.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 *Material vegetal e condições de crescimento*

Sementes de *Arabidopsis* da linhagem Columbia (Col-0), *hy5* (SALK\_056405C) e *tt6-3* (SALK\_113904) foram submetidas à assepsia superficial em etanol 70% por 1 min, seguido de uma solução de hipoclorito de sódio 1% e Tween x-100 0,05% por 15 min. Posteriormente, passaram por quatro lavagens com água destilada estéril e estratificadas a 4°C durante 2 dias em solução de agarose 0,05% (w/v). As sementes foram colocadas na superfície de placas de Petri com meio Murashige e Skoog (Sigma-Aldrich, M5519; 1,5% (w/v) ágar, 10% (w/v) sacarose e 0,05% (w/v) MES, pH 5.7) na orientação vertical para germinar em sala de cultivo a 21°C ± 2°C sob fotoperíodo longo (16h-luz e 8h-escuro) até atingirem tamanho suficiente para serem transferidas para substrato (turfa:vermiculita, 1:1).

#### 3.2 *Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA*

Para extração de ácidos nucleicos, folhas de plantas adultas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. A extração de DNA foi feita pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) enquanto que a extração de RNA foi realizada com uso de TRIzol Reagent (Thermo Fischer Scientific) seguindo as instruções do fabricante. As concentrações do DNA e RNA extraídos foram mensuradas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) e a qualidade avaliada por eletroforese em gel de TBE-agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), as amostras foram previamente tratadas com DNase I (Invitrogen) para eliminar contaminação com DNA genômico. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500ng de RNA total pela transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 3.3 *Obtenção da sequência de HY5*

A sequência codificante de HY5 foi amplificada a partir de folhas jovens de *Arabidopsis thaliana* do genótipo Col-0, pela técnica de PCR. Os *primers* utilizados para obtenção do inserto foram desenhados baseados na sequência disponível no genoma de *Arabidopsis* (Figura 2; <https://www.arabidopsis.org/>). Na região 5' do *primer* senso foi

adicionada a sequência CACC para posterior inclusão do inserto no plasmídeo de entrada do sistema gateway (gHY5\_F 5' - CACCATGCAGGAACAAGCGAC - 3'; gHY5\_R 5' - AAGGCTTGCATCAGCATTA - 3'). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25µL contendo 1µL de cDNA, 2µL de Tampão de Reação Q5 5X, 10mM dNTPs, 0.5µM de cada *primer*, 0.02U de Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). As condições da reação foram 30 segundos a 98°C como desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de amplificação com etapas de desnaturação a 98°C por 10 segundos, seguidas de anelamento a 63°C por 10 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos e, por fim, extensão final a 72°C por 2 minutos. A especificidade do produto da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de TBE-agarose 1% corado com brometo de etídeo (EtBr).

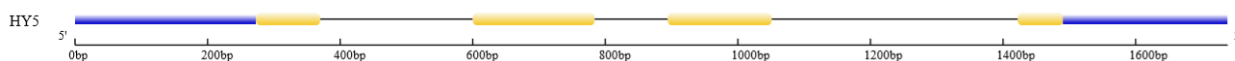


Figura 2: Esquema representativo do gene HY5. Em azul as regiões 5' e 3' UTR, os retângulos amarelos representam os éxons e as linhas cinza introns.

### 3.4 Clonagem de *AtHY5* no sistema Gateway

O produto de amplificação da sequência codificadora de HY5 foi clonado no vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen), seguindo as instruções do manual do fabricante. A confirmação da clonagem foi feita por PCR a partir de colônias de *Escherichia coli* recombinantes formadas em meio de cultura Luria-Bertani contendo canamicina a 50mg/mL. Adicionalmente, as amostras positivas para a presença do inserto HY5 foram sequenciadas para verificação da correta construção do vetor (ACTGene, Porto Alegre-RS). Posteriormente, para introduzir o gene de interesse *AtHY5* no vetor binário de expressão foi conduzida a recombinação do plasmídeo de entrada (pENTR/D-TOPO - *AtHY5*) com o vetor de destino pH7WG2 (Karimi, 2002) através da reação de recombinação Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. A confirmação da presença do inserto no plasmídeo de destino foi realizado por meio de PCR e sequenciamento como descrito anteriormente. Células competentes de *E. coli* cepa OmniMAX foram transformadas seguindo o protocolo Mix&Go! (ZymoResearch Ltda.) para



multiplicação do vetor de entrada pENTR/D-TOPO - AtHY5 e do vetor binário *pH7WG2 - AtHY5*.

### **3.5 Transformação e seleção de *Arabidopsis thaliana***

A construção *pH7WG2-AtHY5* foi introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 por meio de eletroporação (Main, 1995). Colônias positivas foram selecionadas em meio LB sólido contendo rifampicina a 50mg/L, espectinomicina e estreptomicina a 50mg/mL cada. A confirmação da transformação foi realizada por PCR de colônia, como descrito anteriormente. Uma linhagem positiva foi utilizada para a transformação de plantas de *A. thaliana*, Col-0, *hy5*, *tt6* via *floral-dip* (Zhang, et al. 2006).

Após a esterilização e quebra de dormência das sementes T1, foi feita a seleção de transformantes positivos com meio MS suplementado com higromicina (25mg/mL), carbenicilina (100mg/mL) e nistatina (100mg/mL). Placas contendo as sementes foram deixadas em total escuro por dois dias e posteriormente sob regime de 16h luz - 8h escuro. As plântulas estioladas foram transferidas para meio MS sem antibiótico para desenvolvimento, após alguns dias foram transferidas para solo. Para confirmação da presença do vetor *pH7WG2-HY5* nas plântulas resistentes, foi realizado PCR para o gene Hygromycin phosphotransferase, que confere resistência a higromicina, utilizando-se *primers* específicos (HPT-F 5' - GCCTCCAGAAGAAGATGTTGG - 3', HPT-R 5' - GAGCCTGACCTATTGCATCTCC - 3'). Linhagens positivas foram mantidas em solo para posterior verificação dos níveis de expressão do gene de interesse.

### **3.6 Avaliação da superexpressão *HY5***

A verificação dos níveis de expressão relativa de *HY5* foi realizada por meio RT-qPCR (Livak, 2001). As reações foram realizadas utilizando-se o DNA complementar sintetizado a partir de folhas como indicado no item 3.2, no aparelho StepOne™ Real-time PCR system utilizando-se quantificação por fluorescência de SYBR-Green. Foram feitas duplicatas técnicas para cada amostra utilizando os seguintes *primers*: HY5-RT F 5' - TTTCCCTCTCTCTCTCGCCTG - 3'; HY5-RT R 5' - ACTCGCCGTATCTCCTCATC - 3'. Para cada reação foram adicionados 2µL de tampão 10X, 1,2µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,1µL de mistura de dNTPs (10mM), 0,4µL do *primer* F+R (10mM), 10µL de cDNA 1:50, 0,05µL

de Taq Platinum (5U/ $\mu$ L) e água ultrapura q.s.p para 20 $\mu$ L. A reação foi realizada com a etapa inicial de 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos com etapas de 94°C por 10 seg, 60°C por 15 seg e 72°C por 15 seg. O perfil da curva de *melting* dos amplicons foi obtido após sua incubação por 2 min a 40°C com propósito de anelamento e posteriormente aquecimento de 55°C a 99°C. Os níveis de expressão foram calculados em função do gene referência WD40 (AT3G18860; WD40-RT F 5' - TTTCAGCAGCTTTGCAGGTAGC - 3'; WD40-RT R 5' - TGAGCCAATTGCTACCAGACTCC - 3' ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Amplificação da sequência codificante de HY5

A fim de avaliar a relação existente entre a rota de biossíntese de flavonóides e o fator de transcrição HY5 o objetivo do trabalho foi superexpressar a sequência codificadora de HY5 em diferentes genótipos de *Arabidopsis thaliana*. A primeira etapa foi a amplificação da sequência codificante de HY5, para isso utilizou-se o cDNA de plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana*. A reação possibilitou a obtenção de um fragmento único, com o tamanho esperado, confirmando a especificidade dos *primers* projetados (Figura 3a). Após clonagem no vetor de entrada e transformação em *E. coli* OmniMAX, cinco colônias resistentes ao agente seletivo foram escolhidas para confirmação da inserção de HY5 por PCR de colônia e posteriormente por sequenciamento (Figura 3b). As cinco colônias selecionadas apresentaram resultado positivo para a presença da sequência de interesse.

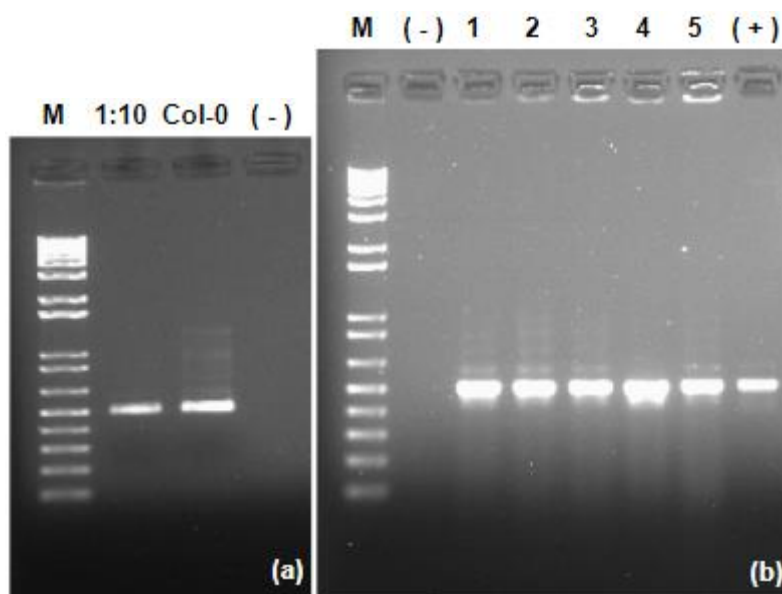


Figura 3: Amplificação da sequência codificadora do gene AtHY5 e seleção dos clones de pENTR/D-TOPO - AtHY5. (a) Sequência codificante de AtHY5 amplificada por PCR a partir do cDNA de Col-0. M: Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); 1:10: produto de amplificação de cDNA diluído 10 vezes, Col-0: produto de amplificação de cDNA não diluído. (-): controle negativo da reação de PCR. O produto esperado tem cerca de 500bp. (b) PCR de colônia de *Escherichia coli*, OmniMAX, transformadas com o plasmídeo pENTR/D-TOPO - AtHY5. M: Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (-): controle negativo da reação de PCR; 1-5: colônias testadas; (+): controle positivo da reação de PCR, foi utilizado o produto de amplificação do cDNA de HY5.

#### 4.2 Obtenção do plasmídeo binário *pH7WG2-AtHY5*

Para tornar possível a superexpressão de HY5 nos mutantes escolhidos, foi necessária a construção de um vetor de expressão compatível com a técnica de transformação e com o organismo do estudo, *Arabidopsis*. Foi realizada a construção do vetor contendo a sequência do gene de interesse, *AtHY5*, sob regulação de um promotor constitutivo (Figura 4) com objetivo de aumentar a expressão de HY5 nos genótipos escolhidos. A confirmação das colônias transformadas assim como a presença de *AtHY5* no vetor final foi feita por PCR (Figura 5a) e reação de clivagem com a enzima de restrição *SalI*. Considerando o padrão de bandas predito anteriormente com auxílio do programa *SerialCloner* foi possível observar que os plasmídeos testados apresentaram o padrão esperado (Figura 5b e c). O sequenciamento das amostras, permitiu-se concluir que o gene *HY5* foi clonado de maneira correta, sem qualquer alteração da sua sequência, conforme alinhamento utilizando MEGA 7.0 (Figura 6).

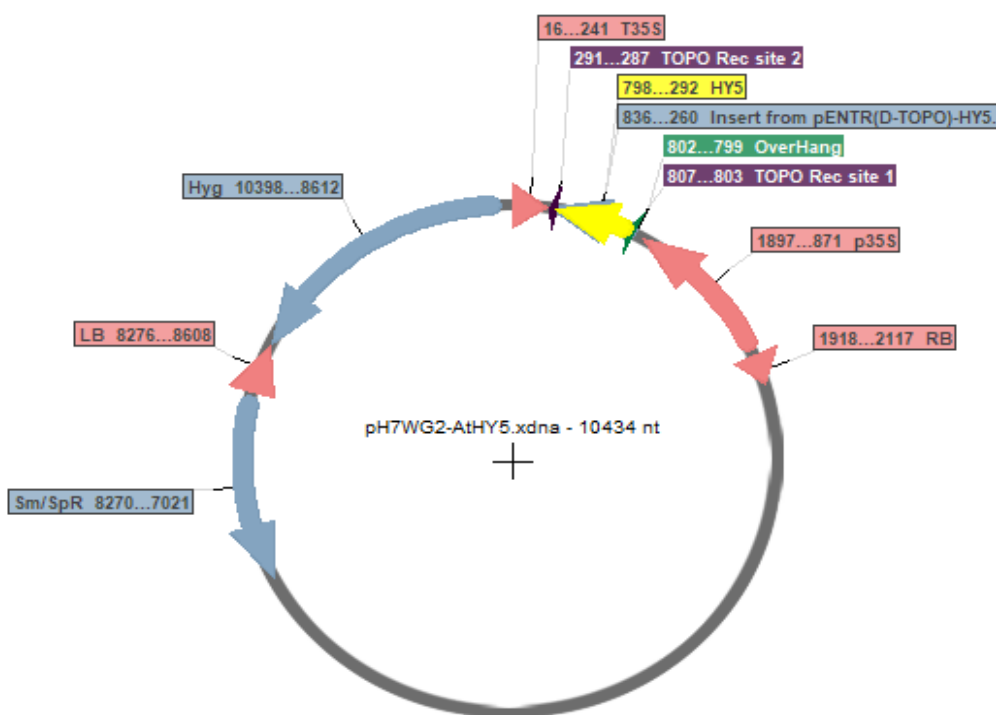


Figura 4: Mapa do vetor binário *pH7WG2-AtHY5*. Hyg: gene que confere resistência ao antibiótico higromicina; Sm/SpR: gene que confere resistência ao antibiótico espectinomomicina/estreptomicina; RB e LB: bordas direita e esquerda, respectivamente, de integração do T-DNA; p35S e T35S: promotor e terminador 35S (CaMV); TOPO Rec site 1 e TOPO Rec site 2: sequências de recombinação entre o plasmídeo de entrada e o vetor de destino; HY5: inserto de interesse.

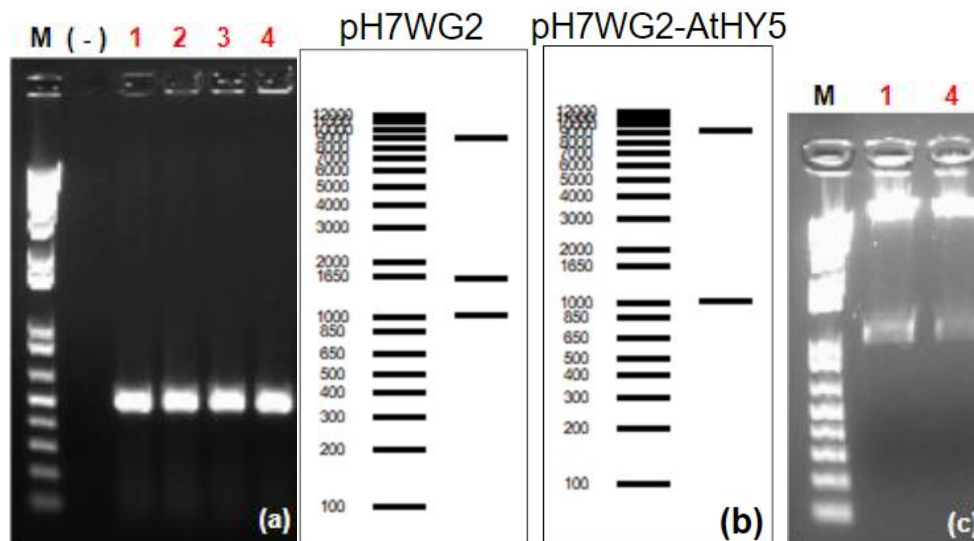


Figura 5: Seleção das colônias transformadas com o plasmídeo *pH7WG2-AtHY5*. (a). PCR de colônia de *Escherichia coli*, OmniMAX, transformadas com o plasmídeo *pH7WG2-AtHY5*. M: Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (-): controle negativo da reação de PCR, foi utilizado água; 1-4: colônias testadas. (b). Predição do padrão de clivagem do vetor binário vazio e com a inserção de AtHY5 (fragmentos esperados do vetor final: 9.408pb e 1.026pb; no vetor vazio espera-se uma terceira banda de 1.606pb). (c). Clivagem do vetor após extração plasmidial das colônias selecionadas (1 e 4) com a enzima de restrição SalI. M: Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); 1 e 4: fragmentos do DNA plasmidial resultantes da clivagem.

Após confirmação da presença da sequência codificadora de HY5 no vetor pH7WG2, o mesmo foi transformado em células de *A. tumefaciens*, EHA105. Colônias resistentes aos agentes seletivos foram selecionadas para análise por PCR. Seis colônias foram testadas, das quais cinco apresentaram o produto de amplificação esperado (Figura 7). A colônia 3 foi utilizada para a transformação de plantas de *Arabidopsis* por *floral-dip*.

pH7WG2-AtHY5_F	-----	0
pH7WG2-AtHY5_R	TACAAGAAAGCTGGGTCGGCGCGCCACCCCTTACCATGCAGGAACAAGCGACTAGCTCT	60
HY5_CDS	-----ATGCAGGAACAAGCGACTAGCTCT	24
pH7WG2-AtHY5_F	-----	0
pH7WG2-AtHY5_R	TTAGCTGCAAGCTCTTTACCATCAAGCAGCGAGAGGTCATCAAGCTCTGCTCCACATTTG	120
HY5_CDS	TTAGCTGCAAGCTCTTTACCATCAAGCAGCGAGAGGTCATCAAGCTCTGCTCCACATTTG	84
pH7WG2-AtHY5_F	-----GAAAGCGATGAGGAGATACGGCGAGTGCCGGAGTTTGGAGGA	42
pH7WG2-AtHY5_R	GAGATCAAAGAAGGAATTGAAAGCGATGAGGAGATACGGCGAGTGCCGGAGTTTGGAGGA	180
HY5_CDS	GAGATCAAAGAAGGAATTGAAAGCGATGAGGAGATACGGCGAGTGCCGGAGTTTGGAGGA	144
	*****	
pH7WG2-AtHY5_F	GAAGCTGTCGGAAAAGAAACTTCCGGTAGAGAATCTGGATCGGCGACCGGTCAGGAGCGG	102
pH7WG2-AtHY5_R	GAAGCTGTCGGAAAAGAAACTTCCGGTAGAGAATCTGGATCGGCGACCGGTCAGGAGCGG	240
HY5_CDS	GAAGCTGTCGGAAAAGAAACTTCCGGTAGAGAATCTGGATCGGCGACCGGTCAGGAGCGG	204
	*****	
pH7WG2-AtHY5_F	ACACAGGCGACTGTCGGAGAAAGTCAAAGGAAGCGAGGGAGGACACCGGCGGAGAAAGAG	162
pH7WG2-AtHY5_R	ACACAGGCGACTGTCGGAGAAAGTCAAAGGAAGCGAGGGAGGACACCGGCGGAGAAAGAG	300
HY5_CDS	ACACAGGCGACTGTCGGAGAAAGTCAAAGGAAGCGAGGGAGGACACCGGCGGAGAAAGAG	264
	*****	
pH7WG2-AtHY5_F	AACAAGCGGCTGAAGAGGTTGTTGAGGAACAGAGTTTCAGCTCAGCAAGCAAGAGAGAGG	222
pH7WG2-AtHY5_R	AACAAGCGGCTGAAGAGGTTGTTGAGGAACAGAGTTTCAGCTCAGCAAGCAAGAGAGAGG	360
HY5_CDS	AACAAGCGGCTGAAGAGGTTGTTGAGGAACAGAGTTTCAGCTCAGCAAGCAAGAGAGAGG	324
	*****	
pH7WG2-AtHY5_F	AAAAAGGCTTACTTGAGCGAGTTGGAAAACAGAGTGAAAGACTTGGAGAACA AAAA ACTCT	282
pH7WG2-AtHY5_R	AAAAAGGCTTACTTGAGCGAGTTGGAAAACAGAGTGAAAGACTTGGAGAACA AAAA ACTCT	420
HY5_CDS	AAAAAGGCTTACTTGAGCGAGTTGGAAAACAGAGTGAAAGACTTGGAGAACA AAAA ACTCT	384
	*****	
pH7WG2-AtHY5_F	GAACTTGAAGAGCGACTCTCTACTCTTCAGAACGAGAACCAGATGCTTAGACATATTCTG	342
pH7WG2-AtHY5_R	GAACTTGAAGAGCGA-----	435
HY5_CDS	GAACTTGAAGAGCGACTCTCTACTCTTCAGAACGAGAACCAGATGCTTAGACATATTCTG	444
	*****	
pH7WG2-AtHY5_F	AAGAACACAACAGGAAACAAGAGAGGAGGTGGTGGTGGTTCTAATGCTGATGCAAGCCTT	402
pH7WG2-AtHY5_R	-----	435
HY5_CDS	AAGAACACAACAGGAAACAAGAGAGGAGGTGGTGGTGGTTCTAATGCTGATGCAAGCCTT	504
pH7WG2-AtHY5_F	AAGGTTGGCGCGCCACCCCTTCTGTACTATGTCGGTGAAGGGGGCGGCCGCGGAGCCTG	462
pH7WG2-AtHY5_R	-----	435
HY5_CDS	TGA-----	507

Figura 6: Alinhamento da sequência codificadora de HY5 e sequenciamento do vetor de expressão *pH7WG2-AtHY5*. O alinhamento foi realizado no Clustal Omega.

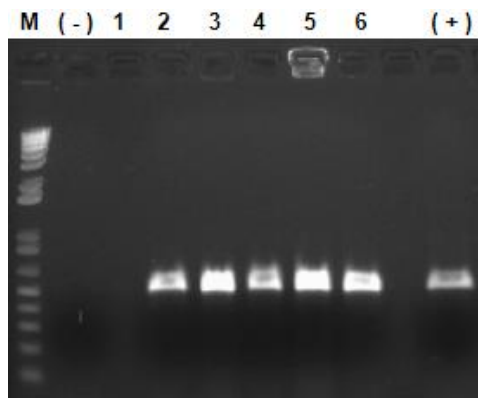


Figura 7: Seleção das colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com *pH7WG2-AtHY5*. PCR para verificar a presença do vetor de expressão. M: Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); (-): controle negativo da reação de PCR, foi utilizado água; 1-6: colônias testadas; (+): controle positivo da reação de PCR, foi utilizado o produto de amplificação do cDNA de HY5.

#### 4.3 Transformação genética de *Arabidopsis thaliana* com o vetor *pH7WG2-AtHY5*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (Col-0), bem como *tt6-3* e *hy5* foram transformadas por *floral-dip*. As sementes obtidas após a transformação dos genótipos *tt6-3* e *hy5* foram selecionadas em meio de crescimento suplementado com higromicina ao qual o vetor *pH7WG2-HY5* confere resistência. A seleção das sementes transformadas foi realizada pela comparação de estiolamento entre as plântulas positivas descrito por Harrison, et al. 2006. Após dois dias no escuro, foi possível observar diferença no desenvolvimento inicial das plântulas, como maior grau de estiolamento, raízes mais desenvolvidas e cotilédones verdes, indicando a presença de linhagens transformadas, em oposição, as plântulas não transformadas apresentaram desenvolvimento limitado, raízes pequenas e cotilédones amarelos quando comparadas com as plântulas transgênicas. Onze e dez plantas oriundas da transformação dos genótipos *hy5* e *tt6*, respectivamente, foram resistentes a presença do antibiótico higromicina no meio de crescimento. As plântulas resistentes foram transferidas para meio de crescimento livre de higromicina para recuperação e posteriormente para o solo para crescimento e multiplicação. Adicionalmente, foi verificado a presença do vetor de *pH7WG2-AtHY5* por PCR, na qual utilizou-se *primers* específicos para o gene *HPT* que confere resistência ao antibiótico higromicina. Dentre essas amostras, a inserção da construção gênica pode ser observada em seis linhagens de *hy5* e sete linhagens de *tt6-3* (Figura 8), essas linhagens foram escolhidas para a próxima análise.

A transformação do genótipo Col-0 de *Arabidopsis* foi realizada assim como os demais, entretanto até o presente momento as plantas transformadas não finalizaram seu ciclo de desenvolvimento, impossibilitando a seleção de transformantes.

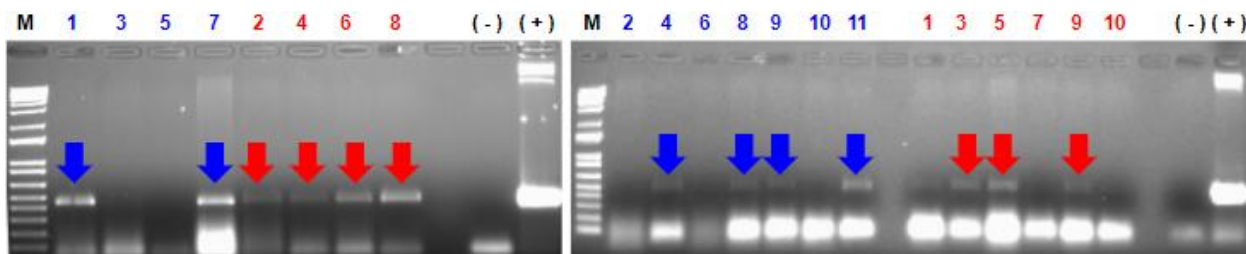


Figura 8: Confirmação por PCR do estado transgênico das plantas transformadas com *pH7WG2-AtHY5*. M: Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen); Flechas azuis: genótipo *hy5*; Flechas vermelhas: genótipo *tt6*. As bandas apresentam tamanho de 400pb referente ao gene *hpt*; (-): controle negativo da reação de PCR, foi utilizado água; (+): controle positivo da reação de PCR, foi utilizado o vetor *pH7WG2-AtHY5*.

#### 4.4 Avaliação dos níveis de expressão de *HY5* nas linhagens transformadas

A verificação dos níveis de expressão de *AtHY5* nas linhagens transformadas foi realizada por meio de RT-qPCR. Para isso, RNA total das linhagens positivas para a presença do gene de resistência (Figura 8) foi extraído e utilizado para a síntese do DNA complementar. Das seis linhagens testadas do genótipo *tt6*, cinco apresentaram níveis de expressão mais elevados, com no mínimo duas vezes mais quando em comparação com a planta controle (Col-0) (Figura 9). A linhagem 3 não mostrou expressão alguma nessa primeira etapa de teste. Entretanto, das linhagens geradas no genótipo mutante *hy5*, três, das cinco amostras avaliadas, apresentaram níveis detectáveis do transcrito de *AtHY5*, confirmando a complementação gênica do mutante *hy5* (Figura 9). Curiosamente, os níveis de expressão de *AtHY5* nestas linhagens foi menor que o observado na planta selvagem (Col-0), indicando que a expressão do gene não atingiu os níveis encontrados em Col-0.



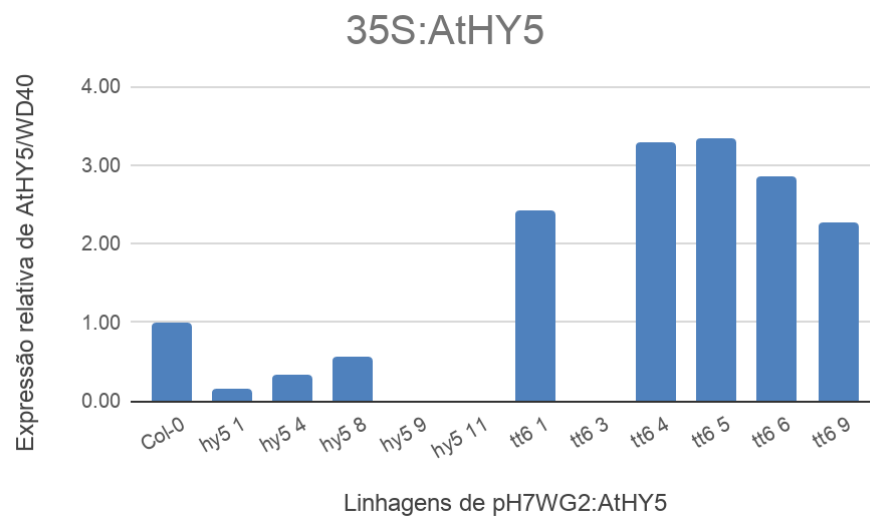


Figura 9: Expressão relativa de *AtHY5* em diferentes linhagens transformadas dos mutantes *hy5* e *tt6*. A expressão relativa foi normalizada em relação ao gene referência WD40. O nível de expressão de Col-0 foi considerado 1. Reações foram conduzidas em duplicata técnica para cada linhagem.

## 5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Atualmente, devido ao avanço nas tecnologias de sequenciamento, a quantidade de genomas completos sequenciados é enorme. O progresso do projeto genoma de *Arabidopsis* no final dos anos 90, resultou na identificação de milhares de genes potencialmente interessantes em um ritmo cada vez mais acelerado (Provart, et al. 2016). Juntamente com a evolução das técnicas de engenharia genética, houve uma expansão das coleções de sementes mutantes, chegando a situação atual, em que é possível encontrar linhagens contendo mutações em praticamente todos os genes de *Arabidopsis* (Provart, et al. 2016). O desafio, porém, se tornou atribuir funções a todos esses genes e para tanto, a caracterização funcional se faz essencial para conectar informações entre os genes e seus efeitos fenotípicos e também estabelecer relações entre diferentes genes (Holtorf, et al. 2002). Apesar de trabalhos já terem demonstrado que tanto HY5 quanto flavonóides atuam como reguladores no desenvolvimento de raízes em *Arabidopsis* (Cluis, et al. 2004; Buer e Muday, 2004; Silva-Navas, 2016), bem como a relação deste fator de transcrição com as enzimas da rota de síntese de flavonóides (Gangappa e Botto, 2016; Kim, et al. 2017; Bhatia, et al. 2018), não existem trabalhos que explorem a relação de ambos no estabelecimento do sistema radicular. Neste trabalho, foram obtidas diferentes linhagens de *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificadas superexpressando o gene endógeno HY5, um fator de transcrição indispensável na integração entre sinais externos e respostas internas da planta (Deng e Osterlund, 2000) em um mutante perda de função para uma das enzimas da rota de biossíntese de flavonóides. Com essa abordagem, pretende-se avaliar alterações fenotípicas nas raízes desse mutante em função de uma possível regulação/interação entre ambos os genes. As linhagens adquiridas provém de dois genótipos distintos: i) mutante para o gene utilizado na construção gênica, para reinserção do gene visando complementação fenotípica; ii) mutante para uma enzima da rota sob investigação. A clonagem do gene AtHY5 foi obtida no vetor binário pH7WG2 e transformada eficientemente na cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 7), usada para inserção do gene de interesse nas plantas de *Arabidopsis thaliana* pelo método de *floral-dip*. Essa técnica foi utilizada pela simplicidade e dispensabilidade de cultura de tecidos e regeneração dos indivíduos (Clough e Bent, 1998). Entretanto, embora seja uma técnica de simples execução, *floral-dip* não apresenta uma taxa de eficiência de transformação muito constante, provavelmente efeito da variabilidade nos estágios de

desenvolvimento das estruturas florais de cada planta, visto que para se estabelecer infecção é necessário a disponibilidade do gametófito feminino para a bactéria (Ghedira, et al. 2013). Após a extração de DNA genômico das plantas T1, previamente selecionadas em meio seletivo, foi possível confirmar a presença da construção gênica em pelo menos cinco plantas de cada genótipo via PCR (Figura 8). Adicionalmente, foram avaliados os níveis de expressão das linhagens T1 por RT-qPCR. Duas das linhagens de *tt6* mostraram aumentos nos níveis de expressão superior a três vezes quando comparados com Col-0, enquanto as outras três apresentaram expressão pouco abaixo deste valor. Quanto ao mutante *hy5*, foi possível detectar a presença do mRNA de HY5 no mutante perda-de-função. Adicionalmente, quanto à observação da expressão relativa das linhagens de *hy5* terem sido menores ao tipo selvagem, atribui-se presumivelmente o local de inserção do T-DNA, cuja disponibilidade do cisgene para maquinaria de transcrição não permitiu aumento mais expressivo nas linhagens verificadas, outro possível motivo é a variabilidade das linhagens obtidas inerente à técnica de transformação, devido à aleatoriedade de inserção do T-DNA, a qual poderia explicar também a variação na expressão de todos transformantes observados. Além do mais, sabe-se que HY5 se auto-regula induzindo sua própria expressão (Abbas, et al. 2014), porém como esse mecanismo está ausente no mutante *hy5*, a expressão observada refere-se ao promotor constitutivo do vetor binário.

Já foi demonstrado que a biossíntese de flavonóides é reprimida pela interação de COP1 e HY5 em altas temperaturas, através do aumento da degradação de HY5 (Kim, et al. 2017). Logo, existe uma relação de interação comprovada entre fotomorfogênese e flavonóides. Baseado na hipótese do trabalho, propomos um modelo onde HY5 e TT6 regulam o desenvolvimento de raízes laterais em plântulas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 10). De acordo com o modelo, o aumento do número de raízes laterais nos mutantes *tt6* e *hy5* pertencem a mesma via de regulação, desencadeada por HY5 de forma dependente de flavonóides. Tanto o fenótipo do aumento de raízes laterais no mutante *hy5* quanto no mutante *tt6* resultam da relação de HY5 com a produção de flavonóides. Baseado no modelo proposto, espera-se que o fenótipo previamente observado de aumento no número de raízes laterais no mutante *tt6* se mantenha, em razão da ausência do gene da flavona 3-hidroxilase (F3H; *tt6*), impossibilitando a ação do fator de transcrição HY5. Por outro lado, uma alteração no número de raízes laterais resultante da superexpressão de HY5 indica que o fenótipo

observado em *tt6* não é dependente da relação de ambos e, logo, presume-se que existe influência de outra via sinalizadora no controle do desenvolvimento de raízes laterais. Para confirmar ou refutar o modelo apresentado, faz-se necessária a avaliação fenotípica das linhagens obtidas neste trabalho, analisando o desenvolvimento do sistema radicular em comparação com genótipos controle.

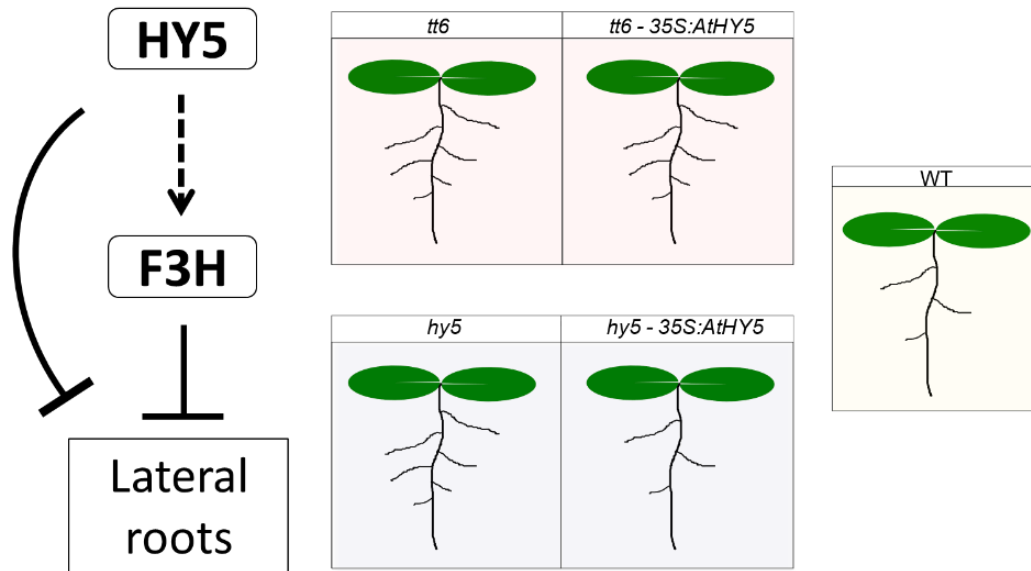


Figura 10. Modelo hipotético do papel de HY5 e F3H na regulação do desenvolvimento do sistema radicular em *Arabidopsis thaliana*. Neste trabalho é proposta uma relação entre HY5 e F3H no controle da emissão de raízes laterais, na qual HY5 atua como um regulador em resposta à luz integrando sinais luminosos com a via de biossíntese de flavonóides, induzindo a produção de F3H e, conseqüentemente, reduzindo a emergência de raízes laterais. Nosso modelo sugere que a superexpressão de HY5 no mutante *tt6* não causa alteração fenotípica em função da ausência de F3H nesse mutante. E, no mutante *hy5*, ocorre recuperação do fenótipo mutante.

## 6 REFERÊNCIAS

- Abbas, N., Maurya, J. P., Senapati, D., Gangappa, S. N., & Chattopadhyay, S. (2014). Arabidopsis CAM7 and HY5 Physically Interact and Directly Bind to the HY5 Promoter to Regulate Its Expression and Thereby Promote Photomorphogenesis . *The Plant Cell*, 26(3), 1036–1052. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122515>
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>
- Ang, L. H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., & Deng, X. W. (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Molecular Cell*, 1(2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80022-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80022-2)
- Appelhagen, I., Thiedig, K., Nordholt, N., Schmidt, N., Huep, G., Sagasser, M., & Weisshaar, B. (2014). Update on transparent testa mutants from Arabidopsis thaliana: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta*, 240(5), 955–970. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2088-0>
- Azari, R., Reuveni, M., Evenor, D., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., & Levin, I. (2010). Overexpression of UV-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 links plant development and phytonutrient accumulation in high pigment-1 tomato. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3627–3637. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq176>
- Bhatia, C., Pandey, A., Gaddam, S. R., Hoecker, U., & Trivedi, P. K. (2018). Low temperature-enhanced flavonol synthesis requires light-associated regulatory components in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 59(10), 2099–2112. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy132>
- Bharti, A. K., & Khurana, J. P. (2003). Molecular characterization of transparent testa (tt) mutants of Arabidopsis thaliana (ecotype Estland) impaired in flavonoid biosynthetic pathway. *Plant Science*, 165(6), 1321–1332. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00344-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00344-3)
- Buer, C. S., & Djordjevic, M. A. (2009). Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 751–763. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern323>
- Buer, C. S., Muday, G. K., The, S., Cell, P., & May, N. (2015). The transparent testa4 Mutation Prevents Flavonoid Synthesis and Alters Auxin Transport and the Response of Arabidopsis Roots to Gravity and Light. *American Society of Plant Biologists*, 16(5), 1191–1205. <https://doi.org/10.1105/tpc.020313.tiles>

Chen, K., & Rajewsky, N. (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 8(2), 93–103. <https://doi.org/10.1038/nrg1990>

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>

Cluis, C. P., Mouchel, C. F., & Hardtke, C. S. (2004). The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant Journal*, 38(2), 332–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02052.x>

Deng, X. W., Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., & Wei, N. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405(6785), 462–466. <https://doi.org/10.1038/35013076>

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

Gangappa, S. N., & Botto, J. F. (2016). The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Molecular Plant*, 9(10), 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>

Ghedira, R., De Buck, S., Nolf, J., & Depicker, A. (2013). The Efficiency of *Arabidopsis thaliana* Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the *Agrobacterium* Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(7), 823–832. <https://doi.org/10.1094/mpmi-11-12-0267-r>

Holm, M., Ma, L. G., Qu, L. J., & Deng, X. W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 16(10), 1247–1259. <https://doi.org/10.1101/gad.969702>

Jing, Y., Zhang, D., Wang, X., Tang, W., Wang, W., Huai, J., Lin, R. (2013). *Arabidopsis* Chromatin Remodeling Factor PICKLE Interacts with Transcription Factor HY5 to Regulate Hypocotyl Cell Elongation. *The Plant Cell*, 25(1), 242–256. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105742>

Josse, E. M., & Halliday, K. J. (2008). Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Current Biology*, 18(24), R1144–R1146. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.034>

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195.

Kim, S., Hwang, G., Lee, S., Zhu, J.-Y., Paik, I., Nguyen, T. T., Oh, E. (2017). High Ambient Temperature Represses Anthocyanin Biosynthesis through Degradation of HY5. *Frontiers in Plant Science*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01787>

Ko, D., & Helariutta, Y. (2017). Shoot–Root Communication in Flowering Plants. *Current Biology*, 27(17), R973–R978. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.054>

Koornneef, M., & van der Veen, J. H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theoretical and Applied Genetics*, 58(6), 257–263. <https://doi.org/10.1007/BF00265176>

Lau, O. S., & Deng, X. W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in Plant Science*, 17(10), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.004>

Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Deng, X. W. (2007). Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development. *The Plant Cell Online*, 19(3), 731–749. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047688>

Leivar, P., & Monte, E. (2014). PIFs: Systems Integrators in Plant Development. *The Plant Cell*, 26(1), 56–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120857>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Main G.D., Reynolds S., Gartland J.S. (1995) Electroporation Protocols for *Agrobacterium*. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, vol 44.

Maloney, G. S., DiNapoli, K. T., & Muday, G. K. (2014). The anthocyanin reduced Tomato Mutant Demonstrates the Role of Flavonols in Tomato Lateral Root and Root Hair Development. *Plant Physiology*, 166(2), 614–631. <https://doi.org/10.1104/pp.114.240507>

Matus, J. T. (2016). Transcriptomic and Metabolomic Networks in the Grape Berry Illustrate That it Takes More Than Flavonoids to Fight Against Ultraviolet Radiation. *Frontiers in Plant Science*, 7(8), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01337>

Morelli, G., & Ruberti, I. (2002). Light and shade in the photocontrol of *Arabidopsis* growth. *Trends in Plant Science*, 7(9), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02314-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02314-2)

Notaguchi, M., & Okamoto, S. (2015). Dynamics of long-distance signaling via plant vascular tissues. *Frontiers in Plant Science*, 6(3), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00161>

Oyama, T., Shimura, Y., & Okada, K. (1997). The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus- induced development of root and hypocotyl. *Genes and Development*, 11(22), 2983–2995. <https://doi.org/10.1101/gad.11.22.2983>

- Pollastri, S., & Tattini, M. (2011). Flavonols: Old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7), 1225–1233. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr234>
- Provar, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., Friesner, J. D. (2015). 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist*, 2016(209), 921–944. <https://doi.org/10.1111/nph.13687>
- Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2), 85–93. <https://doi.org/10.1038/nrm728>
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., & Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>
- Sánchez-Retuerta, C., Suárez-López, P., & Henriques, R. (2018). Under a New Light: Regulation of Light-Dependent Pathways by Non-coding RNAs. *Frontiers in Plant Science*, 9(7), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00962>
- Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A. R., & Hinch, D. K. (2016). Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep34027>
- Shin, D. H., Choi, M., Kim, K., Bang, G., Cho, M., Choi, S. B., Park, Y. Il. (2013). HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 587(10), 1543–1547. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.037>
- Shin, J., Park, E., & Choi, G. (2007). PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis. *Plant Journal*, 49(6), 981–994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03021.x>
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Téllez-Robledo, B., Del Pozo, J. C. (2015). D-Root: A system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *Plant Journal*, 84(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/tpj.12998>
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Téllez-Robledo, B., Navarro-Neila, S., Carrasco, V., del Pozo, J. C. (2016). Flavonols Mediate Root Phototropism and Growth through Regulation of Proliferation-to-Differentiation Transition. *The Plant Cell*, 28(6), 1372–1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00857>
- Sullivan, J. A., & Deng, X. W. (2003). From seed to seed: The role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology*, 260(2), 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00212-4)



Vandenbussche, F., Habricot, Y., Condiff, A. S., Maldiney, R., Van Der Straeten, D., & Ahmad, M. (2007). HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 49(3), 428–441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02973.x>

Wang, Y., Wang, Y., Song, Z., & Zhang, H. (2016). Repression of MYBL2 by Both microRNA858a and HY5 Leads to the Activation of Anthocyanin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 9(10), 1395–1405. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.003>

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>