



***Isolamento e caracterização de fosfatases do tipo 2C e
proteínas PYR/PYL em Armeria welwitschii.***

Rodolfo Miguel Aparício Delgado

[2011]



***Isolamento e caracterização de fosfatases do tipo 2C e
proteínas PYR/PYL em Armeria welwitschii.***

Rodolfo Miguel Aparício Delgado

Trabalho de projeto apresentado à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar
do Instituto Politécnico de Leiria para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia
dos Recursos Marinhos

Trabalho de projeto realizado sob a orientação do Doutor Américo do Patrocínio
Rodrigues, professor adjunto da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar
do Instituto Politécnico de Leiria

[2011]

Titulo: Isolamento e caracterização de fosfatases do tipo 2C e proteínas PYR/PYL em *Armeria welwitschii*.

Copyright © Rodolfo Miguel Aparício Delgado

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À memória do meu avô,
aos meus pais, avó e irmão,
à Fátima

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente ao Doutor Américo Rodrigues, sem a sua ajuda nada seria possível. Pela qualidade dos conhecimentos que adquiri e rigor científico.

“Gostar do que fazemos é meio caminho andado para atingir os objetivos”;

À instituição que me acolheu;

À Doutora Clélia Afonso por todo o esforço demonstrado na coordenação desta primeira edição do mestrado;

Por me disponibilizar o material biológico (*Armeria welwitschii*);

Agradeço a todos os meus colegas de curso.

“A ciência é feita principalmente pela partilha de conhecimentos”;

A toda a minha família, pelo apoio incondicional que proporcionaram;

À Fátima, o meu suporte, a minha companhia e nunca me ter deixado desistir nos momentos mais difíceis.

O ácido abscísico (ABA) tem um papel fundamental na resposta a situações de stress, em particular stress hídrico e salino. Recentemente foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de recetores citoplasmáticos de ABA (proteínas PYR/PYL/RCAR) que, em presença de ABA, inibem a atividade das proteínas fosfatases do tipo 2C (PP2C) do grupo A que são reguladores negativos da resposta a ABA.

O habitat natural de *Armeria welwitschii* é um habitat em que em que o stress hídrico e salino é elevado e em que, os mecanismos de resistência a esses tipos de stress assumem um papel particularmente importante na sobrevivência dos indivíduos. A existência de populações a diferentes distâncias do mar e, portanto, sujeitas provavelmente a níveis bastante diferentes de stress constitui uma oportunidade para analisar a forma como os diferentes componentes da via de sinalização de ABA (e em particular as proteínas PYR/PYL/RCAR e as PP2Cs) são reguladas de forma a permitir a adaptação a essas condições.

Neste trabalho, a identificação de genes que codificam proteínas PYR/PYL/RCAR e fosfatases do tipo 2C do grupo A em *Armeria welwitschii*, teve como base a análise de sequências dessas proteínas, e a correspondente sequência de nucleótidos, de espécies como *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Populus trichocarpa* e *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana* de forma a permitir o desenho de primers degenerados.

As sequências foram alinhadas e as zonas conservadas foram consideradas para o desenho de primers degenerados. A amplificação foi efetuada utilizando cDNA obtido por transcrição reversa do RNA total extraído de *Armeria welwitschii*.

Por reamplificação do produto obtido numa primeira reação e após clonagem dos produtos de amplificação verificou-se que se tinha isolado uma sequência de cDNA que apresentava uma elevada semelhança com PP2Cs de *Arabidopsis thaliana*.

Palavras-chave: Ácido Abscísico (ABA), *Armeria welwitschii*, Recetores PYR/PYL/RCAR, Fosfatases do tipo 2C (PP2C), stress hídrico e salino, Primers degenerados, PCR, Clonagem,

Abscisic acid (ABA) plays a key role in the response to stress, particularly water and salt stress. Recently, has been identified in *Arabidopsis thaliana* a family of cytoplasmic ABA receptors (proteins PYR/PYL/RCAR) which, in the presence of ABA, inhibit the activity of protein phosphatases type 2C (PP2C) of group A, that are negative regulators of ABA response.

The natural habitat of *Armeria welwitschii* is a habitat in which water and salt stress are high and the mechanisms of resistance to these types of stress play a particularly important role in the survival of individuals. The existence of populations at different distances from the sea, subjected to very different levels of stress is an opportunity to analyze how the different components of ABA signaling pathway (in particular proteins like PYR/PYL and PP2Cs) behave to allow adaptation at these conditions.

In this work, the identification of genes that encode proteins PYR/PYL/RCAR and phosphatase 2C of group A in *Armeria welwitschii*, was based on sequence analysis of these proteins and the corresponding nucleotide sequence of species such as *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Populus trichocarpa* and *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* to allow the design of degenerate primers.

The sequences were aligned and the conserved areas were considered for the design of degenerate primers. Amplification was performed using cDNA obtained by reverse transcription of total RNA extracted from *Armeria welwitschii*.

By reamplification of the product in a first reaction and after cloning of amplification products, it was shown that a sequence of cDNA had a high similarity to *Arabidopsis thaliana* PP2Cs.

Keywords: Abscisic acid (ABA), *Armeria welwitschii*, PYR/PYL/RCAR receptors, Type 2C phosphatases (PP2C), Water and salt stress , Degenerate primers, PCR, Cloning.

Resumo →Página xi

Abstract →Página vi

1. Introdução.

1.1.O Ácido abscísico (ABA): Uma hormona fundamental.

1.2.A análise genética de mutantes de *Arabidopsis thaliana* evidencia a importância de PP2C na sinalização ABA. →**Página 1.**

1.2.1.Fosfatases do tipo 2C pertencentes ao grupo A são reguladores negativos na sinalização ABA.→**Página 2.**

1.2.2.Fosfatases do tipo PP2C do grupo A estão bem conservadas em plantas não vasculares.→**Página 6.**

1.3.Quinases SnRK2 também participam na sinalização ABA. →**Página 8.**

1.4.As fosfatases do tipo 2C desfosforilam e inativam quinases SnRK2. →**Página 10.**

1.5.Quinases (SnRK2) são reguladores positivos da sinalização ABA e fosforilam fatores de transcrição. →**Página 11.**

1.6.Receptores ABA.

1.6.1.Identificação, localização e interação dos receptores PYR/PYL/RCAR. →**Página 12.**

1.6.2.Interação de receptores PYR/PYL/RCAR e PP2Cs, a problemática dos mutantes dominantes insensíveis. →**Página 14.**

1.6.3.A inibição da atividade de PP2C é dependente de uma dosagem específica de diferentes receptores PYR/PYL. →**Página 15.**

1.6.4.Modelo de sinalização ABA. →**Página 16.**

1.7.*Armeria welwitschii*. →**Página 17.**

2. Objetivos. →Página 21.

3. Metodologia.

3.1.Identificação e análise de proteínas ortólogas de PP2C e PYR/PYL de *Arabidopsis thaliana* em diferentes plantas.

3.2.Extração de RNA e síntese de cDNA.

3.2.1.Extração de RNA com TRIzol. →**Página 25.**

3.2.2. Tratamento do RNA total com DNase.

3.3. Transcrição reversa.

→Página 26.

3.4. Desenho de primers degenerados.

→Página 27.

3.5. Amplificação e purificação de fragmentos de interesse.

3.5.1. Condições de amplificação.

3.5.2. Separação e recuperação de fragmentos. →Página 28.

3.5.3. Purificação e aumento da concentração dos produtos de PCR.

3.6. Clonagem.

3.6.1. Ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem.

3.6.2. Transformação em células competentes.

→Página 29.

3.7. Sequenciação e análise das sequências obtidas.

→Página 30.

4. Resultados.

4.1. Extração de RNA.

4.2. Desenho de primers degenerados.

4.2.1. Alinhamento da sequência de proteínas PYR/PYL/RCAR e desenho dos respectivos primers.

→Página 33.

4.2.2. Alinhamento de proteínas fosfatases do tipo 2C e desenho dos respectivos primers.

→Página 34.

4.3. Sequências de primers degenerados e fragmentos esperados.

4.3.1. Recetores PYR/PYL/RCAR.

→Página 37.

4.3.2. Fosfatases do tipo 2C do grupo A.

→Página 38.

4.4. Produtos de PCR obtidos.

→Página 39.

4.5. Clonagem e sequenciação dos produtos de PCR obtidos.

→Página 42.

5. Discussão e Conclusão.

→Página 47.

6. Perspetivas futuras.

→Página 53.

7. Referências bibliográficas.

→Página 57.

Lista de Figuras:

Figura 1.1 – Comparação entre as proteínas ABI1 e ABI2 dando ênfase à substituição Gly-por-Asp nos mutantes *abi1* e *abi2* perto do centro de coordenação AVLCRGKT.

Figura 1.2 – Diversidade de fosfatases do tipo 2C de *Arabidopsis thaliana* inseridas em diferentes grupos (A-J).

Figura 1.2 – Árvore filogenética de MpABI1, PpABI1, PpABI2 (musgo) e ABI1 (*Arabidopsis thaliana*). Alinhamentos dependentes do algoritmo Clustal W.

Figura 1.3 – Evolução dos componentes intervenientes na sinalização ABA.

Figura 1.5 – Árvore filogenética referente à superfamília de quinases CDPK/SnRK em *Arabidopsis thaliana*, baseando-se no alinhamento de domínios catalíticos.

Figura 1.6 – Árvore filogenética composta por sequências de aminoácidos das quinases pertencentes à família SnRK2 de espécies como *Oryza Sativa* e *Arabidopsis thaliana*.

Figura 1.4 – Árvore filogenética de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana* composta por 14 membros segundo o estudo realizado por Ma Y. *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009 e Santiago *et al.*, 2009.

Figura 1.8 – Mudanças na conformação do recetor na presença/ausência de ABA e posterior ancoragem a PP2C. O resíduo de prolina (a azul) é conservado e demonstra a importante função da ancoragem do recetor à fosfatase do tipo 2C.

Figura 1.5 – Diferenças no modelo de sinalização ABA na presença de wildtype (A) e um mutante insensível dominante (B).

Figura 1.6 – Modelo de sinalização ABA em condições normais.

Figura 1.7– Modelo de sinalização ABA em condições de stress.

Figura 1.12 – Modelo de sinalização ABA em condições de stress na presença do mutante *abi1-1* que confere insensibilidade a ABA.

Figura 4.1 – Zonas conservadas obtidas no alinhamento de sequências de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Physcomitrella patens* utilizadas no desenho dos primers PYR_Fw1 (A), PYR_Fw2 (B), PYR_Rev1 (C) e PYR_Rev2 (D).

Figura 4.2 – As Fosfatases do tipo 2C do grupo A das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffii* e *Physcomitrella patens* apresentam dois ramos distintos.

Figura 4.3 – Zona conservada considerada para o desenho do primer degenerado PP_Fw1-II.

Figura 4.4 – Zona conservada considerada para o desenho do *primer* degenerado PP_Fw2-I.

Figura 4.5 – Zonas conservadas consideradas para o desenho dos *primers* degenerados PP_Fw2 (A), PP_Rev2 (B) e PP_Rev1 (C).

Figura 4.6 – Gel de agarose que demonstra amplificação a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* e posterior reamplificação. Amplificação com PP_Fw2-I/PP_Rev1 (A) e PP_Fw1-II/PP_Rev1 (B). Reamplificação a partir dos produtos obtidos em A e B com os pares de primers PP_Fw2-I/PP_Rev1 (C e D). M-Marcador.

Figura 4.7 – Gel de agarose que demonstra a amplificação a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* e posterior reamplificação com as combinações de primers específicos de PP2Cs. Amplificação com PP_Fw2-I/Rev1 (A) e PP_Fw1-II/Rev1 (B). Reamplificação com PP_Fw2-I/PP_Rev2 (A1); PP_Fw2-I/PP_Rev1 (A2); PP_Fw2/PP_Rev2 (A3); PP_Fw2/PP_Rev1 (A4); PP_Fw1-II/PP_Rev2 (B1); PP_Fw1-II/PP_Rev1 (B2); PP_Fw2/PP_Rev2 (B3) e PP_Fw2/PP_Rev1 (B4). M-marcador.

Figura 4.8 – Gel de agarose que demonstra a amplificação a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* e posterior reamplificação com as combinações de primers específicos para PYR/PYL/RCAR. Amplificação com PYR_Fw1/PYR_Rev2 (A) e reamplificação com PYR_Fw1/PYR_Rev1 (B); PYR_Fw1/PYR_Rev2 (C); PYR_Fw2/PYR_Rev1 (D) e PYR_Fw2/PYR_Rev2 (E). M-marcador.

Figura 4.9 – Gel de agarose que demonstra a tentativa de amplificação em *Armeria welwitschii* com a multiplicidade de primers degenerados. A amplificação apenas ocorre com o par de primers PP_Fw2-I/PP_Rev1 (A e B).

Figura 4.10 – Gel de agarose que demonstra a forte amplificação através do par de *primers* PP_Fw2-I/PP_Rev1.

Figura 4.11 – A sequência parcial (Seq1) de *Armeria welwitschii* apresenta elevada semelhança com fosfatases do tipo 2C do grupo A.

Lista de Tabelas:

Tabela 1 – *Primers* degenerados *obtidos* tendo em conta o alinhamento de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana* e ortólogos *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa* (Tm – *melting temperature*).

Tabela 2 – *Primers* degenerados obtidos pelo alinhamento de proteínas PYR/PYL /RCAR de *Arabidopsis thaliana* e ortólogos *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa*, *Physcomitrella patens* e *Selaginella moellendorffii* (Invitrogen).

1.1. O Ácido abscísico (ABA): Uma hormona fundamental.

Nos Estados Unidos, o grupo liderado por Ohkuma ao estudar em algodão compostos que promoviam a abscisão das folhas identificou um composto, que foi denominado abscisina II, e que provou ser também eficiente na inibição do crescimento de aveia (Ohkuma *et al.* 1963). Pouco tempo depois, outro grupo, liderado por Conforth, na tentativa de encontrar compostos envolvidos na dormência de gemas axilares, isolou um composto presente em folhas de sicómoro, a que chamaram dormina. Este composto mostrou ser um eficiente inibidor da germinação em embriões de trigo. Posteriormente verificou-se que abscisina II e dormina eram o mesmo composto e foi adotada a designação de ácido abscísico (Conforth *et al.*,1965).

Como organismos sésseis, as plantas têm que rapidamente reconhecer e adaptar-se a mudanças ambientais repentinas. O ácido abscísico é uma hormona ubíqua em todas as plantas superiores e que tem um papel fundamental na resposta ao stress ambiental (em particular o causado pela seca, salinidade e frio) participando também no controlo de vários aspectos cruciais do crescimento e desenvolvimento (Giraudat *et al.*,1994).

Em particular, o stress hídrico nas plantas, que se deve principalmente a condições de seca e salinidade extremas, causa o aumento dos níveis de ácido abscísico. Este aumento é determinante na ativação dos mecanismos que permitem reduzir a perda de água pelos estomas (Ward *et al.*, 1995), e é também determinante na inibição das fases de transição embriogénica para germinativa, germinativa para vegetativa e vegetativa para a reprodutiva, fundamentais para a progressão do ciclo de vida de uma planta. (Finkelstein *et al.*, 2002).

A análise genética de mutantes com uma resposta alterada a ABA permitiu a identificação de vários dos componentes da via de sinalização desta hormona. Muitos destes componentes participam em eventos de fosforilação/desfosforilação que são mecanismos comuns em todos os organismos vivos e participam no controlo de inúmeros processos celulares, entre os quais, estão envolvidas proteínas fosfatase e quinase (Leung and Giraudat, 1998).

1.2. A análise genética de mutantes de *Arabidopsis thaliana* evidencia a importância de PP2C na sinalização ABA.

Os primeiros rastreios para identificação de mutantes com sensibilidade alterada a ABA foram efetuados com sementes de *Arabidopsis thaliana* tratadas com agente mutagénico metanosulfonato de etilo. A germinação destas sementes em concentrações variáveis de ABA permitiu a identificação de mutantes que apresentam reduzida dormência

da semente mas com sintomas de maior perda de água e murchar da planta em condições desfavoráveis. Estes mutantes apresentam, portanto, um fenótipo de insensibilidade a ABA comparativamente a plantas silvestres (WT- *wildtype*) e foram denominados *abi* (*abscisic acid insensitive*) 1 a 5 (Koorneeff *et al.*, 1984).

O gene *ABI1* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1*) foi clonado a partir de *Arabidopsis thaliana* por análise molecular de um mutante (*abi1-1*) insensível a ABA (Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994). *ABI1* codifica para uma proteína de 434 aminoácidos caracterizada por possuir dois domínios: o N-terminal, sem qualquer similaridade com proteínas conhecidas e o C-terminal, pertencente a um grupo de proteínas fosfatase serina/treonina do tipo 2C (PP2C) (Leung and Giraudat, 1996). O gene *ABI2* codifica igualmente uma PP2C que apresenta um elevado grau de semelhança com *ABI1*. O mutante *abi1-1* possui uma substituição Gly-para-Asp na posição 180 que, de acordo com os estudos iniciais, causa uma acentuada redução da atividade da fosfatase. O mesmo se verifica no mutante *abi2-1* com substituição Gly-para-Asp na posição 168. A substituição ocorre em posições equivalentes da zona catalítica das proteínas *ABI1* e *ABI2*, mais especificamente perto do centro de coordenação de Mg²⁺ (Figura 1.1) (Rodriguez *et al.*, 1998).

```

ABI2 1 MDEVSPAVAVPFRPFTDPH...AGLR...GYC.....NGESRVTL 34
      |:|||||:| |||||:| |:| ||| ||: |||
ABI1 1 MEEVSPAIAGPFPRPFSETQMDFTGIRLGKGYCINNQYSNQDSENGDLMVSL 50

      35 PE.SSCSGDGAMKDSS.....FEINTRQDSLTSSSSA.MAGVDISAGDEI 77
      || |||| |. | | || | |. |. |. | |||||
      51 PETSSCSVSGSHGSESRKVLISRINSPNLNMKESAAADIVVVDISAGDEI 100

      78 NGSDEFDPRSMNQSEKKVLSRTERSRSLFEFKCVPLYGVTSICGRRPEMED 127
      |||| | |||:| ||||| |||| | |||||
      101 NGSD.....VTSEKKMISRTERSRSLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMED 143

                                          G168D in abi2
      128 SVSTIPRFLQVSSSLDGRVTNGFNPHLSAHFFGVYDGHGSSQVANYCR 177
      .||||| || | ||| | |. |. |. | |||||
      144 AVSTIPRFLQSSSGSMLDGR...FDPQSAAHFFGVYDGHGSSQVANYCR 189
                                          G180D in abi1

      178 ERMHLALTEEIVKEKPEFCDGDWTQEKWKALFNFMRVDSIEITVAHAP 227
      ||||| || | ||| | |||| | |||||:| ||||| | ||
      190 ERMHLALAEIAKEKPLCDGDTWLEKWKALFNFLRVDSEIESV..AP 237

      228 ETVGSTSVVAVVFPPTHIFVANCSDSPAVLCRGKPLALSVDHKPPDRDEA 277
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      238 ETVGSTSVVAVVFPSSHIFVANCSDSPAVLCRGKTALPLSVDHKPPDREDEA 287

      278 ARIEAAAGKVIQWNGARVFGVLA MSRSIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRVK 327
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      288 ARIEAAAGKVIQWNGARVFGVLA MSRSIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVK 337

      328 EDDCLILASDGLWDMVTNEEVCDLARKRILLWHKKNAMAGEA.LLPAEKR 376
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      338 EDDCLILASDGVWDMTDEEACEMARKRILLWHKKNVAGDASLLADERR 387

      377 GEGKDPAAMSAAEYLSKMALQKSKDNI SVVVVDLKGIRKFKSKSLN 423
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      388 KEGKDPAAMSAAEYLSKLAIQKSKDNI SVVVVDLKPRRKLKSKPLN 434

```

Figura 1.8 – Comparação entre as proteínas *ABI1* e *ABI2* dando ênfase à substituição Gly-para-Asp nos mutantes *abi1* e *abi2* perto do centro de coordenação AVLRCGKT (Rodriguez *et al.*, 1998).

1.2.1. Fosfatases do tipo 2C pertencentes ao grupo A são reguladores negativos na sinalização ABA.

As fosfatases a nível geral dividem-se em duas grandes classes: proteína Tirosina (PTP's) e serina/treonina que são classificadas nas famílias de fosfatases M (PPM's) e fosfatases P (PPP). A família PPP inclui as fosfatases do tipo 1 (PP1), 2A (PP2A) e 2B (PP2B), enquanto a família PPM inclui as fosfatases do tipo 2C (PP2C) e piruvato desidrogenase. No genoma de *Arabidopsis thaliana* foram identificadas 112 fosfatases, das quais 76 são do tipo 2C (PP2C), caracterizadas em 10 grupos de A-J (Figura 1.2). (Schweighofer *et al.*, 2004).

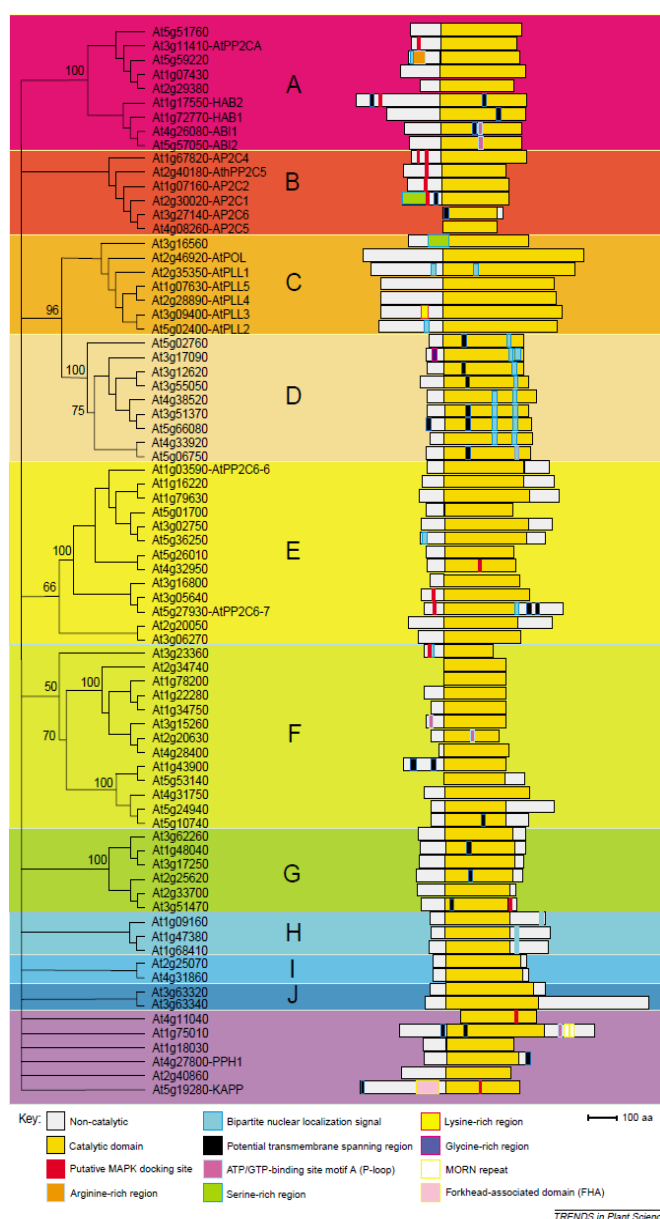


Figura 1.9 – Diversidade de fosfatases do tipo 2C de *Arabidopsis thaliana* inseridas em diferentes grupos (A-J) (Schweighofer *et al.* 2004).

Dos 10 grupos, o grupo A é constituído por 9 fosfatases das quais pelo menos 6 (ABI1, ABI2, PP2CA/AHG3, AHG1, HAB1 e HAB2) têm um papel importante na sinalização de ABA. (Gosti *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001; Saez *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2006b; Saez *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2007).

O fenótipo dos mutantes *abi1-1* e *abi2-1* demonstram claramente a participação deste grupo de fosfatases do tipo 2C na sinalização ABA. Os dados inicialmente existentes que apontavam para uma pronunciada diminuição da atividade fosfatase destas proteínas mutadas, conjuntamente com o fenótipo de insensibilidade a ABA apresentado por estes mutantes sugeriam que as PP2C poderiam funcionar como reguladores positivos da resposta a ABA.

Contudo, vários estudos posteriores pareciam indicar um papel como reguladores negativos. O rastreio de linhas mutantes em fundo *abi1-1* permitiu a identificação de vários mutantes secundários (mutantes que para além da mutação *abi1-1* apresentavam uma outra mutação nesse gene) permitiu a identificação e caracterização de mutantes recessivos de perda de função *abi1-1R1* a *abi1-1R7*). Um rastreio semelhante em fundo *abi2-1* permitiu a identificação do mutante *abi2-1R1*. Estes mutantes tinham perdido o fenótipo de insensibilidade a ABA, característico do fundo em que tinham sido produzido, e exibiam maior sensibilidade que WT, apresentando uma maior inibição da germinação e crescimento da raiz quando aplicado ABA exógeno. Estas novas mutações (*abi1-1R1* a *abi1-1R7* *abi2-1R2*) dão origem a proteínas com reduzida ou nula atividade fosfatase e esses mutantes apresentam um fenótipo de hipersensibilidade a ABA, o que sugere que ABI1 e ABI2 são reguladores negativos na resposta a ABA. (Gosti *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001).

O papel das PP2Cs do grupo A como reguladores negativos da sinalização de ABA fica definitivamente estabelecido com a identificação e caracterização de outras de outras proteínas deste grupo bem como pela análise genética dos respetivos mutantes. A proteína codificada pelo gene AtP2C-HA de *Arabidopsis thaliana*, é composta por 511 aminoácidos, é regulada na presença de ABA e apresenta elevado grau de semelhança com ABI1 e ABI2 (Rodriguez *et al.*, 1998b) pelo que foi incluída na família de fosfatases do tipo 2C grupo A tendo sido posteriormente, devido ao fenótipo dos mutantes de perda de função, denominada de HAB1 (*HYPERSENSITIVE TO ABA 1*). Um quinto cluster contém PP2Cs como ABI1, ABI2, HAB1 e uma fosfatase desconhecida At1g17550. Alinhamentos demonstram 75% de homologia entre HAB1 e At1g17550, e 60% entre as quatro proteínas e At1g17550, sendo esta proteína desconhecida denominada de HAB2 (*HYPERSENSITIVE TO ABA2*). A fusão de GFP ao promotor de HAB1 permitiu corroborar dados obtidos por Rodriguez (1998b), ou seja, existe expressão de Pro_{HAB1}:GFP em toda a planta (epiderme do cotilédono, células guarda, semente, embrião, raiz e folha) e deste modo HAB1 é regulado por ABA. Em comparação com wildtype, a expressão de HAB1 através do

promotor 35S demonstra insensibilidade a ABA, mas não tão acentuada como o mutante dominante e insensível *abi2-1*. Os diferentes graus de insensibilidade de 35S:HAB1 e *abi2-1* são apresentados pelo aumento da transpiração com perda do peso fresco da planta, o rápido crescimento da raiz e desenvolvimento proeminente da germinação. O desenvolvimento de um mutante knockout (*hab1-1* hipersensível), demonstra expressão na presença de ABA e em comparação com plantas wildtype a dormência na germinação por parte do mutante é elevada. O ganho de função e perda de função de fosfatases PP2C, permite afirmar o seu papel como regulador negativo na sinalização ABA (Saez *et al.*, 2004).

O isolamento de quatro mutantes *ahg* (*ABA-hypersensitive germination*) demonstra inibição da germinação na presença de ABA. Testes germinativos demonstram germinação por parte do mutante insensível *abi1-1* na presença de 5µM de ABA, e em semelhantes condições verifica-se a inibição da germinação dos mutantes (*ahg1*, *ahg2*, *ahg3* e *ahg4*) hipersensíveis. O estabelecimento de duplos mutantes através do cruzamento de *abi1-1* com cada um dos quatro mutantes revela desenvolvimento da germinação, o que demonstra a forte dominância do mutante *abi1-1*. Contudo os mutantes *ahg3* e *ahg1* são os que mais oferecem resistência à dominância causada pelo mutante *abi1-1* (Nishimura *et al.*, 2004).

Os genes AHG3 e AHG1 foram identificados através dos mutantes hipersensíveis *ahg3* e *ahg1* respetivamente. Partilham das mesmas características, das quais, a forte expressão em semente e por se inserirem no mesmo ramo do grupo A de fosfatases 2C. Ambos demonstram, capacidade de funcionar em sinergia, contudo com funções diferentes. AHG1 é expressa no embrião enquanto AHG3 é expressa em meristemas e feixes vasculares (Yoshida *et al.*, 2006b; Nishimura *et al.*, 2007).

O estabelecimento de mutantes knockout, alelos de ABI1 (*abi1-2*, *abi1-3* hipersensíveis) e o mutante *hab1-1* (também hipersensível) permitiu a elaboração de duplos mutantes (*hab1-1 abi1-2* e *hab1-1 abi1-3*). Os duplos mutantes demonstram na presença de ABA inibição da germinação, redução da perda de água por transpiração, diminuição do crescimento vegetativo, eficiente fecho estomático, assim como, expressões de genes responsáveis pela resposta ABA. O conceito de regulação negativa para ABI1 e HAB1 é portanto inequívoco e a cooperação entre ambos aumenta a performance da planta face a questões de stress hídrico (Saez *et al.*, 2006).

A multiplicidade de fosfatases (HAB1, ABI1, ABI2 e PP2CA) que regula a sinalização ABA demonstra um mecanismo versátil. A múltipla regulação foi comprovada pelos mutantes simples (*hab1-1*, *abi1-2* e *pp2ca-1*) duplos (*hab1-1abi1-2*, *hab1-1pp2ca-1* e *abi1-2pp2ca-1*) e triplos (*hab1-1 abi1-2 pp2ca-1* e *hab1-1 abi1-2 abi2-2*), assim como, o diferente grau de hipersensibilidade obtido na presença de ABA exógeno. Os triplos mutantes necessitam de uma quantidade muito baixa de ABA (na ordem dos nM) para inibir o crescimento e germinação. Mutantes knockout *abi1-2* e *abi2-2* hipersensíveis demonstram

inibição da germinação, reduzido crescimento e fecho estomático, por outro lado, o duplo mutante *abi1-1 abi2-2* comporta-se de forma contrária, pois *abi1-1* é dominante e insensível. (Rubio *et al.*, 2009).

Três genes (At5g59220, At1g07430 e At2g29380) codificam para fosfatases do tipo 2C denominadas HAI1, HAI2 e HAI3 (*HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENES*) e são fortemente reguladas por ABA na fase vegetativa. A fraca expressão destas fosfatases é conferida pelos dois triplos mutantes (*srk2d/e/i*; *areb1/areb2/abf3*) na presença de ABA (Fujita *et al.*, 2009). Estas três novas fosfatases pertencem ao grupo A, onde se inserem as fosfatases (ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, AHG1 e AHG3) descritas e referenciadas anteriormente (Schweighofer *et al.*, 2004).

1.2.2. Fosfatases do tipo PP2C do grupo A estão bem conservadas em plantas não vasculares.

A expressão ectópica do mutante *abi1-1* de *Arabidopsis thaliana* (angiospérmica) em *Physcomitrella patens* (briófita) reduz a sensibilidade a ABA exógeno e reduz a tolerância ao stress abiótico. Deste modo a presença de PP2Cs na regulação da sinalização ABA em *Physcomitrella patens* é inequívoca. Mais de 51 genes codificam para PP2Cs em *Physcomitrella patens* e possuem um domínio catalítico conservado. O alinhamento do domínio catalítico de PP2Cs de *Arabidopsis thaliana* e *Physcomitrella patens* demonstra a presença de 2 genes (PpABI1A e PpABI1B) semelhantes a ABI1. Estes genes são ativados por ABA exógeno o que indica a tolerância ao stress osmótico por parte de *Physcomitrella patens*. O estabelecimento do mutante *ppabi1a* hipersensível induz a expressão de genes, inibe o crescimento do protonema e exhibe tolerância ao frio na presença de ABA ao contrário de wildtype. A regulação negativa dada por fosfatases do tipo 2C, em espécies evolutivamente distantes encontra-se conservada (Komatsu *et al.*, 2009).

Com o aumento da concentração de ABA, o gametófito de *Marchantia polymorpha* (briófita-hepática) apresenta um decréscimo do peso fresco/seco, o que indica a presença de um mecanismo de sinalização ABA. MpABI1 (proteína com 568 aminoácidos) exhibe similaridade com ABI1, o mesmo grupo em que estão inseridas as fosfatases ABI1, ABI2, HAB1, HAB2 e PP2CA de *Arabidopsis thaliana* e fosfatases PpABI1A e PpABI1B de *Physcomitrella patens* (Figura1.3).

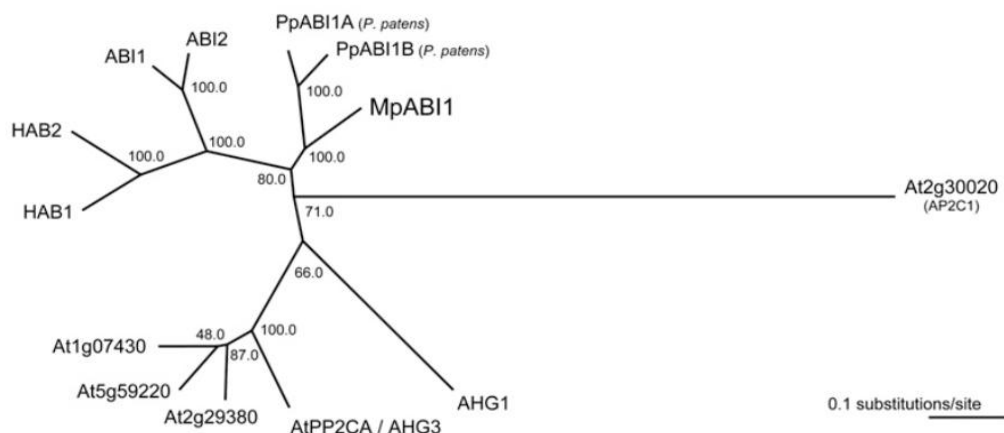


Figura 1.10 – Árvore filogenética de MpABI1, PpABI1, PpABI2 (musgo) e ABI1 (*Arabidopsis thaliana*). Alinhamentos dependentes do algoritmo Clustal W. (Tougan et al.2010).

A fosfatase MpABI1 demonstra afinidade por cátions bivalentes Mg^{2+} e Mn^{2+} e a mutação com substituição Gly-por-Asp na posição 298 influencia a redução da atividade como acontece com o mutante insensível *abi1-1*. A fusão de GFP com MpABI1 permite esclarecer a sua principal função no núcleo e ligeiramente no citoplasma. A sobreexpressão do gene que codifica para a fosfatase MpABI1 é demonstrada pela insensibilidade na presença de ABA. MpABI1 é similar a ABI1 e ambas partilham a regulação negativa na sinalização ABA, assim como, esta regulação se encontra conservada em espécies filogeneticamente distantes (Tougan *et al.*, 2010).

A conquista do meio terrestre foi possível devido à capacidade de aquisição de um mecanismo de tolerância à seca, visto que a falta de água é um dos principais problemas de adaptação. O mecanismo de sinalização presente em *Marchantia polymorpha* e *Physcomitrella patens* é a prova viva da capacidade que tipo de plantas (não vasculares) tem de colonizar o meio terrestre e possibilitar exposição a condições de seca. (Figura 1.4).

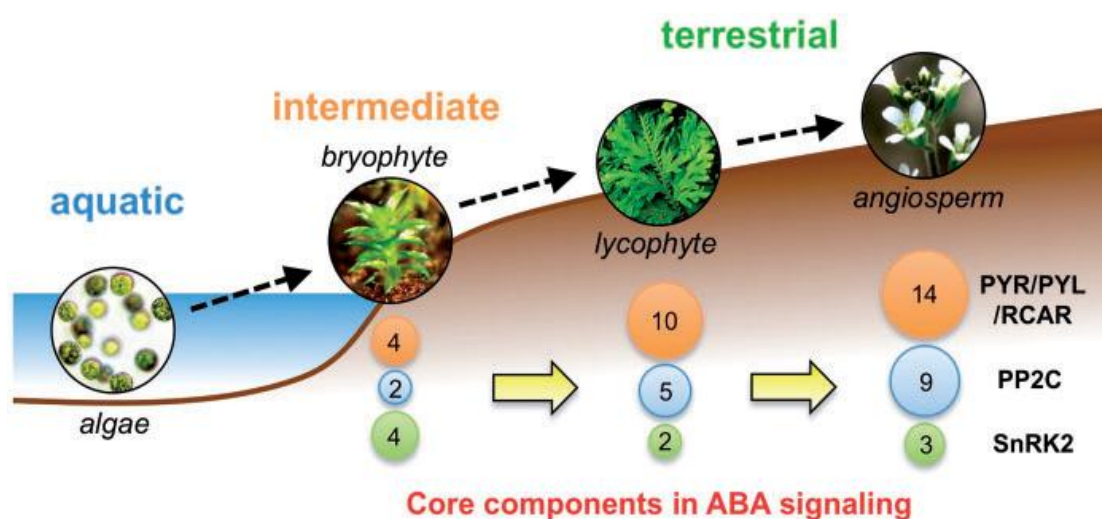


Figura 1.11 – Evolução dos componentes intervenientes na sinalização ABA (Umezawa et al., 2010).

Como prova evolutiva é visível a conservação de intervenientes na sinalização ABA (PP2C, SnRK2 e PYR/PYL/RCAR) à medida que se migra do ambiente intermédio para o terrestre (Umezawa *et al.*, 2009). A disponibilidade de água poderá ser o fator chave que originou o aumento do número de componentes da sinalização ABA.

1.3. Quinases SnRK2 também participam na sinalização ABA.

A quinase PKABA1 é proveniente do trigo e está envolvida na sinalização ABA por demonstrar tolerância à dessecação, favorecer dormência da semente, assim como, suprimir genes indutores de giberelinas essenciais à pós-germinação. Esta quinase insere-se no grupo de quinases serina/treonina, SNF1 (yeast sucrose non-fermenting protein kinases) (Gomez-Cadenas *et al.*, 1999).

A proteína AAPK (ABA-Activated Protein Kinase) de *Vicia faba* é ativada na presença de ABA e demonstra estar envolvida na regulação dos estomas. Esta regulação foi comprovada pela substituição do aminoácido Lisina-por-Alanina na posição 43 da quinase AAPK. O mutante AAPK (K43A) insensível na presença de ABA induz o fecho dos estomas. (Li *et al.*, 2000).

O gene OST1 (OPEN STOMATA 1) codifica para uma proteína de 362 aminoácidos de massa molecular de 41kDa. É uma proteína quinase serina/treonina e possui uma região N-terminal (1-297aminoácidos) que apresenta um domínio catalítico conservado. OST1 foi isolado em *Arabidopsis thaliana* pela semelhança que tem com o gene AAPK presente em *Vicia faba*. Além de OST1 em *Arabidopsis thaliana*, outras 9 quinases partilham da mesma semelhança e foram denominadas OSKL (OST1 kinase-like proteins) pertencendo à subfamília2, SNF1 de proteínas quinase (SnRK2) mencionadas por Hardie (1999).

Mutantes (*ost1-1* e *ost1-2*), tendo como referencia plantas wildtype vistos através de termografia de infravermelho exibem ao nível das folhas a diferença de 1°C. A perda de peso fresco por parte dos mutantes combina com a excessiva transpiração da planta e consequente perda de água pelos estomas. De forma análoga, e na presença de ABA os mutantes apresentam um fenótipo semelhante, os estomas permanecem abertos e não reagem ao estímulo. Tal como *ost1*, o mutante insensível *abi1-1* na presença de ABA demonstra baixa produção de ROS e os estomas permanecem abertos, de modo contrário acontece com as formas nativas ABI1 e OST1, na presença de ABA ROS são produzidos e os estomas fecham. OST1 é portanto um regulador positivo e demonstra regulação antagónica a ABI1 (Mustilli *et al.*, 2002).

Paralelamente, outro grupo de investigação isolou proteínas quinase de 44kDa em células T87 provenientes de *Arabidopsis thaliana* provando estar envolvidas na resposta a ABA (Yoshida R., 2002), assim como outros autores referenciam proteínas de peso

molecular semelhante (Anderberg and Walker-Simmons, 1992; Gomez-Cadenas *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000) quer pela fosforilação de fatores de transcrição ABRE (Uno *et al.*, 2000).

Nove genes encontrados através da base de dados de *Arabidopsis thaliana* pertencem à subfamília2 de quinases (SnRK2) e foram denominados de SRK2A a SRK2I. A proteína SRK2E é especialmente ativada por ABA, mas o knockout (*srk2e*) do gene que a traduz, exibe abertura estomatal elevada na presença de ABA, o murchar de folhas em condições de baixa humidade, assim como, a acentuada perda de água a que está associado, mas não demonstra, mudanças na germinação comparando com plantas wildtype (Yoshida R., 2002). O fenótipo exibido pelo mutante *srk2e* não é tão pronunciado como o mutante *abi1-1* (Yoshida R., 2002) mas assemelha-se ao comportamento do mutante *ost1* já mencionado anteriormente (Mustilli *et al.*, 2002).

O genoma de *Arabidopsis thaliana* possui 36 SnRKs das quais 10 (SnRK2.1 a SnRK2.10) pertencem a SnRK2 (SNF1-related protein kinase2) (Figura 1.5) (Hrabak *et al.*, 2003).

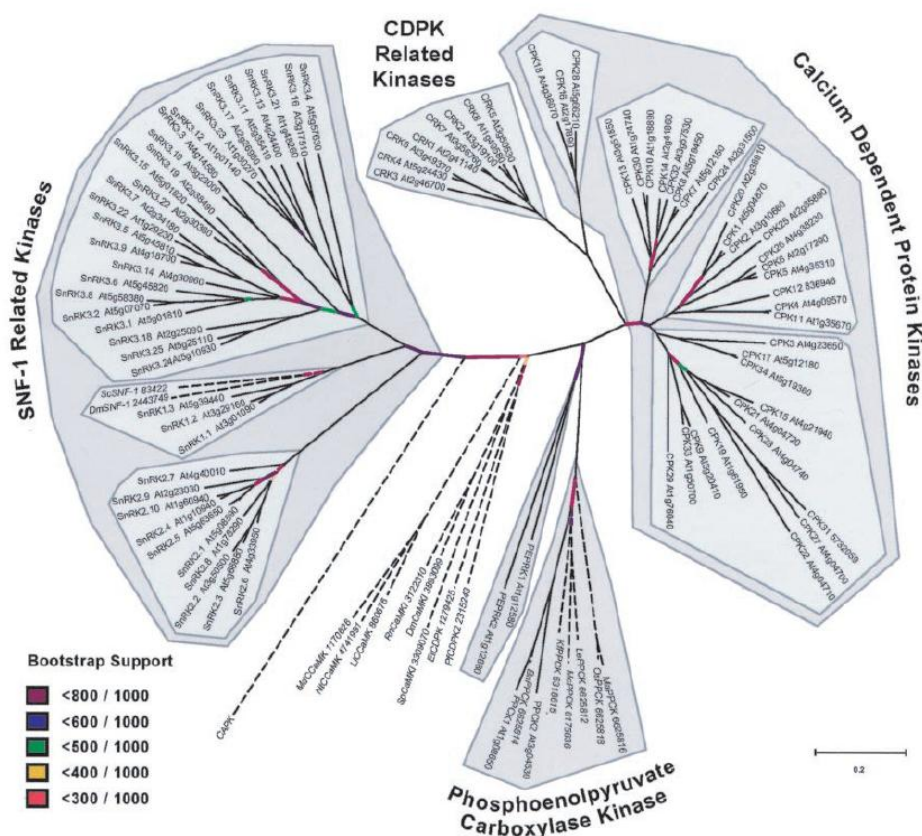


Figura 1.12 – Árvore filogenética referente à superfamília de quinases CDPK/SnRK em *Arabidopsis thaliana*, baseando-se no alinhamento de domínios catalíticos (Hrabak *et al.*, 2003).

Existem também 10 SnRK2 (SAPK1 a SAPK10) em arroz (*Oryza sativa*) das quais SAPK8, SAPK9 e SAPK10 pertencem à subclasse III de quinases, assim como SnRK2.2, SnRK2.3, e SnRK2.6 em *Arabidopsis thaliana* (Figura 1.6) (Kobayashi *et al.*, 2004).

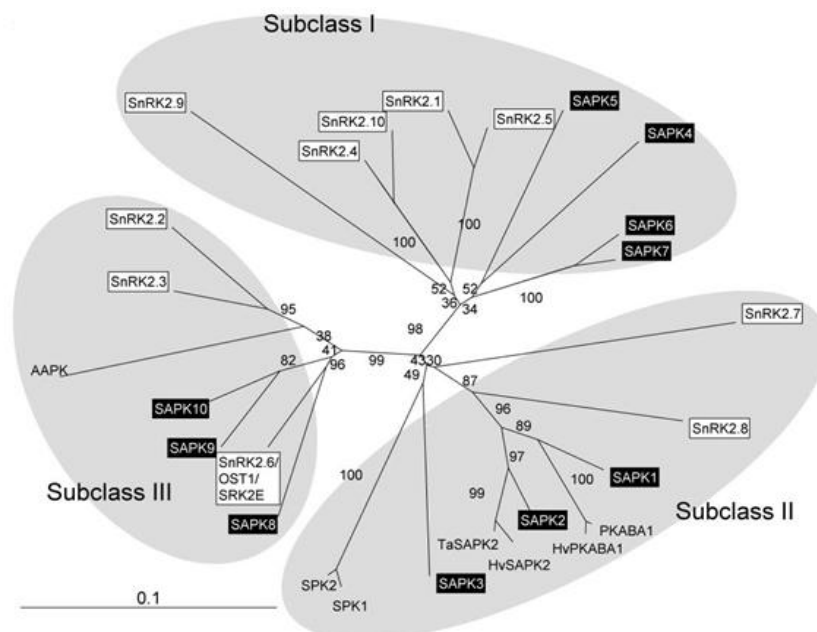


Figura 1.13 – Árvore filogenética composta por seqüências de aminoácidos das quinases pertencentes à família SnRK2 de espécies como *Oryza Sativa* e *Arabidopsis thaliana* (Kobayashi *et al.* 2004).

A nível geral as SnRK2 estão categorizadas em 3 subclasses e encontram-se conservadas ao nível das plantas superiores. A quinase SRK2E (Yoshida R. *et al.*, 2002) é a mesma que SnRK2.6 (Hrabak *et al.*, 2003) e OST1 (Mustilli *et al.*, 2002).

A quinase SRK2C/Snrk2.8 é uma proteína que é ativa quando submetida ao stress osmótico. A função de regulador positivo pode ser explicado pela sobreexpressão da quinase. Os dois mutantes *srk2c-1* e *srk2c-2* demonstram hipersensibilidade a ABA, exibindo redução do crescimento da raiz mas não no fecho dos estomas em condições de dessecação (Umezawa *et al.*, 2004).

1.4. As fosfatases do tipo 2C desfosforilam e inativam quinases SnRK2.

A interação entre ABI1 e o domínio II da quinase SRK2E/OST1/SnRK2.6 foi comprovado através do ensaio de dois híbridos em levedura (Yoshida *et al.*, 2006; Umezawa *et al.*, 2009).

HAB1, assim como o mutante *hab1^{G246D}* desfosforilam a quinase OST1 na presença de ABA e a confirmação é demonstrada pelo decréscimo da atividade da quinase *in vitro*. A interação é exibida no núcleo e citoplasma por fluorescência bimolecular em células de

tabaco, com confirmação a partir do teste de co-imunoprecipitação. Na presença de ABA, a quinase OST1 é ativada em plantas wildtype (Ler e Col), em mutantes knockout hipersensíveis *hab1-1*, *abi1-2* e mesmo no duplo mutante *hab1-1 abi1-2*, mas é inibida por mutantes insensíveis *abi1^{G180D}* e *abi2^{G168D}* (Vlad *et al.*, 2009). Outro grupo, por fluorescência bimolecular, demonstra interação entre a quinase SRK2D e a fosfatase HAI1 no núcleo e citoplasma de células da epiderme de cebola (Fujita *et al.*, 2009).

Através do ensaio de dois híbridos em levedura é possível verificar várias combinações na interação de fosfatases 2C do grupo A com quinases SnRK2 (Umezawa *et al.*, 2009). O grande problema recai no facto de mutantes insensíveis e dominantes *abi1-1* e *abi1-2* conferirem insensibilidade a ABA e mesmo assim possuem a capacidade de interagir com quinases SnRK2. O esclarecimento para este problema é dado pela identificação de recetores PYR/PYL/RCAR que será explicado adiante.

1.5. Quinases (SnRK2) são reguladores positivos da sinalização ABA e fosforilam fatores de transcrição.

O duplo mutante *srk2d srk2i* exhibe fenótipos de insensibilidade a ABA pela inibição da germinação e crescimento da raiz. O duplo mutante demonstra reduzida capacidade de fosforilar fatores de transcrição, o que indica que SRK2D e SRK2I estão envolvidos na ativação de fatores de transcrição ABF (ABA Response Element Binding Factor - ABRE), o que corrobora a função de regulação positiva na sinalização ABA (Fujii *et al.*, 2007).

O estabelecimento de mutantes simples (*srk2d*, *srk2e*, *srk2i*), duplos (*srk2d/e*, *srk2e/i*, *srk2d/i*) e triplo (*srk2d/e/i*) demonstram: perda da atividade, perda na capacidade de fosforilação de fatores de transcrição (bZIP), e como consequência, a perda de dormência ocorrendo defeitos durante o desenvolvimento da semente. A intensidade destes fenótipos é demonstrada à medida que se avança dos mutantes simples para o triplo. As quinases SRK2D, SRK2E e SRK2I estão portanto envolvidas na sinalização ABA pela fosforilação de fatores de transcrição ABI5 e AREB3 e permitem o desenvolvimento da semente e germinação (Nakashima *et al.*, 2009).

O fator de transcrição AREB1 é fosforilado por 5 proteínas quinase (SnRK2): SRK2C/SnRK2.8, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6, SRK2F/SnRK2.7 e SRK2I/SnRK2.3. As interações entre as quinases e o fator de transcrição são confirmados por fluorescência bimolecular no núcleo de células da epiderme da cebola. O triplo knockout dado pelo mutante *srk2d/e/i* demonstra reduzida tolerância à seca e elevada insensibilidade a ABA. As quinases SRK2D, SRK2E e SRK2I funcionam em sinergia e regulam positivamente fatores de transcrição com vista a propiciar eficiência germinativa, assim como, obter resposta ao stress hídrico durante a etapa vegetativa (Fujita *et al.*, 2009).

1.6. Recetores ABA.

FCA, ABAR/CHLH/GUN5 e GCR foram descritos como recetores ABA e foram referenciados como tendo localização no núcleo, cloroplasto e membrana plasmática respetivamente (Razem *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Uma grande controvérsia rodeia estes recetores visto que outros estudos poem em causa a sua função.

O recetor FCA, não demonstra ligação com ABA (Risk *et al.*, 2008) e o papel de GCR2 foi questionado na medida em que a perda de função dos mutantes *gcr1* e *gcr2* e o duplo mutante demonstram a mesma sensibilidade que wildtype a ABA (Gao *et al.*, 2007) e está em concordância com outro grupo que demonstra duplos (*gcr2 gcl1*, *gcr2 gcl2*, *gcl1 gcl2*) e triplo mutante (*gcr2 gcl1 gcl2*) com a mesma sensibilidade a ABA que wildtype na germinação e primeiras etapas do desenvolvimento da planta (Guo *et al.*, 2008). Foi confirmado também por ensaios que ABA não de liga GCR2 (Risk *et al.*, 2009).

ABAR/CHLH/GUN5 demonstra capacidade de regular a germinação, pós-germinação e movimento estomatal na presença de ABA (Shen *et al.*, 2006). Em cevada, XanF é possui elevada semelhança com Mg-Chelatase em *Arabidopsis thaliana* (82%), mas foi comprovado não ser um recetor ABA. Os mutantes demonstram a mesma resposta que wildtype relativo à germinação, crescimento pós-germinativo e abertura estomatal, indicando que Mg-Chelatase não é um recetor ABA (Mueller and Hansson, 2009). Em comparação com wildtype, mutantes *abar-2* e *abar-3* exibem diferenças na germinação e pós-germinação mas não no movimento estomatal o que indica uma nova evidência relativa à ligação de ABA a Mg-chelatase (Wu *et al.*, 2009).

Por outro lado os recetores G não são questionados. Dois recetores, GTG1 e GTG2, demonstram localização na membrana e ligam-se a GPA1 inibindo-os. O duplo mutante *gtg1-1 gtg2-1* exhibe insensibilidade a ABA e comprova a participação de GTG1 e GTG2 na sinalização ABA (Pandey *et al.*, 2009).

Os recetores PYR/PYL/RCAR são os que alegaram maior consistência em torno da sinalização ABA e permitiram explicar a problemática que envolve a regulação ABA na presença de mutantes dominantes e insensíveis como *abi1-1* e *abi1-2*.

1.6.1. Identificação, localização e interação dos recetores PYR/PYL/RCAR.

A procura de compostos químicos levou ao encontro de pyrabactin como agonista de ABA. O gene PYR1 (*PYRABACTIN RESISTANCE 1*) foi descoberto por análise genética baseada em pyrabactin. Em *Arabidopsis thaliana* existem 13 genes denominados Pyl1 a Pyl13 (semelhantes a PYR1), que codificam para uma a família de proteínas que oscila entre os 159-221 resíduos (Figura 1.7). Mutantes triplo (*pyr1;pyl1;pyl4*) e quadruplo

(pyr1;pyl1;pyl2;pyl4), exibem insensibilidade a ABA na germinação e crescimento acentuado da raiz. O ensaio de dois híbridos em levedura revelou a interação do recetor PYR1 com a fosfatase HAB1 em resposta a ABA (Park *et al.*, 2009), assim como foi confirmada a interação *in vivo* de PYL5 e HAB1 em folhas de tabaco com localização no núcleo e citosol através do teste de fluorescência bimolecular (Santiago *et al.*, 2009).

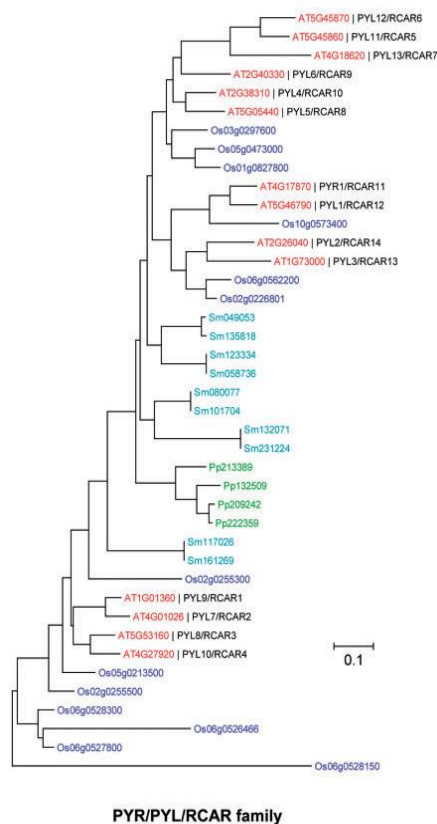


Figura 1.14 – Árvore filogenética de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana* composta por 14 membros segundo o estudo realizado por Ma Y. *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009 e Santiago *et al.*, 2009 (Umezawa *et al.*, 2010).

Outro grupo, pelo ensaio de dois híbridos em levedura demonstrou a ligação de proteínas a ABI2. A proteína (At1g01360.1) sem função definida, foi denominada RCAR1 (*REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR 1*) e pertence a uma família de proteínas com 14 membros em *Arabidopsis thaliana* (Figura 1.7), as mesmas descobertas por Park (2009). O fecho estomatal, dormência na germinação e no crescimento da raiz em resposta a ABA intensifica-se quando RCAR1 é sobreexpressado. O mutante é portanto hipersensível na presença de ABA (Ma Y. *et al.*, 2009).

Ambos os genes PYR1 e RCAR1 codificam para proteínas pertencentes à superfamília de proteínas START/Bet V e partilham entre si zonas conservadas que funcionam como um “bolso” hidrofóbico com afinidade para lípidos, hormonas e antibióticos (Radauer *et al.*, 2008).

1.6.2. Interação de recetores PYR/PYL/RCAR e PP2Cs, a problemática dos mutantes dominantes insensíveis.

Os mutantes $\text{PYR1}^{\text{S152L}}$ e $\text{PYR1}^{\text{P88S}}$ causam insensibilidade a pyrabactin reduzindo a interação com a fosfatase, por outro lado, o mutante insensível *abi2-1* não interage com o recetor. O mutante $\text{PYR1}^{\text{P88S}}$ liga-se a ABA contudo não se consegue ligar à fosfatase HAB1 (Park *et al.*, 2009), pois a substituição de prolina por serina na posição 88 do recetor PYR1 não permite a ancoragem à proteína fosfatase 2C (Figura 1.8) (Melcher *et al.*, 2009; Weiner *et al.*, 2009; Cutler *et al.*, 2010).

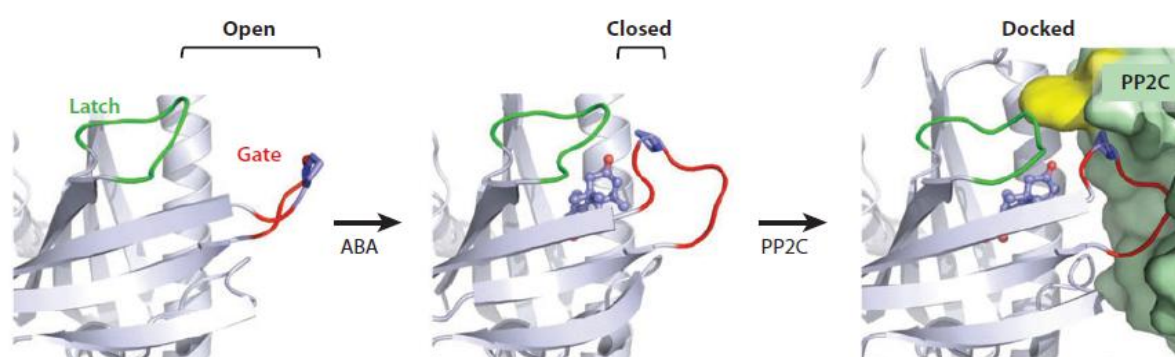


Figura 1.15 – Mudanças na conformação do recetor na presença/ausência de ABA e posterior ancoragem a PP2C. O resíduo de prolina (a azul) é conservado e demonstra a importante função da ancoragem do recetor à fosfatase do tipo 2C (Cutler *et al.*, 2009).

É necessário elevada concentração em ABA para o recetor insensível $\text{PYR1}^{\text{P88S}}$ para inibir a fosfatase PP2C ($\text{IC}_{50}=50\mu\text{M}$) enquanto para PYR1 é muito inferior ($\text{IC}_{50}=125\text{nM}$) (Park *et al.*, 2009). O complexo RCAR1-ABI2 é interrompido quando se sujeitam mutantes insensíveis *abi2-1* e *abi1-1*, por outro lado, ABI1 e ABI2 são inibidos por RCAR1 a concentrações de 60nM e 70nM de ABA, respetivamente (Ma Y. *et al.*, 2009).

A baixa atividade da quinase SnRK2 na presença do quadruplo mutante *pyr1;pyl1;pyl2;pyl4* é uma consequência direta da interação entre PP2Cs e SnRK2s (Park *et al.*, 2009), e a interação inexistente do mutante insensível e dominante $\text{hab1}^{\text{G246D}}$ com PYL5 (Santiago *et al.*, 2009) é provada pela interação com OST1 *in vivo* e consequente desfosforilação da quinase na presença do mesmo mutante (Vlad *et al.*, 2009).

Em condições de stress é produzido ABA endógeno na planta. Os recetores PYR/PYL/RCAR ligam-se a ABA e interage com PP2Cs para inibir a sua atividade. As quinases por sua vez são livres da regulação negativa dependente de PP2C e fosforilam fatores de transcrição bZIP como AREB/ABF ou proteínas membranares que envolvem canais iónicos. Em contraste, na presença de mutantes insensíveis e dominantes (como *abi1-1*), fogem ao controlo negativo dos recetores PYR/PYL/RCAR, resultando na inativação

de quinases SnRK2, mesmo na presença de ABA (Figura 1.9) (Santiago *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2010).

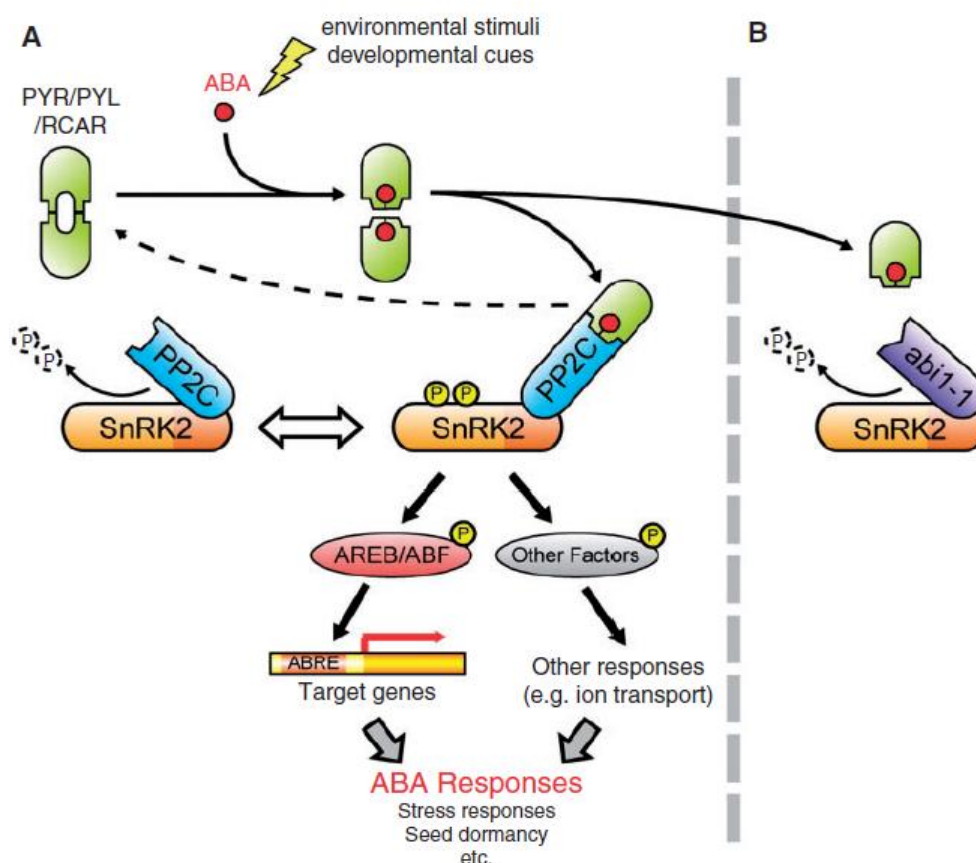


Figura 1.16 – Diferenças no modelo de sinalização ABA na presença de wildtype (A) e um mutante insensível dominante (B) (Umezawa *et al.*, 2010).

1.6.3. A inibição da atividade de PP2C é dependente de uma dosagem específica de diferentes recetores PYR/PYL.

O valor da concentração requerida para atingir 50% da atividade (IC_{50}) de HAB1 é dependente do tipo de recetor PYR/PYL.

Como exemplo:

- Para HAB1, valores de 35nM, 135nM, 188nM e 390nM na presença de PYL5, PYL8, PYL4 e PYR1 respetivamente.
- Para ABI2, valores de 115nM, 118nM, 110nM e 360nM na presença de PYL5, PYL8, PYL4 e PYR1 respetivamente.
- Para ABI1, valores de 123nM, 75nM, 272nM e 330nM na presença de PYL5, PYL8, PYL4 e PYR1 respetivamente.

Dada a multiplicidade de PP2Cs do grupo A (9 membros) e PYR/PYL (14 membros), a ligação entre as duas proteínas PYR/PYL-PP2C demonstra interação preferencial. O complexo ABA-receptor-PP2C comporta-se num sistema de afinidade á escala do nanomolar (Santiago *et al.*, 2009).

1.6.4. Modelo de sinalização ABA.

Em condições normais, PP2C desfosforila e inativa SnRK2, não havendo progressão da sinalização ABA (Figura1.10).

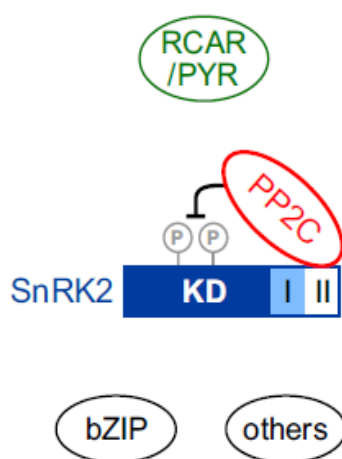


Figura 1.17 – Modelo de sinalização ABA em condições normais. (Umezawa *et al.*, 2009).

Na presença de ABA, os recetores PYR/PYL/RCAR interagem com a fosfatase inibindo a sua atividade, libertando as quinases SnRK2 da regulação negativa, podendo deste modo fosforilar fatores de transcrição (Figura 1.11).

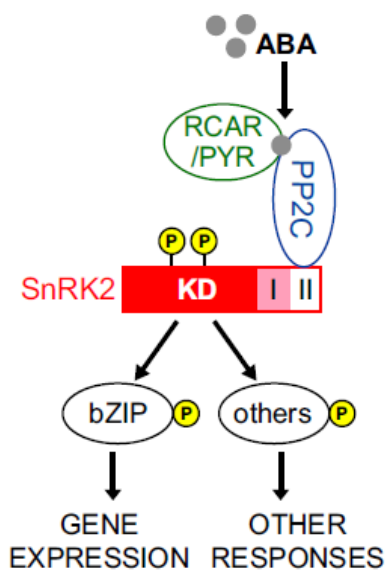


Figura 1.18– Modelo de sinalização ABA em condições de stress (Umezawa *et al.*, 2009).

Na presença de ABA, o mutante *abi1-1* foge ao controlo dos recetores PYR/PYL/RCAR, a PP2C desfosforila continuamente SnRK2 e a progressão da sinalização é interrompida (Figura 1.12).

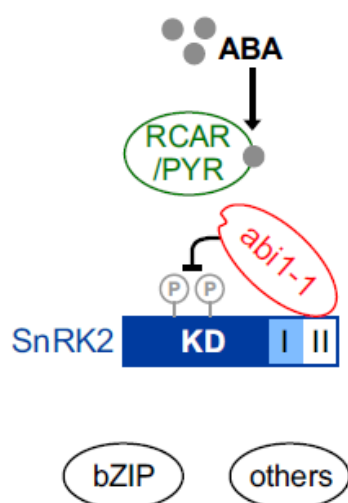


Figura 1.19 – Modelo de sinalização ABA em condições de stress na presença do mutante *abi1-1* que confere insensibilidade a ABA (Umezawa *et al.*, 2009).

1.7. *Armeria welwitschii*.

Armeria welwitschii é uma planta superior costeira, angiospérmica pertencente à família das plumbagináceas e está presente em rochas e areias marítimas (dunas). Geograficamente destaca-se ao longo da costa portuguesa que compreende o espaço entre Cascais e Figueira da Foz (Coutinho A.X.P.)

Armeria Berlengensis, endémica da Ilha da Berlenga, é semelhante a *Armeria welwitschii*, endémica e presente nas características falésias de Peniche. Uma possível explicação pode ser dada pela permanente ligação que a espécie *Larus argentatus* tem com os dois locais, permitindo o transporte de sementes, uma vez que a probabilidade de serem digeridas é reduzida. A frequente migração desta ave, deve-se ao fato da Ilha da Berlenga ser uma área propícia à nidificação, e por outro lado, Peniche possuir um porto de pesca e indústria transformadora de pescado, em que os sub-produtos são um forte atrativo (Aguilar J.F. e Feliner G.N. ,2003).

O ambiente de *Armeria welwitschii* é considerado inóspito e mesmo hostil. Os ventos fortes, o frio (inverno), a fraca disponibilidade de água principalmente no verão, os solos áridos e a elevada salinidade (3,5%) proveniente de vagas (spray marinho) condicionam a vegetação destes locais. A resistência por parte de *Armeria welwitschii* a estes fatores permitem-na caracterizar como tolerante, fazendo dela um bom objeto de estudo, uma vez

que o conhecimento a nível bioquímico, genético e molecular é escasso ou mesmo inexistente.

Compreender o papel que as PP2C e as proteínas PYR/PYL poderão ter nos mecanismos de adaptação a habitats costeiros seria uma mais-valia para uma melhor compreensão desses mecanismos em particular e em geral para o conhecimento dos mecanismos de resposta a stress.

O objetivo deste trabalho consiste no isolamento e caracterização de genes que codificam PP2Cs e proteínas PYR/PYL em *Armeria welwitschii*, com recurso ao PCR e utilizando primers degenerados de forma a permitir analisar posteriormente o papel que estas proteínas poderão ter nos mecanismos de adaptação a ambientes sujeitos a elevada salinidade e secura.

3.1. Identificação e análise de proteínas ortólogas de PP2C e PYR/PYL de *Arabidopsis thaliana* em diferentes plantas.

Utilizando a sequência das PP2C do grupo A e das proteínas PYR/PYL de *Arabidopsis thaliana* (Dicotiledónea) (<http://www.arabidopsis.org/>) procurou-se, utilizando a aplicação BLAST, verificar da existência de homologia destas proteínas com proteínas de outras plantas como *Physcomitrella patens* (musgo) desprovido de vasos condutores, pertencente à divisão de plantas denominadas como Briófitas (plantas avasculares) (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html); *Selaginella moellendorffii* (feto) pertencente à divisão Pteridófitas que apresenta vascularização mas sem semente (<http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html>) e destacando na divisão Magnoliófitas, espécies como *Populus trichocarpa* (choupo), Dicotiledónea (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) e *Oryza sativa* (arroz) Monocotiledónea (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>).

Estas espécies representam grandes grupos a nível das plantas e cada uma das espécies mencionadas possui a sua respetiva base de dados.

O alinhamento das sequências ortólogas identificadas foi efetuado utilizando o programa MegAlign (Lasergene) de acordo com o algoritmo Clustal W.

A elaboração das árvores filogenéticas correspondentes foi efetuada utilizando programa PhyloDraw (Choi *et al.*, 2000) e os alinhamentos visualizados com utilização do programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997).

3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA.

3.2.1. Extração de RNA com TRIzol.

Para a extração de RNA utilizaram-se folhas de plântulas de *Armeria welwitschii* mantidas em cultura *in vitro*, o que permitiu facilitar o processo de extração, pois se trata de tecidos jovens e pouco lenhificados.

Após seccionado, o material biológico foi utilizado de imediato ou mantido a -80°C até se proceder à extração de RNA.

Todo o material de vidro e os almofarizes utilizados, foram previamente tratados com uma solução de hidróxido de sódio 0.1M, lavados com H₂O-DEPC e esterilizados a seco, a 130°C, durante 15 horas, para garantir que o material se encontrava livre de RNases.

No passo de homogeneização, 200mg de folhas de *Armeria welwitschii* foram maceradas num almofariz com azoto líquido até apresentar o aspeto de um pó muito fino. Adicionou-se 1ml de TRIzol e homogeneizou-se.

O material insolúvel foi separado por centrifugação a 12,000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e incubado durante 3 minutos à temperatura ambiente para permitir a dissociação de complexos núcleo-proteicos, após o que se adicionou 0,2ml de clorofórmio, agitou-se vigorosamente durante 15 segundos, e, após uma incubação à temperatura ambiente durante 3 minutos, centrifugou-se a 12,000 x *g* durante 10 minutos a 4°C, para separação das fases.

Precipitou-se a fase aquosa com 0,5ml de isopropanol e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após centrifugação a 15.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C, removeu-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 1ml de etanol 70%, agitou-se em vortex e centrifugou-se a 7.500 x *g* durante 5 minutos a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e secou-se o pellet que foi ressuscitado em 20µl de H₂O ultrapura livre de DNases/RNases.

A quantificação de RNA foi efetuada por espectrofotometria, como descrito por Sambrook *et al.* (1989) medindo a absorvância a 260nm. A razão absorvância a 260nm/absorvância a 280nm foi utilizada para avaliar o grau de pureza do RNA, tendo-se considerado valores aceitáveis entre 1.7 e 2.0.

3.2.2. Tratamento do RNA total com DNase.

Para remover eventuais contaminações com DNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase, essencialmente como descrito por Ausubel *et al.* (1993). A mistura de reação (100mM de acetato de sódio, 5mM de MgSO₄, 1 U DNase I, 1 U de inibidor de RNases, e 15 a 100µg de RNA total, num volume total de 200µl) foi incubada a 37°C, durante 30 minutos e purificada através de uma extração fenol clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) tendo, no final, o RNA sido ressuscitado em 10µl de H₂O-DEPC.

A quantificação e avaliação da integridade do RNA, após o tratamento com DNase, foi efetuado como descrito anteriormente.

3.3. Transcrição reversa.

Para se proceder à síntese de cDNA utilizou-se a enzima SuperScript™ III (Invitrogen, life technologies) e 1,5µg de RNA total, previamente tratado com DNase como descrito anteriormente.

Adicionou-se os componentes seguintes a um tubo de centrifugação livre de nucleases:

- 1.5 µg de RNA total;
- 1 µl oligo dT (0.1 ug/ul)
- 1µl de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) 10mM cada;
- Água para perfazer 12µl.

Incubou-se a mistura a 65° durante 5 minutos e colocou-se brevemente em gelo. Após uma breve centrifugação adicionou-se:

- 4µl de 5x first-strand Buffer;
- 2µl de DDT 0,1M;
- 1µl de RNaseOUT™ (40 unidades/µl);
- 1µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl).

Incubou-se a 42°C durante 2 horas. Seguidamente incubou-se a 5 minutos a 65°C para inativação da enzima.

3.4. Desenho de primers degenerados.

Para o desenho dos primers degenerados foram escolhidas as zonas em que as sequências das proteínas apresentavam maior grau de semelhança e as correspondentes sequências de cDNA de diferentes espécies, dependendo das sequências disponíveis para o gene pretendido.

Os primers degenerados foram desenhados de forma a apresentar, tanto quanto possível, um tamanho de 22 a 30bp, um conteúdo em G+C próximo dos 50%, uma temperatura de fusão superior a 55°C e um número reduzido de bases degeneradas. Foi ainda minimizada a possibilidade de ocorrência de emparelhamento entre distintas regiões de cada primer e de primers entre si.

3.5. Amplificação e purificação de fragmentos de interesse.

3.5.1. Condições de amplificação.

Os fragmentos foram amplificados por PCR utilizando a seguinte mistura de reação:

- 25,5µl de H₂O ultrapura livre de DNAses/RNases;
 - 5µl de tampão 10x (Fermentas, life sciences);
 - 5µl de MgCl₂ a 25mM (Fermentas, life sciences);
 - 2µl de 4dNTPs a 10mM (Fermentas, life sciences)
 - 1µl cDNA;
 - 5µl de primer degenerado forward a 10µM (Invitrogene, life Technologies);
 - 5µl de primer degenerado reverse a 10µM (Invitrogene, life Technologies);
 - 1,5µl de Taq DNA polimerase 1u/µl (Fermentas, life sciences);
-
- 50µl de volume final para a reação de amplificação.

As reações de PCR foram efetuadas sob o seguinte programa:

- 2minutos a 94°C;
 - 30segundos a 94°C;
 - 1minuto a 45°C;
 - 1minuto e 30segundos a 72°C;
 - 10minutos a 72°C;
 - 15°C até as amostras serem removidas do PCR.
- | 40x

A reamplificação dos produtos da primeira reação foi efetuada nas mesmas condições excetuando a alteração da temperatura de annealing que foi alterada de 45°C para 50°C e a utilização de 1,5µl do produto de PCR da amplificação anterior (em vez de cDNA).

3.5.2. Separação e recuperação de fragmentos.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O tamanho aproximado dos fragmentos obtidos foi avaliado utilizando o marcador O'RangeRuler 200bp (0.05µg/µl) (Fermentas-life sciences). As bandas foram visualizadas utilizando o sistema de foto-documentação ChemiDoc XRS (BioRad).

3.5.3. Purificação e aumento da concentração dos produtos de PCR.

Dado que a intensidade de algumas das bandas obtidas, mesmo após reamplificação, era relativamente fraca, optou-se por purificar e aumentar a concentração dos produtos de PCR antes de proceder à clonagem dos mesmos. Após juntar num único tubo o produto de 4 reações de PCR efetuou-se uma purificação com fenol/clorofórmio após o que o DNA foi precipitado adicionando 1/10 vol. de acetato de sódio 3M e 3 vol. de etanol absoluto. Incubou-se a -20°C durante 1 hora, centrifugou-se a 12.000 x g durante 20 minutos à temperatura ambiente. O pellet foi lavado com 600µl de etanol 70%, agitou-se ao vortex durante 15 segundos, centrifugou-se durante 10 minutos a 12.000 x g, rejeitou-se o sobrenadante e secou-se o pellet. O DNA foi ressuscitado com 25µl de água ultra pura.

3.6. Clonagem.

Para a clonagem dos fragmentos foi utilizada a estratégia de clonagem T/A de produtos de PCR. Os produtos de amplificação de uma reação de PCR apresentam geralmente extremidades A 3' projetadas, o que permite a sua clonagem de forma eficiente em vetores que apresentem extremidades T 3' projetadas (vetores-T), tendo sido utilizado o de pGEM®-T Easy Vector (Promega).

3.6.1. Ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem.

Efetuou-se a reação de ligação nas seguintes condições:

- 1.5 µl do tampão de ligação x10;
- 1.0 µl de pGEM®-T Easy Vector (50ng/µl);
- 1.0 µl do produto de PCR;
- 1.0 µl de T4 DNA Ligase;
- 10.5 µl H₂O.

Incubou-se a 4°C overnight.

3.6.2. Transformação em células competentes.

A um tubo contendo aproximadamente 50µl de células competentes DH5α, foram adicionados 10µl da reação de ligação, agitou-se levemente e incubou-se em gelo durante 10 minutos. Submeteu-se o tubo a choque térmico, a 42°C durante 50-55 segundos, repondo-o de imediato em gelo onde foi incubado durante 2 minutos. Adicionou-se 700µl de meio SOC às células transformadas e incubou-se durante 60 minutos a 37°C com agitação (~150rpm).

Após centrifugação durante 1min a 10000 x g eliminou-se 650 µl do sobrenadante e o restante foi utilizado para ressuspender as bactérias que foram plaqueadas em meio LB sólido enriquecido com LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Incubou-se overnight a 37°C e selecionaram-se as colônias de cor branca que foram utilizadas para inocular 3ml de meio LB líquido contendo ampicilina. Após a repicagem das colônias para meio líquido, os tubos foram incubados a 37°C, com agitação, 250 rpm, durante 16 horas. A extração do DNA plasmídico foi efetuada pelo processo de lise alcalina, míni-prep, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). O DNA plasmídico extraído foi ressuspendido em 30µl de H₂O-MQ.

Para confirmação da inserção dos fragmentos, 3µl de DNA plasmídico foram digeridos com *Eco* RI (Fermentas). Os produtos da restrição foram separados em gel de agarose 1% e verificou-se se os fragmentos obtidos apresentavam o tamanho esperado. As amostras de DNA plasmídico em que havia sido confirmada a inserção do fragmento pretendido foram purificadas através de uma extração fenol-clorofórmio e sequenciadas.

3.7. Sequenciação e análise das sequências obtidas.

A sequenciação foi efetuada num sequenciador automático ABI Prism 373A automatic sequencer (Applied Biosystems) nas condições definidas pelo fabricante. As amostras foram preparadas utilizando o kit Big Dye terminator (Applied Biosystems), essencialmente de acordo com as instruções do fabricante, adicionando, no entanto, apenas 2µl de *ABI mix* à mistura de reação, e utilizando o primer M13rev.

As sequências foram analisadas e editadas utilizando o programa Chromas (Technelysium Pty Ltd), para remoção das sequências correspondentes ao vetor e correção de eventuais erros na definição da sequência de bases.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências existentes na base de dados (<http://www.arabidopsis.org>) utilizando os serviços BLAST.

4.1. Extração de RNA.

O protocolo utilizado permitiu a extração de RNA total com um grau de pureza adequado (entre 1.8 e 2.0) e em quantidade suficiente para as reações de transcrição reversa.

4.2. Desenho de *primers* degenerados.

O alinhamento da sequência das proteínas PYR/PYL/RCAR e das PP2Cs grupo A, através do programa MegAlign, permitiu obter uma visão geral sobre as zonas mais conservadas.

O desenho de *primers* degenerados foi possível para ambas as proteínas, mas a presença de aminoácidos como Leucina (L), Serina (S) e Arginina (R) em algumas zonas conservadas, dificultou a redução do número de bases degeneradas.

4.2.1. Alinhamento da sequência de proteínas PYR/PYL/RCAR e desenho dos respectivos *primers*.

O alinhamento de sequências de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana* (como referência) e ortólogos de *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa* permitiu evidenciar quatro zonas bastante conservadas.

As duas primeiras zonas conservadas foram escolhidas para a definição de dois *primers forward* (denominados PYR_Fw1 e PYR_Fw2) e as duas últimas, na região final da proteína, foram utilizadas no caso dos dois *primers reverse* (PYR_Rev1 e PYR_Rev2) (Figura 4.1).

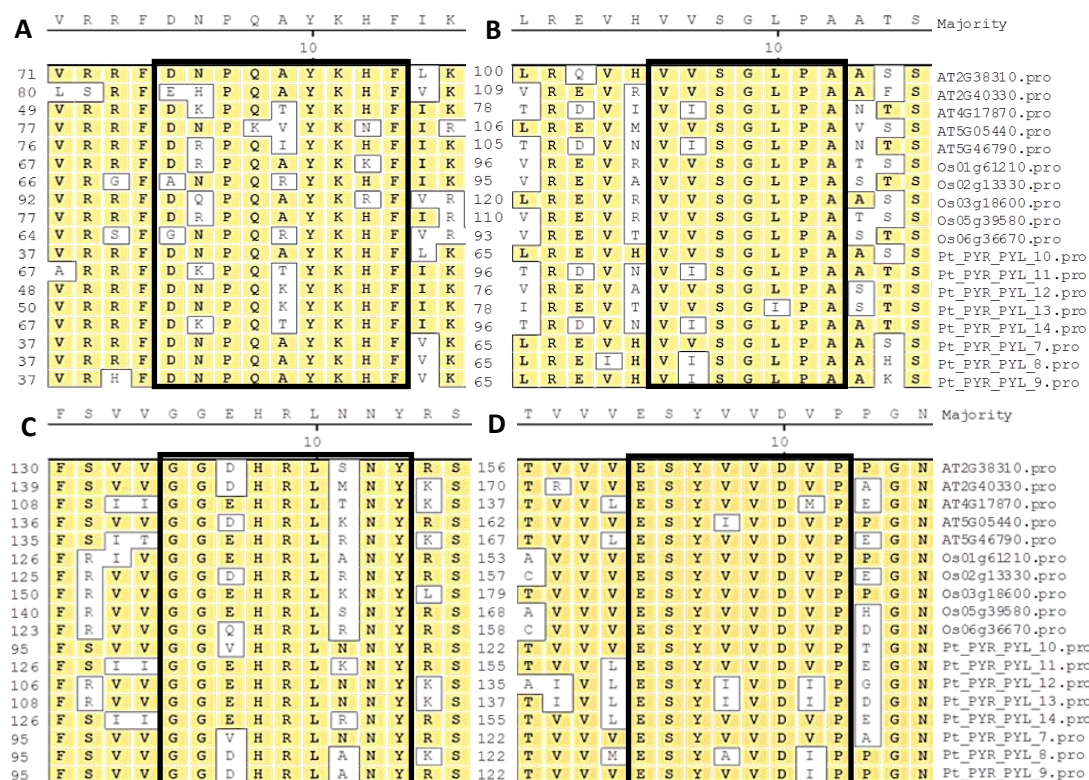


Figura 4.12 – Zonas conservadas obtidas no alinhamento de seqüências de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Physcomitrella patens* utilizadas no desenho dos primers PYR_Fw1 (A), PYR_Fw2 (B), PYR_Rev1 (C) e PYR_Rev2 (D).

4.2.2. Alinhamento de proteínas fosfatases do tipo 2C e desenho dos respectivos primers.

Para o alinhamento de proteínas fosfatases 2C do grupo A, foram utilizadas seqüências de *Arabidopsis thaliana* (como referencia) e ortólogos de *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffi* e *Physcomitrella patens*.

O domínio N terminal das PP2C apresenta elevada variabilidade e apenas o domínio C terminal, que corresponde ao domínio catalítico, se encontra conservado.

O alinhamento global ao nível do domínio catalítico das seqüências de PP2C do grupo A de *Arabidopsis thaliana* permite definir dois grupos distintos. O Grupo I, um ramo que contém fosfatases como ABI1, e HAB1; e o Grupo II, outro ramo em que se incluem fosfatases como PP2CA e AHG1.

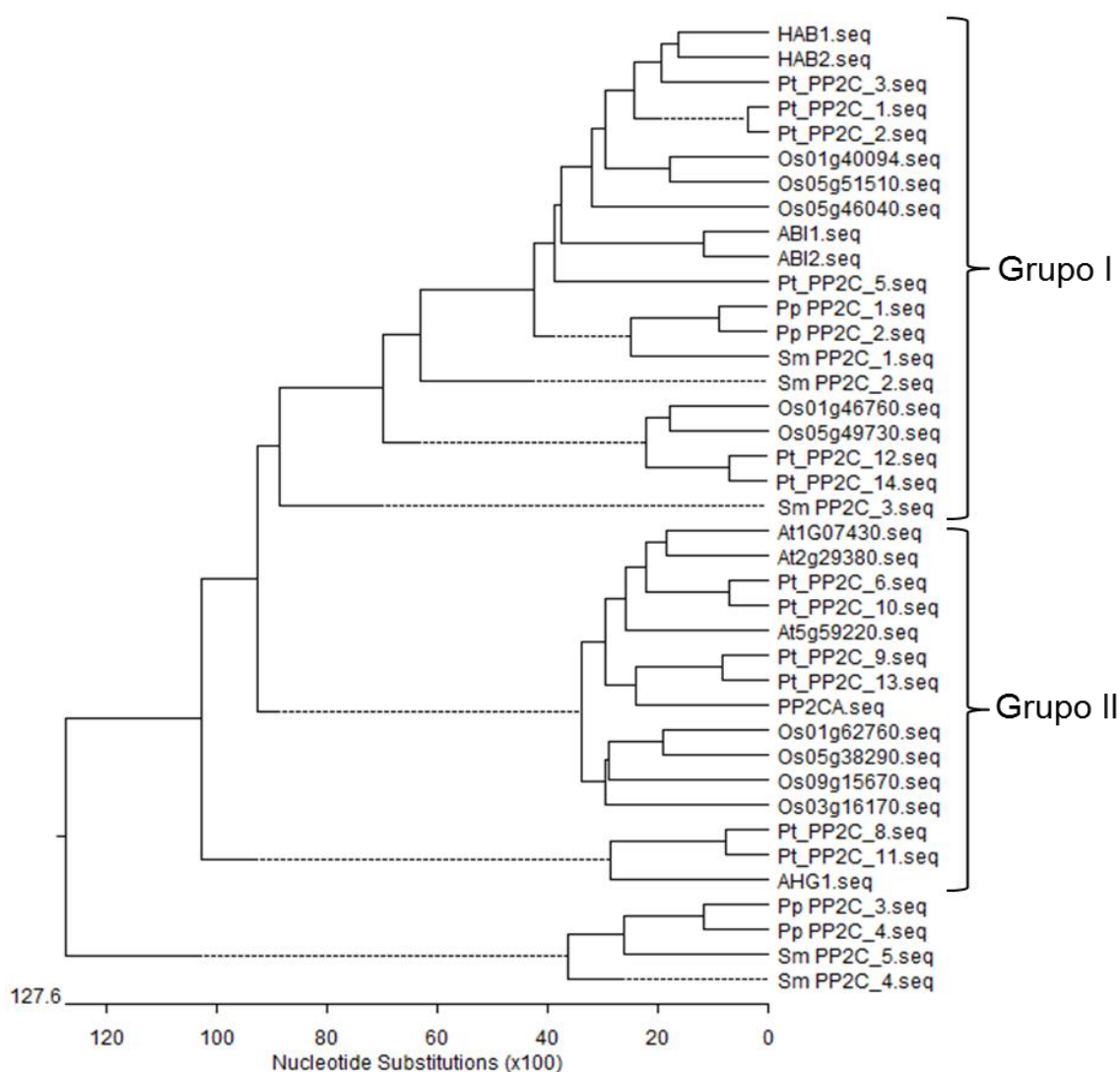


Figura 4.13 – As Fosfatases do tipo 2C do grupo A das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffii* e *Physcomitrella patens* apresentam dois ramos distintos.

A interessante subdivisão em dois ramos (Figura 4.2) pode sugerir que esses dois grupos tenham um papel algo distinto na regulação da via de sinalização de ABA.

A divergência dos dois grupos foi observada em duas zonas conservadas no início do domínio catalítico o que permitiu o desenho de um *primer forward* específico para cada um dos grupos. Um *primer* característico do grupo II, denominado PP_Fw1-II, foi desenhado a partir da primeira zona conservada do domínio catalítico (Figura 4.3).

	V	T	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	Majority
										10						
319	T	T	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	PP2CA.seq
367	V	A	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	At1G07430.seq
238	V	S	S	V	C	G	R	R	R	E	M	E	D	A	V	At2g29380.seq
340	V	A	S	V	C	G	R	R	R	E	M	E	D	A	V	At5g59220.seq
331	I	V	S	V	M	G	R	S	R	K	M	E	D	S	V	AHG1.seq
304	V	T	A	V	C	G	R	R	R	E	M	E	D	A	V	Os01g62760.seq
238	F	T	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	S	V	Os03g16170.seq
280	V	T	S	V	F	G	R	R	R	E	M	E	D	A	V	Os05g38290.seq
229	A	A	S	V	A	G	R	R	R	E	M	E	D	A	V	Os09g15670.seq
241	V	A	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	Pt_PP2C_6.seq
232	S	M	S	V	S	G	R	S	R	E	M	E	D	A	I	Pt_PP2C_8.seq
310	M	T	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	Pt_PP2C_9.seq
13	V	A	S	V	C	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	Pt_PP2C_10.seq
13	S	M	S	V	S	G	R	S	R	E	M	E	D	A	I	Pt_PP2C_11.seq
322	M	T	S	V	R	G	R	R	R	D	M	E	D	A	V	Pt_PP2C_13.seq

Figura 4.14 – Zona conservada considerada para o desenho do *primer* degenerado PP_Fw1-II.

Outro *primer*, referente ao grupo I denominado PP_Fw2-I, foi desenhado a partir da segunda zona conservada do domínio catalítico (Figura 4.4).

	P	A	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	A	Majority
										10								
469	S	A	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	A	ABI2.seq
505	A	A	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	A	ABI1.seq
700	T	S	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	A	Q	V	A	HAB2.seq
703	T	G	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	H	K	V	A	HAB1.seq
589	P	A	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	A	Q	V	A	Os01g40094.seq
514	P	A	H	F	F	A	V	Y	D	G	H	G	G	V	Q	V	A	Os05g51510.seq
328	P	A	H	L	F	G	V	F	D	G	H	G	G	A	E	V	A	Os05g46040.seq
139	P	L	H	Y	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	T	Pp_PP2C_1.seq
133	P	L	H	Y	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	T	Pp_PP2C_2.seq
190	T	A	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	A	Pt_PP2C_1.seq
178	T	A	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	A	Pt_PP2C_2.seq
139	P	I	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	S	Q	V	A	Pt_PP2C_5.seq
214	A	L	H	F	F	G	V	Y	D	G	H	G	G	P	Q	V	A	Sm_PP2C_1.seq

Figura 4.15 – Zona conservada considerada para o desenho do *primer* degenerado PP_Fw2-I.

Uma terceira região conservada, ainda na parte inicial do domínio catalítico originou outro *primer forward*, denominado por PP_Fw2 (Figura 4.5A).

No final do domínio catalítico duas regiões foram estabelecidas para *primers reverse*, denominados por PP_Rev2 (Figura 4.5B), interno e PP_Rev1 (Figura 4.5C) externo.

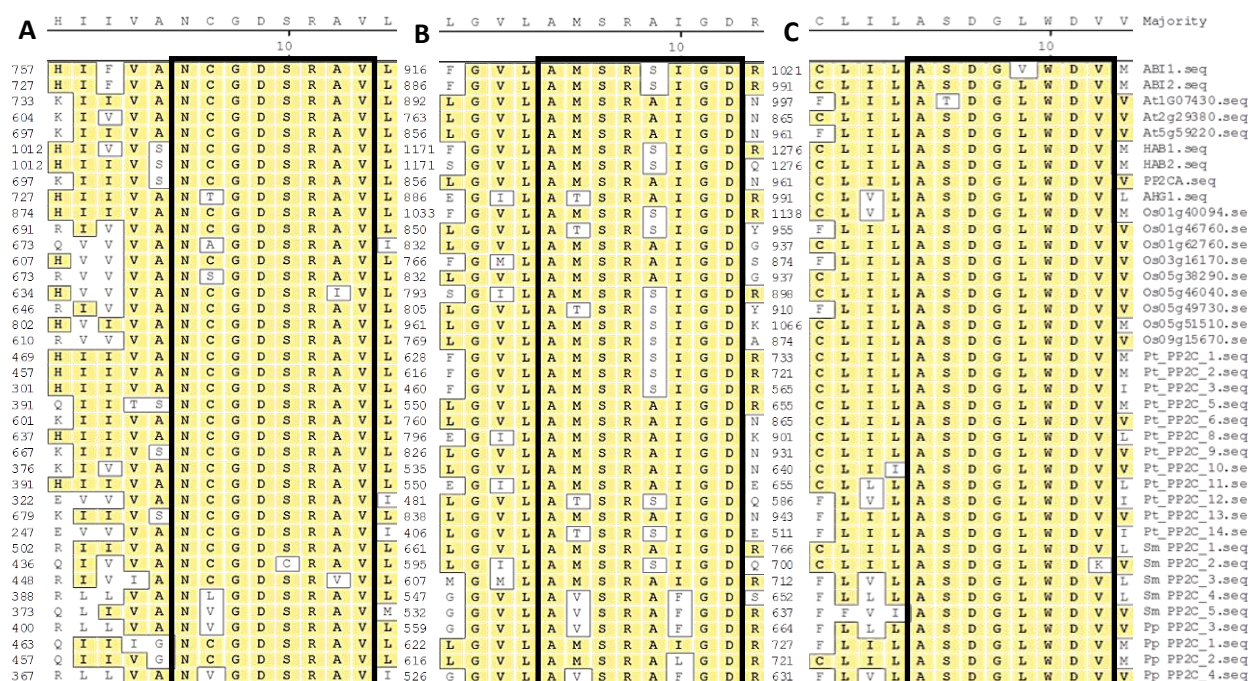


Figura 4.16 – Zonas conservadas consideradas para o desenho dos *primers* degenerados PP_Fw2 (A), PP_Rev2 (B) e PP_Rev1 (C).

Os *primers* denominados como PP_Fw2, PP_Rev1 e PP_Rev2 têm em consideração o alinhamento geral, ou seja, todas as fosfatases do tipo 2C do grupo A consideradas na Figura 4.2.

4.3. Sequências de *primers* degenerados e fragmentos esperados.

4.3.1. Recetores PYR/PYL/RCAR.

Tendo em conta os alinhamentos de sequências de proteínas PYR/PYL/RCAR referidos anteriormente foram desenhados os *primers* degenerados que encontram-se descritos na tabela seguinte (Tabela 1):

Tabela 3 – *Primers* degenerados obtidos tendo em conta o alinhamento de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana* e ortólogos *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa* (Tm – melting temperature).

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	GC (%)	Tm (°C)
PYR_Fw1	GAN AAN CCN CAR VVN TAY AAR CAY TT	39%	50
PYR_Fw2	GTN RTN WSN GGN YTN CCN GC	60%	51
PYR_Rev1	TAR TTN SYN ARN CKR TGN WCN CCN CC	51%	55
PYR_Rev2	GGN AYR TCN ACN AYR TAN SWY TC	45%	49

Considerando o local das sequências em que os *primers* degenerados específicos de PYR/PYL/RCAR emparelham e o tamanho dessas mesmas sequências nos vários organismos considerados, foi possível extrapolar o tamanho provável dos fragmentos esperados para a combinação dos diferentes pares de *primers* possíveis. As diferentes combinações de *primers* originam previsivelmente fragmentos com os seguintes tamanhos:

- Fw1/Rev1: aproximadamente 210bp
- Fw1/Rev2: aproximadamente 315bp
- Fw2/Rev1: aproximadamente 105bp
- Fw2/Rev2: aproximadamente 215bp

4.3.2. Fosfatases do tipo 2C do grupo A.

Os *primers* resultantes do alinhamento de proteínas fosfatases do tipo 2C do grupo A encontram-se descritos na seguinte tabela (Tabela 2):

Tabela 4 – *Primers* degenerados obtidos pelo alinhamento de proteínas PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana* e ortólogos *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Physcomitrella patens* e *Selaginella moellendorffii* (Invitrogen).

Nome do primer	Sequência (5'→3')	GC (%)	Tm (°C)
PP_Fw1-II	GGN MGN HSN MGN GAN ATG GA	59%	50
PP_Fw2-I	TTY GGN GTN TAY GAY GGN CAY GG	54%	53
PP_Fw2	AAY TGY GGN GAY WRN MGN GCN GT	54%	53
PP_Rev1	ACR TCC CAN ARN CCR TCN SWN GC	58%	55
PP_Rev2	TCN CCD ATN SHN CKN SWC ATN GC	55%	53

Considerando a localização dos *primers* e os alinhamentos das sequências das fosfatases do tipo 2C do grupo A de *Arabidopsis thaliana*, foi possível extrapolar o tamanho aproximado dos fragmentos esperados para a combinação dos diferentes pares de *primers* possíveis. As diferentes combinações de *primers* originam previsivelmente fragmentos com os seguintes tamanhos:

- Fw1-II/Rev1: aproximadamente 655bp
- Fw1-II/Rev2: aproximadamente 550bp
- Fw2-I/Rev1: aproximadamente 505bp
- Fw2-I/Rev2: aproximadamente 400bp
- Fw2/Rev1: aproximadamente 290bp
- Fw2/Rev2: aproximadamente 180bp

4.4. Produtos de PCR obtidos.

Numa fase inicial, a estratégia de amplificação passou pelo uso de pares de *primers* mais externos, e posterior reamplificação com a combinação dos pares de *primers* possíveis. As primeiras tentativas de amplificação através de *primers* degenerados específicos para PYR/PYL/RCAR e PP2Cs não demonstraram resultados utilizando cDNA de *Arméria welwitschii*.

Para verificar a eficácia dos *primers* na amplificação das sequências pretendidas, decidiu-se efetuar um teste utilizando cDNA de *Arabidopsis thaliana* que havia sido utilizado anteriormente em outras reações de amplificação. Numa primeira amplificação, através de pares de *primers* desenhados para amplificar PP2Cs, apenas PP_Fw2-I/Rev2 funcionaram, conseguindo-se resultados na amplificação e reamplificação (Figura 4.6).

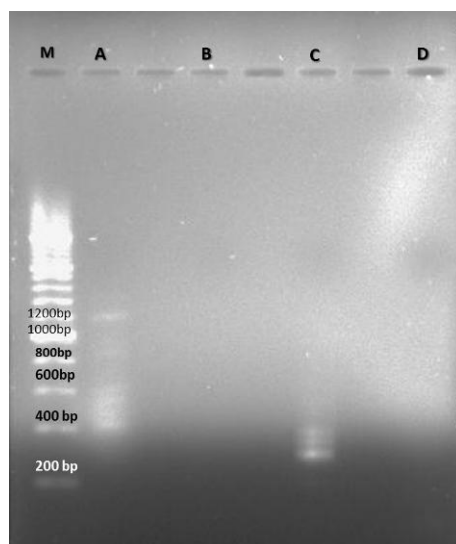


Figura 4.17 – Gel de agarose que demonstra amplificação a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* e posterior reamplificação. Amplificação com PP_Fw2-I/PP_Rev1 (A) e PP_Fw1-II/PP_Rev1 (B). Reamplificação a partir dos produtos obtidos em A e B com os pares de primers PP_Fw2-I/PP_Rev1 (C e D). M-Marcador.

Para confirmar a viabilidade dos *primers* degenerados de PP2Cs, foi feita duas amplificações iniciais usando os pares de *primers* mais externos, PP_Fw2-I/Rev1 e PP_Fw1/PP_Rev1 respetivamente. Uma reamplificação seguinte foi feita com as combinações de *primers* possíveis (Figura 4.7).

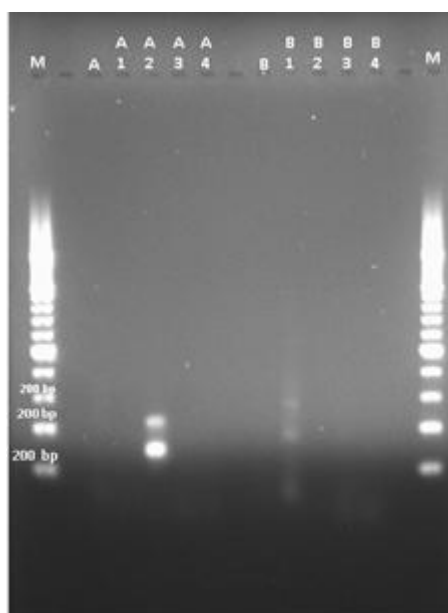


Figura 4.18 – Gel de agarose que demonstra a amplificação a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* e posterior reamplificação com as combinações de primers específicos de PP2Cs. Amplificação com PP_Fw2-I/Rev1 (A) e PP_Fw1-II/Rev1 (B). Reamplificação com PP_Fw2-I/PP_Rev2 (A1); PP_Fw2-II/PP_Rev1 (A2); PP_Fw2/PP_Rev2 (A3); PP_Fw2/PP_Rev1 (A4); PP_Fw1-II/PP_Rev2 (B1); PP_Fw1-II/PP_Rev1 (B2); PP_Fw2/PP_Rev2 (B3) e PP_Fw2/PP_Rev1 (B4). M-marcador.

Fw2-I/Rev1 foram os únicos pares de *primers* que resultaram como notado anteriormente (Figura 4.6), mas com a diferença de não terem amplificado na primeira reação. A utilização de *primers* degenerados específicos de PYR/PYL/RCAR não demonstrou amplificação quando foi utilizado cDNA de *Arabidopsis thaliana*. Os produtos resultantes não são específicos (Figura 4.8).

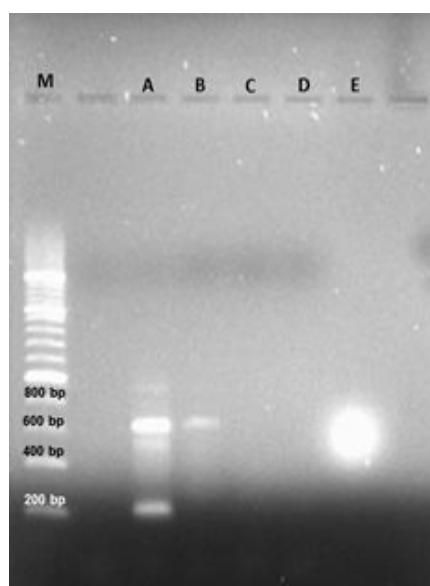


Figura 4.19 – Gel de agarose que demonstra a amplificação a partir de cDNA de *Arabidopsis thaliana* e posterior reamplificação com as combinações de primers específicos para PYR/PYL/RCAR. Amplificação com PYR_Fw1/PYR_Rev2 (A) e reamplificação com PYR_Fw1/PYR_Rev1 (B); PYR_Fw1/PYR_Rev2 (C); PYR_Fw2/PYR_Rev1 (D) e PYR_Fw2/PYR_Rev2 (E). M-marcador.

Na tentativa de tentar amplificar novamente a partir do cDNA de *Armeria welwitschii*, alguns parâmetros foram alterados. Alterações foram definidas ao nível do programa de PCR e na alteração da quantidade dos reagentes. O aumento dos ciclos (30 para 40), tempo de annealing e extensão, assim como o aumento do volume do template foram propostos.

Apesar das alterações e após várias tentativas de amplificação, não foram observados resultados usando *primers* específicos de PYR/PYL/RCAR quer de PP2Cs.

Os resultados foram obtidos após a obtenção de um novo cDNA de *Armeria welwitschii*. Com a consecutiva amplificação, as bandas por vezes não apareciam ou apareciam com fraca intensidade. As bandas que apareceram com sucesso, devem-se apenas ao par de *primers* degenerados PP_Fw2-I/PP_Rev1, específicos de PP2Cs (Figura 4.9). Não houve amplificação a partir de *primers* específicos para PYR/PYL/RCAR, com a utilização do novo cDNA de *Armeria welwitschii*.

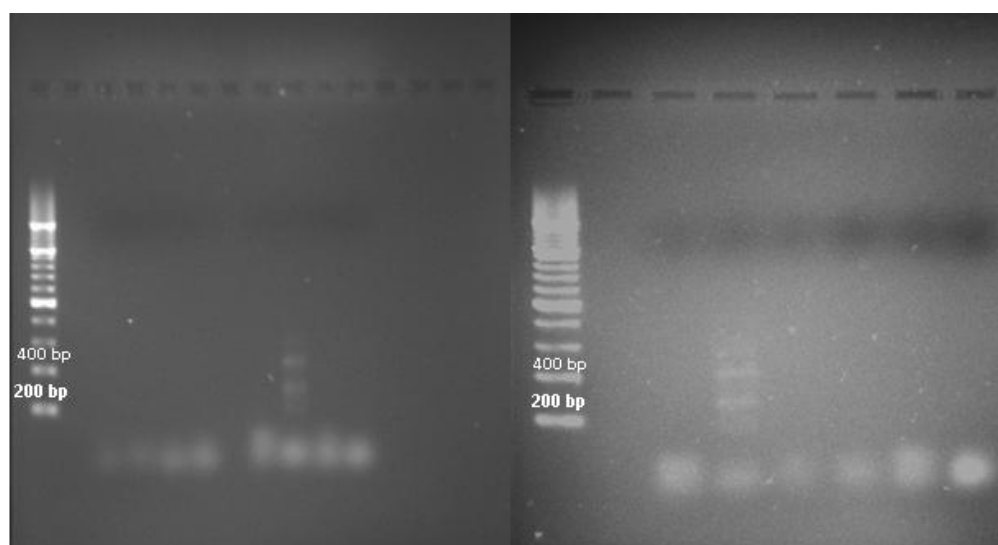


Figura 4.20 – Gel de agarose que demonstra a tentativa de amplificação em *Armeria welwitschii* com a multiplicidade de *primers* degenerados. A amplificação apenas ocorre com o par de *primers* PP_Fw2-I/PP_Rev1 (A e B).

A partir deste ponto, PP_Fw2-I/PP_Rev1 foi o único par de *primers* utilizado para amplificar grande parte da sequência que codifica para proteínas fosfatases do tipo 2C pertencentes ao grupo A.

O facto de se ter obtido bandas de fraca intensidade está relacionado com a quantidade de Taq DNA polimerase utilizada. A utilização de um volume de 0,5µl não foi suficiente dado a fraca concentração disponível (1u/µl).

O volume foi corrigido para 1,5µl, o que resultou na visualização da grande intensidade de bandas em comparação com produtos de PCR anteriormente descritos. O

aumento do volume de Taq. DNA polimerase proporcionou a obtenção de uma quantidade apreciável dos produtos de PCR originados a partir do par de *primers* degenerados PP_Fw2-I/PP_Rev1 (Figura 4.10).

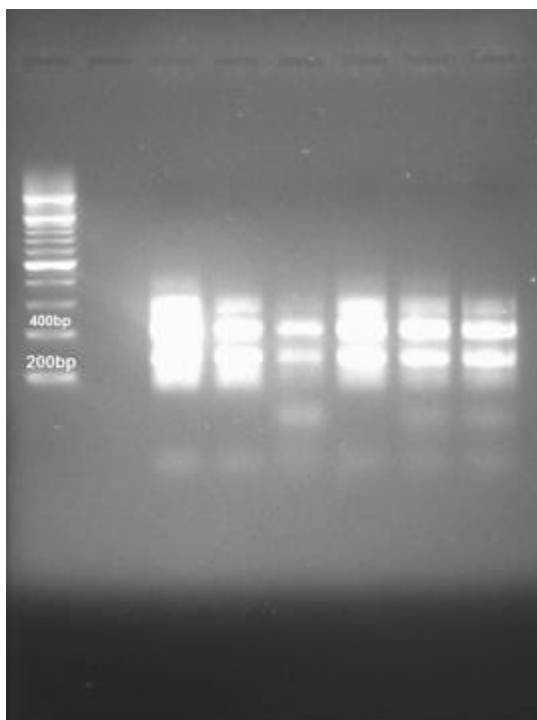


Figura 4.21 – Gel de agarose que demonstra a forte amplificação através do par de *primers* PP_Fw2-I/PP_Rev1.

4.5. Clonagem e sequenciação dos produtos de PCR obtidos.

Após a clonagem foram selecionadas 8 colónias de cor branca para posterior análise.

A análise por restrição com EcoRI permitiu verificar que, tendo em conta o tamanho dos fragmentos obtidos por restrição se teriam obtido 4 produtos diferentes, os quais após purificação foram sequenciados.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de proteínas existentes na base de dados de *Arabidopsis thaliana* (Tair). Três delas apresentavam homologia com outras proteínas que não fosfatases (AT1G80530, AT3G52930, ATCG00920) mas uma delas apresentava elevada semelhança com fosfatases do tipo 2C (Figura 4.11).



Figura 4.22 – A sequência parcial (Seq1) de *Armeria welwitschii* apresenta elevada semelhança com fosfatases do tipo 2C do grupo A.

5. Discussão e Conclusão

Para identificar os genes que codifiquem proteínas PYR/PYL/RCAR e fosfatases do tipo 2C do grupo A em *Armeria welwitschii*, recorreu-se à amplificação do cDNA utilizando *primers* degenerados. O desenho de *primers* baseou-se no alinhamento de sequências de proteínas de *Arabidopsis thaliana* e ortólogos de espécies como *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffi* e *Physcomitrella patens*, bem como no alinhamento das correspondentes sequências de nucleótidos. A partir das sequências proteicas disponíveis de PYR/PYL/RCAR e PP2Cs do grupo A, foram escolhidas regiões conservadas o mais perto possível das extremidades (N-terminal e C-terminal). Ao desenhar os *primers* degenerados tentou-se evitar resíduos de serina, leucina e arginina. Estes aminoácidos são codificados por uma diversa combinação de codões aumentando o número de bases degeneradas e esse aumento é traduzido numa elevada combinação de nucleótidos o que diminui a eficiência e especificidade dos *primers*.

Para a amplificação de genes codificantes de proteínas PYR/PYL/RCAR e PP2Cs do grupo A, optou-se pela estratégia de uma primeira reação de PCR com uma temperatura de *annealing* baixa (45°C), utilizando *primers* mais externos seguida de uma reamplificação com uma temperatura de *annealing* mais elevada (50°C). Ao utilizar uma temperatura relativamente baixa, a especificidade dos *primers* na primeira amplificação é reduzida, podendo haver emparelhamentos não específicos, mas por outro lado, aumenta a possibilidade de poder amplificar o(s) gene(s) alvo. Mesmo havendo emparelhamento por parte dos *primers* mais externos na primeira amplificação, a quantidade de DNA resultante da reação pode não ser visualizada por eletroforese, devido à quantidade de DNA ser reduzida, o que se verificou. A reamplificação recorrendo ao *template* da primeira reação e utilizando uma temperatura de *annealing* mais elevada vai permitir aumentar a especificidade da reação, em particular quando utilizados *primers* mais internos, ao mesmo tempo que permite eventualmente obter uma quantidade de produto que permita a sua clonagem e posterior análise.

As proteínas PYR/PYL/RCAR das espécies *Arabidopsis thaliana* e ortólogas de *Populus trichocarpa* e *Oryza sativa*, são proteínas relativamente pequenas apresentando entre os 159 e 251 resíduos de aminoácidos (Santiago *et al.*, 2009). A amplificação de genes responsáveis pela tradução de proteínas PYR/PYL/RCAR não foi bem-sucedida. O alinhamento das sequências de proteínas PYR/PYL/RCAR, mostra que, apesar de estas proteínas apresentarem elevada semelhança, apresentam apenas quatro regiões conservadas suficientemente longas para o desenho de *primers* degenerados. Essas quatro regiões foram as utilizadas para o desenho dos *primers*.

Estes *primers* mostraram não ser adequados para a amplificação dos genes codificantes de proteínas PYR/PYL/RCAR, nas condições utilizadas, pois não foi possível amplificar qualquer proteína desta família a partir de cDNA de *Armeria welwitschii*, como

também falharam as tentativas de amplificação utilizando um cDNA controlo obtido por transcrição reversa de RNA obtido de folhas de *Arabidopsis thaliana*.

O alinhamento geral de sequências proteicas a partir do domínio catalítico de fosfatases do tipo 2C do grupo A de espécies como *Arabidopsis thaliana* e ortólogos de *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffi* e *Physcomitrella patens* permitiu a confirmação de dois ramos distintos (Schweighofer *et al.*, 2004). As sequências presentes nos dois ramos do alinhamento geral, foram selecionadas e alinhadas novamente para se obter *primers* forward (PP_Fw1-II, um *primer* mais externo e PP_Fw2-I, um *primer* mais interno) específicos de cada ramo com o objetivo de reduzir a quantidade de bases degeneradas nas duas regiões conservadas. Os restantes *primers* foram definidos pelo alinhamento geral, com o desenho de um *primer forward* PP_Fw2 mais interno e dois reverse, PP_REV1 e PP_Rev2 mais externo e interno respetivamente.

A amplificação de genes que codificam para fosfatases do tipo 2C do grupo A foi bem-sucedida, recorrendo ao par de *primers* PP_Fw2-I/PP_Rev1. Analisando de um modo crítico os *primers* desenhados: a região utilizada para desenhar o *primer* PP_Fw1-II apresenta na sua extremidade 5' elevado número de bases degeneradas apresentado no entanto uma extremidade 3' menos degenerada (últimos 6 nucleótidos). O *primer* PP_Fw2-I apresenta muito menos bases degeneradas e, portanto, não surpreende o facto de ter sido o que possibilitou a amplificação da sequência parcial dos genes pretendidos. É interessante notar que também no caso dos *primers reverse*, o *primer* que apresenta menor número de bases degeneradas, PP_Rev1, foi também o que permitiu a amplificação de uma sequência parcial de um gene codificante de PP2C.

O produto de re-amplificação utilizando o par de *primers* PP_Fw2-I/PP_Rev1 exhibe duas bandas distintas, uma com sensivelmente 250 pares de bases e outra com pouco mais de 450. O tamanho dos fragmentos desta última banda (450bp) é consistente com o tamanho dos fragmentos esperados (cerca de 500).

Para identificar os fragmentos obtidos, recorreu-se à clonagem no vetor pGEM®-T e os clones obtidos foram sequenciados.

O vetor pGEM® possui extremidades T 3' projetadas, o que facilitou a ligação aos fragmentos que possuíam extremidades A 3' projetadas geradas pela Taq DNA polimerase. O processo de seleção dos clones que continham os fragmentos clonados foi facilitada pelo facto de o vetor utilizado permitir a seleção dos clones pelo sistema “colónias brancas/azuis” (o *mcs* (*multiple cloning site*) interrompe o gene *lacZ*). Após a extração do DNA plasmídico confirmou-se a inserção do fragmento e o seu tamanho por digestão com EcoRI. O padrão de restrição dos oito clones analisados sugeria que teriam sido clonados 4 fragmentos distintos que foram sequenciados.

As 4 sequências obtidas foram comparadas com as sequências presentes nas bases de dados recorrendo aos serviços blast das bases de dados NCBI e Tair. Três sequências correspondem a produtos de amplificação não específicos. Apenas uma das sequências apresentava elevada semelhança com sequências de PP2C de *Arabidopsis thaliana*.

Essa sequência apresenta elevada semelhança com as sequências de PP2C de *Arabidopsis thaliana* e em particular com a fosfatase AT1g43900. Esta fosfatase faz parte da superfamília das PP2Cs mas está incluída no grupo F (Schweighofer *et al.*, 2004), o que sugere que, apesar da também elevada semelhança com as PP2Cs do grupo A, a sequência obtida poderá ser uma sequência parcial de um ortólogo de uma fosfatase do grupo (F).

Os primers utilizados foram desenhados tendo em conta as zonas mais conservadas das PP2Cs do grupo A, ou seja o seu domínio catalítico. No entanto, o domínio catalítico apresenta uma semelhança assinalável em praticamente todas as PP2C, o que poderá eventualmente explicar que a sequência obtida seja de um gene que codifica uma proteína de outro grupo das PP2C.

A identificação do grupo das PP2Cs em que estará incluída a PP2C de que foi isolada uma sequência parcial apenas será possível após obtenção da sequência completa do cDNA por 5'RACE ("Rapid Amplification of cDNA Ends") e 3' RACE. Contudo, ter-se obtido uma sequência parcial correspondente a uma proteína pertencente às PP2Cs permite admitir que o isolamento e posterior sequenciação de um número mais elevado dos clones obtidos poderá permitir a identificação e posterior caracterização de outras proteínas deste grupo de fosfatases e, provavelmente, de algumas pertencentes ao grupo A.

Este trabalho confirma a presença de uma fosfatase parcial do tipo 2C em *Armeria welwitschii*. Embora esta fosfatase se identifique mais com o grupo F que com o grupo A em *Arabidopsis thaliana*, mais trabalho pode ser feito:

Relativamente á fosfatase encontrada:

- Garantir o reconhecimento de toda a fosfatase através de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

Relativamente às fosfatases 2C do grupo A:

- Todos os clones obtidos não foram sequenciados, poderá ser possível encontrar genes correspondentes a PP2Cs do grupo A em outros clones.

Após se obter ortólogos de fosfatases do grupo A de *Arabidopsis thaliana*, poderá ser identificada a sua função e quantificada a sua expressão:

- Caracterização funcional dos genes utilizando ensaios de dois híbridos em levedura e ensaios de complementação em *Arabidopsis thaliana*.
- Utilização de PCR quantitativo para análise dos níveis de expressão dos genes que as codificam em populações de *Armeria welwitschii* da orla marítima e em regiões mais interiores.

7.Referências bibliográficas

- Aguilar J.F., Feliner G.N. (2003). Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria*, Plumbaginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 430 – 447.
- Anderberg R.J., Walker-Simmons M.K. (1992). Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10183 – 10187.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds.)(1993). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Choi J.H., Jung H.Y., Kim H.S., Cho H.G. (2000). PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics* 16: 1056 – 8.
- Cornforth J.W., Milborrow B.V., Ryback G., Wareing P.F. (1965). Chemistry and Physiology of Dormins In Sycamore: Identity of Sycamore Dormin with Abscisin II. *Nature* 205: 1269 – 70.
- Coutinho A.X.P. *Flora de Portugal (Plantas vasculares): Disposta em chaves dicotomicas*. 2ª Edição. Lisboa: Bertrand, 1939. 560-561.
- Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Ver Pant Biol* 61: 651 – 679.
- Finkelstein R., Gampala S., Rock C. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15 – S45.
- Kobayashi Y., Yamamoto S., Minami H., Kagaya Y., Hattori T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* 16: 1163 – 1177.
- Komatsu K., Nishikawa Y., Ohtsuka T., Taji T., Quatrano R., Tanaka S., Sakata Y. (2009). Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* 70: 327 – 340.
- Koornneef M., Reuling G., Karssen C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 61: 377 – 383.
- Finkelstein R.R., Gampala S.S., Rock C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15 – S45
- Fujii H., Verslues P.E., Zhu J. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 485 – 494.
- Fujita Y., Nakashima K., Yoshida T., Katagiri T., Kidokoro S., Kanamori N., Umezawa T., Fujita M., Maruyama K., Ishiyama K., Kobayashi M., Nakasone S., Yamada K., Ito T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 2123 – 2132.
- Gao Y., Zeng Q., Guo J., Cheng J., Ellis B.E., Chen J-G. (2007). Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52: 1001 – 13.
- Giraudat J., Parcy F., Bertauche N., Gosti F., Leung J., Morris P.C., Bouvier-Durand M., Vartanian N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Molecular Biology* 26: 1557 – 1577.
- Gomez-Cadenas A., Verhey S.D., Holappa L.D., Shen Q., Ho T.H., Walker-Simmons M.K. (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1767–1772.

- Gosti F., Beaudoin N., Serizet C., Webb A.A., Vartanian N., Giraudat J. (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11: 1897–1910.
- Guo J., Zeng Q., Emami M., Ellis B.E., Chen J-G. (2008). The GCR2 Gene Family Is Not Required for ABA Control of Seed Germination and Early Seedling Development in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 3:e2982.
- Hardie D.G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 97 – 131.
- Hrabak E.M., Chan C.W., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 132: 666 – 680.
- Leung J., Merlot, S., Giraudat J. (1997). The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759 – 71.
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P., Guerrier D., Cheddor F., Giraudat J. (1994). *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448 – 1452.
- Li J., Wang X.Q., Watson M.B., Assmann S.M. (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300 – 303.
- Liu X., Yue Y., Li B., Nie Y., Li W., Wu W-H., Ma L. (2007). A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid. *Science* 315: 1712 – 1716.
- Ma Y., Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A., Grills E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064 – 1068.
- Melcher K., Ng L-M., Zhou X.E., Soon F-F., Xu Y., Suino-Powell K.M., Park S.W., Weiner J.J., Fujii H.H., Chinnusamy V., Kovach A., Li J., Wang Y., Li J., Peterson F.C., Jensen D.R., Yong E-L., Volkman B.F., Cutler S. R., Zhu J.K., Xu H.E., (2009). A gate-latch-lock mechanism for signal transduction by abscisic acid receptors. *Nature* 462: 602 – 608.
- Merlot S., Gosti F., Guerrier D., Vavasseur A., Giraudat J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* 25: 295 – 303.
- Meyer K., Leube M., Grill E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452 – 1455.
- Muller A.H., Hansson M. (2009). The Barley Magnesium Chelatase 150-kD Subunit Is Not an Abscisic Acid Receptor. *Plant Physiol.* 150: 157 – 166.
- Mustilli A.C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F., Giraudat J. (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089 – 3099.
- Nakashima K., Fujita Y., Kanamori N., Katagiri T., Umezawa T., Kidokoro S., Maruyama K., Yoshida T., Ishiyama K., Kobayashi M., Shinozaki K., Yamaguchi- Shinozaki K. (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* 50: 1345 – 1363.
- Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield D.W. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14.

- Nishimura N., Yoshida T., Kitahata N., Asami T., Shinozaki K., Hirayama T. (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. *Plant J.* 50: 935 – 949.
- Nishimura N., Yoshida T., Murayama M., Asami T., Shinozaki K., Hirayama T. (2004). Isolation and Characterization of Novel Mutants Affecting the Abscisic Acid Sensitivity of *Arabidopsis* Germination and Seedling Growth. *Plant Cell Physiol.* 45: 1485 – 1499.
- Ohkuma K., Lyon J.L., Addicott F.T., Smith O.E. (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* 142: 1592 – 1593.
- Pandey S., Nelson D.C., Assmann S.M. (2009). Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136: 136 – 48.
- Park S.Y., Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., Zhao Y., Lumba S., Santiago J., Rodrigues A., Chow T.F., Alfred S.E., Bonetta D., Finkelstein R., Provart N.J., Desveaux D., Rodriguez P.L., McCourt P., Zhu J.-K., Schroeder J.I., Volkman B.F., Cutler S.R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068 – 1071.
- Radauer C., Lackner P., Breiteneder H. (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol. Biol.* 8:286.
- Razem F.A., El-Kereamy A., Abrams S.R., Hill R.D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439: 290 – 294.
- Risk J.M., Day C.L., Macknight R.C. (2009). Reevaluation of Abscisic Acid-Binding Assays Shows That G-Protein-Coupled Receptor2 Does Not Bind Abscisic Acid. *Plant Physiol.* 150: 11146 – 11148.
- Risk J.M., Macknight R.C., Day C.L. (2008). FCA does not bind abscisic acid. *Nature* 456: E5 – E6.
- Rodriguez P.L., Benning G., Grill E. (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 421: 185 – 190.
- Rodriguez P.L., Leube M.P., Grill E. (1998). Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Molecular Biology* 38: 879 – 883.
- Rubio S., Rodrigues A., Saez A., Dizon M.B., Galle A., Kim T.H., Santiago J., Flexas J., Schroeder J.I., Rodriguez P.L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* 150: 1345 – 1355.
- Saez A., Apostolova N., Gonzalez-Guzman M., Gonzalez-Garcia M.P., Nicolas C., Lorenzo O., Rodriguez P.L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J.* 37: 354 – 369.
- Saez A., Robert N., Maktabi M.H., Schroeder J.I., Serrano R., Rodriguez P.L. (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* 141: 1389 – 1399.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning – a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, USA.
- Santiago J., Rodrigues A., Saez A., Rubio S., Antoni R., Dupeux F., Park S.Y., Márquez J.A., Cutler S.R., Rodriguez P.L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J.* 60: 575 – 88.
- Schweighofer A., Hirt H., Meskiene I. (2004). Plant PP2C phosphatases:emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236 – 243.
- Shen Y., Wang X., Wu F., Du S., Cao Z., Shang Y., Wang X.-L., Peng C.-C., Yu X.-C., Zhu S.-Y., Fan R.-C., Xu Y.-H., Zhang D.-P. (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823 – 826.

- Tougane K., Komatsu K., Bhyan S.B., Sakata Y., Ishizaki K., Yamato K.T., Kohchi T., Takezawa D. (2010). Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of abscisic acid signaling in land plants: characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-like type 2C protein phosphatase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol.* 152: 1529 – 1543.
- Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T., Kuromori T., Tanokura M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant Cell Physiol.* 11: 1821 – 1839.
- Umezawa T., Sugiyama N., Mizoguchi M., Hayashi S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki K., Ishiama Y., Hirayama T., Shinozaki K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 17588 – 17593.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97: 11632 – 11637.
- Vlad F., Rubio S., Rodrigues A., Sirichandra C., Belin C., Robert N., Leung J., Rodriguez P.L., Laurière C., Merlot S. (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3170 – 3184.
- Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J.R., Shinozaki K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43: 1473 – 1483.
- Yoshida T., Nishimura N., Kitahata N., Kuromori T., Ito T., Asami T., Shinozaki K., Hirayama T. (2006). ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among *Arabidopsis* protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* 140: 115 – 126.
- Ward J.M., Pei Z.M., Schroeder J. (1995). Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *The Plant Cell* Vol. 7, 833 – 844.
- Weiner J.J., Peterson F.C., Volkman B.F., Cutler S.R. (2010). Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 495 – 502.
- Wu F-Q., Xin Q., Cao Z., Liu Z-Q., Du S-Y., Mei C., Zhao C-X., Wang X-F., Shang Y., Jiang T., Zhang X-F., Yan L., Zhao R., Cui Z-N., Liu R., Sun H-L., Yang X-L., Su Z., Zhang D-P. (2009). The Magnesium-Chelatase H Subunit Binds Abscisic Acid and Functions in Abscisic Acid Signaling: New Evidence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150: 1940 – 54.