

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

JOÃO VICTOR ARAUJO DALENOGARI

OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *ORYZA SATIVA*
SUPEREXPRESSANDO O GENE *OsVOZ1*

Porto Alegre

2017/2

JOÃO VICTOR ARAUJO DALENOGARI

**OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *ORYZA SATIVA*
SUPEREXPRESSANDO O GENE OsVOZ1**

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Porto Alegre

2017/2

RESUMO

A população mundial vem crescendo e com isso, a necessidade da produção de maiores quantidades de alimentos. Os danos causados por estresses bióticos e abióticos nas plantações afetam gravemente a economia que gira em torno da agricultura, limitando a produção de alimentos, podendo levar milhões de pessoas à fome e à pobreza. O arroz é um dos grãos mais importantes, tanto economicamente, sendo o principal alimento em muitos países em desenvolvimento, quanto cientificamente, por ser considerado a planta modelo para o estudo de monocotiledôneas. A caracterização funcional de genes corresponde a uma etapa importante para a descoberta de novos alvos potenciais para o melhoramento vegetal, com objetivo de combater esses diferentes agentes estressores. Os genes da família VOZ (*Vascular Plant One Zinc-Finger*) se mostram promissores para a aplicação em estratégias de combates a estresses em plantas. Os genes VOZ foram identificados, primeiramente em *Arabidopsis thaliana* como genes responsivos a diversos estresses bióticos e abióticos. Apesar da importância já demonstrada dos genes VOZ em *A. thaliana*, até o momento nenhum estudo relacionado a essa família foi feito em arroz. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo transformar plantas de arroz (*Oryza sativa*) com o objetivo de superexpressar o gene *OsVoz1*. O plasmídeo pENTR/D-TOPO contendo a sequência codificadora do gene *OsVoz1* foi recombinado, via o sistema Gateway (Invitrogen), para o plasmídeo binário pH7FWG2. Em seguida, pH7FWG2-*OsVoz1* foi introduzido em células de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 para a transformação genética de *O. sativa*. Plantas transgênicas foram regeneradas a partir de calos embriogênicos transformados e se confirmou por PCR que elas são positivas para o transgene. Alguns fenótipos possivelmente relacionados à superexpressão de *OsVoz1* já foram observados. As plantas transformadas apresentaram um tamanho menor, se comparado às selvagens não transformadas, e também apresentaram uma antecipação do tempo de florescimento, havendo o surgimento de panículas 10 dias antes nas plantas transgênicas.

ABSTRACT

The world's population is growing. Along with this increases the need of producing larger quantities of food. The damage caused by biotic and abiotic stresses on plantations severely affects the economy that turn around agriculture, limiting food production, which can lead millions of people to hunger and poverty. Rice is one of the most important grains, both economically, being the main food in many developing countries, and also scientifically, being considered a model plant for the study on monocotyledons. The functional characterization of genes corresponds to an important stage for the discovery of new potential targets for plant breeding, in order to combat these different stressors. The members of the VOZ (Vascular Plant One Zinc-Finger) gene family are promising for application in strategies to combat stresses in plants. VOZ genes were first identified in *Arabidopsis thaliana* as responsive genes to various biotic and abiotic stresses. Despite the already demonstrated importance of the VOZ genes in *A. thaliana*, no studies related to this family have been made in rice. In this context, the present work aimed to transform rice plants (*Oryza sativa*) to overexpress the *OsVoz1* gene. pENTR / D-TOPO plasmid containing the coding sequence of the *OsVoz1* gene was recombined, via Gateway system (Invitrogen), to the binary plasmid pH7FWG2. Then, pH7FWG2-*OsVoz1* was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 cells for the genetic transformation of *O. sativa*. Transgenic plants were regenerated from transformed embryogenic callus and it was confirmed by PCR as positive for the transgene. Some phenotypes possibly related to the overexpression of *OsVoz1* have already been observed. The transformed plants presented a smaller size, when compared to the non-transformed plants, and also presented an anticipation of the time of flowering, with the appearance of panicles 10 days before compared to non-transformed plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do vetor de entrada pENTR/D-TOPO.....	17
Figura 2. Mapa do vetor de expressão em planta pH7FWG2.....	17
Figura 3. Esquema resumido da transformação e regeneração de plantas.	21
Figura 4. Gel de eletroforese em agarose do produto de PCR visando confirmar a presença do gene OsVoz1 no plasmídeo pENTR/D-TOPO.....	26
Figura 5. Eletroforese em gene de agarose do produto de PCR visando confirmar a presença do gene OsVoz1 no plasmídeo pH7FWG2.	27
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do produto da clivagem do plasmídeo pH7FWG2-OsVoz1.	28
Figura 7. Eletroforese em gene de agarose do produto de PCR visando confirmar a inserção do plasmídeo pH7FWG2-OsVoz1 em <i>A. tumefaciens</i>	29
Figura 8. Calos embriogênicos de arroz em meio NB de proliferação NB.....	30
Figura 9. Calos embriogênicos de arroz co-cultivados com <i>A. tumefaciens</i> contendo pH7FWG2-OsVoz1 em meio de seleção HTC.....	30
Figura 10. Plantas em regeneração potencialmente contendo pH7FWG2-OsVoz1.	32
Figura 11. Plantas saudáveis regeneradas cultivadas em meio de MS.....	32
Figura 12. Plantas regeneradas com 12 semanas de crescimento.	33
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR das plantas regeneradas, comprovando o transgene.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios utilizados para transformação e regeneração de plantas.....	22
Tabela 2. Sequências dos primers projetados para o gene OsVoz1 e hpt.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MS – Meio Murashige & Skoog

µL – microlitro

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeira da Polimerase

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic acid*, Ácido Desoxirribonucleico

RNA – do inglês *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico

mg – Miligrama

L – Litro

mL - Mililitro

UV – Ultravioleta

dNTP – do inglês *Deoxyribonucleotide*, Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

h - Hora

nm - Nanômetro

min - Minuto

LB – Meio Luria-Bertani

SUMARIO

1. Introdução	9
1.1. Arroz como planta modelo	9
1.2. Transformação genética de plantas	9
1.3. Transformação por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
1.4. Estresses bióticos e abióticos	12
1.5. Os genes VOZ	13
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
2.2.1. Amplificação do gene OsVoz1 de arroz;.....	15
2.2.2. Obtenção de vetor de expressão em planta contendo o gene de interesse;	15
2.2.3. Transformação de calos embriogênicos de arroz contendo a construção obtida;	15
2.2.4. Regeneração de plantas transformadas;.....	15
2.2.5. Realização de análises moleculares preliminares para confirmação da transgenia.	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Amplificação e Clonagem do Gene OsVoz1.....	16
3.1.1. Vetores Utilizados	16
3.1.2. Amplificação do Gene.....	18
3.1.3. Recombinação dos Vetores.....	18
3.2. Transformação de bactérias.....	18
3.2.1. Transformação de <i>Escherichia coli</i>	18
3.2.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
3.3. Transformação de Calos e Regeneração de Plantas.....	19
3.3.1. Obtenção de Calos de Arroz.....	19
3.3.2. Transformação de Calos Embriogênicos.....	20
3.3.3. Regeneração de Plantas.....	21
3.4. Análises Moleculares.....	22
3.4.1. Extração de DNA	22
3.4.2. Reação em Cadeira da Polimerase (PCR).....	23
4. Resultados e Discussão	25
4.1. Clonagem de OsVoz1 no plasmídeo binário pH7FWG2.....	25
4.2. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> AGL1 com pH7FWG2–OsVoz1.....	28
4.3. Transformação de <i>Oryza sativa</i> via <i>A. tumefaciens</i> contendo pH7FWG2-OsVoz1	29
4.4. Regeneração de plantas de <i>O. sativa</i> transformadas.....	31
4.5. Confirmação da presença de <i>OsVoz1</i> em <i>O. sativa</i>	34
5. Conclusões e Perspectivas	36

1. Introdução

1.1. Arroz como planta modelo

A agricultura vem crescendo a cada ano, tanto em nível nacional quanto mundial. Apesar desse aumento, estima-se que a produção de alimento, principalmente de grãos e cereais, precisará ser dobrada nos próximos 30 anos. O arroz é um dos grãos mais importantes em termos de valor econômico. Anualmente, é produzido um total de cerca de 590 milhões de toneladas de arroz. Esse cereal é considerado também o principal alimento em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e na Oceania. O Brasil se encontra entre os 10 maiores produtores de arroz mundial, com cerca de 11 milhões de toneladas de produção anual, com destaque, principalmente, para a região sul, que é responsável por cerca de 60% da produção desse cereal no país (1,2). Entretanto, nos últimos seis anos, a produção mundial aumentou cerca de 1,09% ao ano, enquanto a população cresceu 1,32% e o consumo 1,27%, justificando uma grande preocupação com a demanda desse produto no futuro (1).

Além de sua importância econômica, o arroz também tem grande destaque do campo da ciência, sendo considerado a planta modelo para estudos de monocotiledôneas, por possuir o menor genoma entre elas, de aproximadamente 430 MB e já sequenciado (3,4). Os dados disponibilizados com o sequenciamento do genoma do arroz possibilitaram avanços nos estudos genômicos e moleculares, visando o melhoramento vegetal de cereais. Além de já ter o seu genoma completamente sequenciado e anotado, o arroz também se destaca como modelo por possuir um protocolo de transformação genética eficiente, o que permite a manipulação de genes visando o estudo funcional dos mesmos (5,6).

1.2. Transformação genética de plantas

Desde que começou a domesticar as plantas, há milhares de anos atrás, o homem vem buscando sempre formas de poder melhorá-las cada vez mais. Aumentar seu rendimento, melhorar qualidade nutricional, resistência a pragas e estresses abióticos, entre outros, são características buscadas para otimizar cada vez mais a

produção das plantas. O cruzamento de plantas da mesma espécie em busca de unir as melhores características de cada uma delas foi muito utilizado, e foi o responsável pela grande variedade de plantas que temos hoje. Porém, esse processo apresenta muitas limitações, como por exemplo, depender de um grande número de cruzamentos para que todas as características desejadas possam ser mantidas, bem como a limitação devido à incompatibilidade genética entre as espécies que não podem cruzar entre si (7).

Com os avanços no conhecimento da engenharia genética e da biotecnologia, novas ferramentas foram desenvolvidas para o melhoramento genético. Com a técnica de DNA recombinante, foi possível abrir ainda mais o leque de oportunidades de novas características a serem introduzidas numa espécie, não se limitando a apenas características que possam ser adquiridas através de cruzamentos. Assim, é possível introduzir em uma planta genes de qualquer origem, seja animal, vegetal ou até microorganismo. A geração das primeiras plantas transgênicas ocorreu na década de 1980 (8–10).

A caracterização funcional de genes corresponde a uma etapa importante para a elucidação de seu papel na planta e também para o descobrimento de novos potenciais alvos para o melhoramento vegetal. Dentre as diversas técnicas de biologia molecular para a caracterização funcional de genes, o silenciamento e a superexpressão de genes estão entre as mais utilizadas. O silenciamento consiste na redução drástica da expressão de um gene na planta, podendo ser até inexistente (aí chamado de nocaute ou *knockout*), e tem como intuito o estudo dos efeitos fenotípicos da ausência daquela proteína. A superexpressão consiste em aumentar a quantidade de uma determinada proteína e averiguar os efeitos produzidos no organismo (10–12).

1.3. Transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

Existem hoje diversas estratégias para a transformação de plantas. Dentre elas, pode-se citar a biobalística, a eletroporação, a utilização de polietilenoglicol e a utilização de um vetor como *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*.

O método utilizando *A. tumefaciens* foi desenvolvido a partir de estudos de uma doença em plantas conhecida como galha-da-coroa, que é o aparecimento de um tumor no tecido vegetal, e vem sendo utilizado por décadas para gerar plantas transgênicas (13). Isso pelo fato da metodologia mediada por *A. tumefaciens* possuir alta eficiência e introduzir um baixo número de cópias do transgene. A aparição das galhas é resultado de um processo natural de transferência dos genes entre a bactéria e as células vegetais. Um fragmento de DNA plasmidial, chamado de T-DNA (*transferred DNA*) é integrado ao genoma das células (14). O T-DNA corresponde a um segmento do plasmídeo Ti (*tumor-inducing*), e é delimitado por uma sequência de 25 pb conhecidas como borda esquerda (LB – *Left Border*) e borda direita (RB – *Right Border*) (14).

O processo de transferência dos genes presentes no T-DNA é bem complexo, envolvendo diverso número de genes. Dentro do cromossomo bacteriano, existem os genes *chv*, enquanto no plasmídeo Ti existem os genes *vir*, que são necessários para o processo de transferência (15).

Ao longo do tempo, esse mecanismo foi bastante modificado e otimizado, a fim de viabilizar a utilização da *A. tumefaciens* como método de transformação de plantas. Primeiro descobriu-se que para esse ser um processo eficiente, os genes endógenos do T-DNA, que são os causadores do tumor da galha, deveriam ser inativados. Foi descoberto, também, que a única região que importa para a transferência do T-DNA são as bordas esquerda e direita, podendo os genes exógenos, então, serem inseridos entre essas regiões para a utilização desse mecanismo de transferência. Foi visto, também, que o plasmídeo Ti é muito grande e difícil de ser manipulado. Para isso, foram criados os vetores binários, onde o T-DNA se encontraria em um segundo plasmídeo, deixando o plasmídeo Ti apenas com os genes *vir*, importantes para a transferência, tornando-os mais fáceis de serem manipulados (14,16). A interação entre a planta e a bactéria envolve uma série de sinalizadores químicos. Para isso, compostos como acetoseringona são utilizados para mimetizar essas sinalizações, aumentando a eficiência do processo (17).

1.4. Estresses bióticos e abióticos

Por se tratarem de organismos sésseis, as plantas são bastante vulneráveis a diversos tipos de estresse, que têm efeito adversos no crescimento vegetal e na produtividade da planta. Esses estresses podem ser divididos em dois tipos: bióticos, como por exemplo, ataque de insetos e fungos; e abióticos, relacionados a fatores ambientais como seca, falta de nutrientes e déficit hídrico, entre outros. Como resposta a essas várias adversidades, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram muitas formas de defesas físicas, como a presença de cutículas, e químicas, como hormônios e proteínas, que podem resultar na tolerância a esses estresses. Essas respostas envolvem mecanismos que controlam as respostas das plantas às mudanças do ambiente através da expressão de uma variedade de genes, produzindo uma rede de sinalização que permite a planta perceber e responder aos estresses ambientais (11,18).

Os hormônios vegetais, por exemplo, constituem uma classe muito importante de substâncias químicas responsáveis pelo desenvolvimento da planta e também ao combate aos diferentes tipos de estresses. Eles são responsáveis pela percepção e regulação de uma cascata de sinalização envolvendo genes de resposta à diferentes adversidades. O ácido abscísico (ABA) é um fitohormônio importante para a tolerância da planta aos estresses abióticos de seca e altas quantidades de sal, sendo produzido sob condições de déficit hídrico (19,20). Os hormônios ácido Salicílico e ácido Jasmônico estão diretamente relacionados com a resposta da planta a ataques de patógenos (21,22). Além dos hormônios, outra classe que pode ser citada, por exemplo, é a das peroxidases, que são enzimas responsáveis pelo controle da quantidade de espécies reativas de oxigênio, que, em baixas quantidades, também atuam como moléculas sinalizadoras de estresses bióticos e abióticos, mas em altas concentrações podem levar à morte celular (23,24).

Dentre as diversas classes de hormônios, enzimas e proteínas responsáveis pela resposta a estresses, uma das mais importantes são os fatores de transcrição. Eles são os grandes responsáveis pela regulação das diversas respostas ao estresse, através do controle da expressão dos diversos genes, tornando as respostas bastante eficientes (18,25).

1.5. Os genes VOZ

A família de proteínas VOZ (*Vascular Plant One Zinc-Finger*) compreende fatores de transcrição exclusivos de plantas. Foram identificados, primeiramente em *Arabidopsis thaliana*, dois membros dessa família gênica, AtVOZ1 e AtVOZ2 (11). Homólogos desses genes já foram encontrados em diversas plantas vasculares, e estão inseridas no grupo de fatores de transcrição NAC. Foi demonstrado que AtVOZ1 é especificamente expresso no floema e AtVOZ2 na raiz (11). Estas proteínas apresentam 53% de similaridade de sequência de aminoácidos e um motivo “dedo de zinco” de ligação ao DNA (11). Foram identificadas duas regiões conservadas, denominadas domínio A e domínio B a partir do alinhamento da sequência da proteína de *A. thaliana* e seus homólogos em arroz e em *Physcomitrella patens* (11). AtVOZ2 liga-se como dímero através do domínio B, a uma sequência palíndrica específica, GCGTNx7ACGC, tendo também a função de ligação ao DNA. Devido a sua dupla função de dimerização e ligação ao DNA, o domínio B também é conhecido como domínio VOZ (11).

Já foi demonstrado em *A. thaliana*, que os genes VOZ respondem a diversos estresses bióticos e abióticos. O *knockout* desses genes resultou em plantas com aumento da tolerância ao congelamento e a seca. Por outro lado, a resistência ao fungo *Colletotrichum higginsianum* e a bactéria *Pseudomonas syringae* foi reduzida drasticamente (25). Por outro lado, a superexpressão do gene VOZ2 reduziu a tolerância a estresses abióticos e aumentou a resistência aos patógenos (26). Além do seu papel na regulação da resposta da planta ao estresses, foi demonstrado que os genes VOZ desempenham um papel fundamental na regulação do tempo de florescimento em *A. thaliana* (27). VOZ1 e VOZ2 interagem com o fitocromo B, proteína fotorreceptora de luz vermelha. Esse fotorreceptor tem a função de reprimir genes de resposta ao florescimento. Os autores demonstraram que os genes VOZ, quando no núcleo, atuam na ativação da transcrição de genes, como o *Flowering Locus T* (FT), promovendo o florescimento. Esse efeito é, então, regulado pela interação phyB-VOZ, inibindo a transcrição desses genes (28).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as enzimas glutatona peroxidases codificadas pelos genes *OsGPX2* e *OsGPX5*, que tem papel importante no controle da produção de espécies reativas de oxigênio, interagem com a proteína

OsVOZ1 (Machado et al, resultados não publicados). A importância funcional dessa interação depende da caracterização detalhada das duas proteínas envolvidas. Apesar da importância já demonstrada dos genes VOZ em *A. thaliana*, até o momento nenhum estudo relacionado a essa família foi feito em arroz.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo gerar plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa*) superexpressando o gene *OsVoz1* para posterior caracterização funcional desse gene.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Amplificação do gene *OsVoz1* de arroz;

2.2.2. Obtenção de vetor de expressão em planta contendo o gene de interesse;

2.2.3. Transformação de calos embriogênicos de arroz contendo a construção obtida;

2.2.4. Regeneração de plantas transformadas;

2.2.5. Realização de análises moleculares preliminares para confirmação da transgenia.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amplificação e Clonagem do Gene OsVoz1

3.1.1. Vetores Utilizados

Foram utilizados dois vetores: um vetor de entrada, pENTR/D-TOPO da Invitrogen (Figura 1) e um vetor de expressão em plantas, pH7FWG2 (29) (Figura 2).

O pENTR/D-TOPO utiliza a propriedade da topoisomerase de ligar duas fitas de DNA para inserir o gene de interesse no plasmídeo. O plasmídeo também possui duas regiões de recombinação para a utilização do sistema Gateway da Invitrogen. Possui também um gene de resistência ao antibiótico Canamicina.

O vetor de expressão pH7FWG2 possui um gene de resistência ao antibiótico spectinomomicina para a seleção da bactéria transformada. Para a seleção das plantas transformadas, o vetor expressa o gene *hpt* que confere resistência a higromicina. Esse plasmídeo foi modificado pelo nosso grupo de pesquisa: O promotor original 35S foi substituído pelo promotor da ubiquitina do milho, uma vez que este último é mais eficiente em plantas monocotiledôneas. O plasmídeo também possui duas regiões de recombinação para a utilização do sistema de recombinação Gateway.

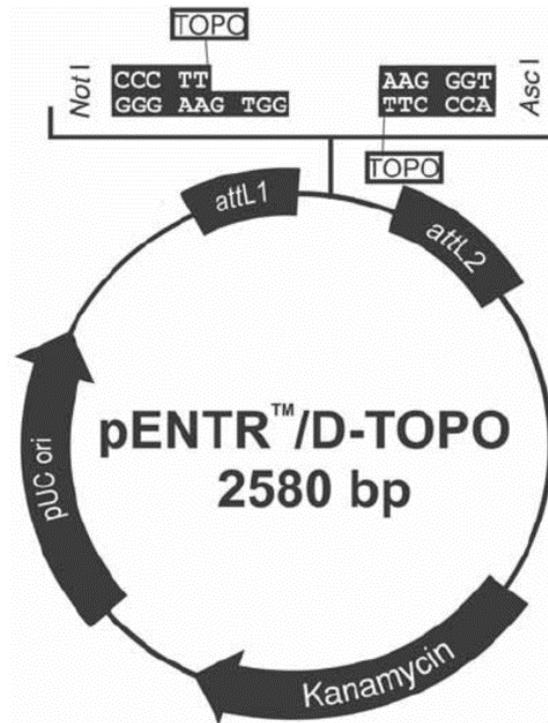


Figura 1. Mapa do vetor de entrada pENTR/D-TOPO. Imagem disponível em https://www.researchgate.net/figure/Entry-vector-pENTR-D-TOPO_227130539.

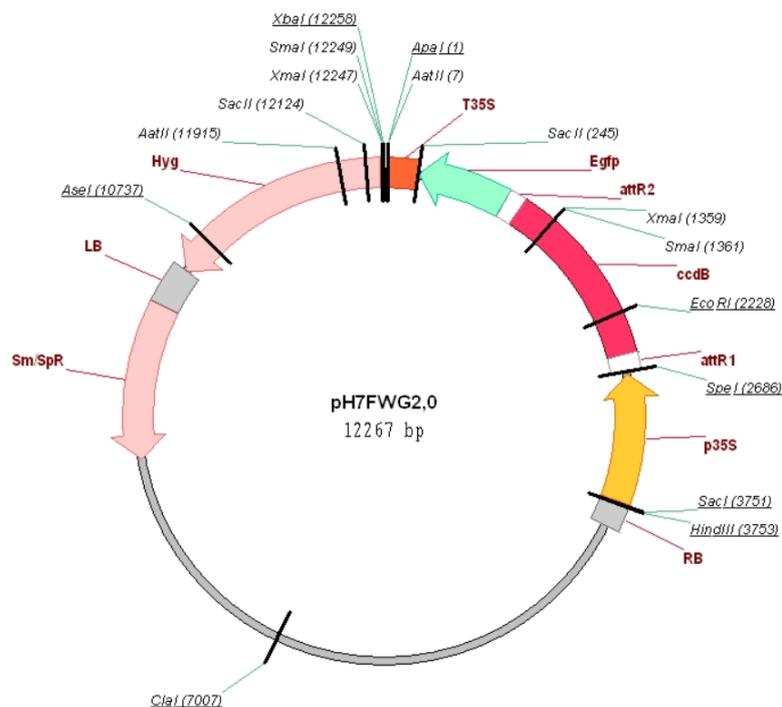


Figura 2. Mapa do vetor de expressão em planta pH7FWG2. O vetor utilizado teve o seu promotor 35S substituído pelo promotor da ubiquitina do milho. Imagem disponível em <https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pH7FWG2/search/index/>.

3.1.2. Amplificação do Gene

Oligonucleotídeos (*primers*) específicos foram projetados para o gene *OsVoz1* (LOC_Os01g54930.1) visando a amplificação da região codificante do gene através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction, PCR*), a partir de cDNA obtido através de RNA extraído de folha seguindo o método TRIzol® (Invitrogen) e posterior ação de transcriptase reversa. Essa sequência foi inserida no vetor de entrada pENTR/D-TOPO, para posterior recombinação no vetor de expressão em plantas pH7FWG2.

3.1.3. Recombinação dos Vetores

Para a obtenção do vetor de expressão, foi utilizado o sistema de recombinação Gateway, com protocolo da Invitrogen. Para isso, 150 ng do vetor de entrada (pENTR/D-TOPO) foram adicionados, bem como 150 ng do vetor de expressão pH7FWG2. O volume foi completado com água para 10 µL. Foi adicionado, então, 2 µL da LR Clonase. A reação foi então incubada a 25°C por 1 h. Em seguida, foi adicionado 1 µL de proteinase K para terminar a reação. Bactérias competentes foram transformadas com o produto da recombinação e crescidas em meio de seleção contendo o antibiótico adequado, conforme descrito no item 2.1.1.

3.2. Transformação de bactérias

3.2.1. Transformação de *Escherichia coli*

Foram utilizadas células de *E. coli* omnimax termocompetentes, para a multiplicação dos plasmídeos, utilizando protocolo de choque térmico da ThermoFisher. Para a transformação, aproximadamente 2 µL de DNA (10 pg - 100 ng) foram adicionados a 50 µL de células competentes. A mistura foi incubada por aproximadamente 30 min no gelo e em seguida incubada a 42°C por 60 s. A suspensão bacteriana foi, então, incubada em gelo por mais 2 min. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado às células e foi incubado por 1h a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm. Por último, as bactérias foram inoculadas em meio LB sólido

contendo o antibiótico de seleção adequado para cada plasmídeo e mantidas a 37°C por 24h.

3.2.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Visando obter células de *A. tumefaciens* cepa AGL1 competentes para eletroporação, uma pré-cultura de 5 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de rifampicina foi inoculada com uma colônia isolada da bactéria. Depois de 24h de incubação a 28°C sob agitação constante de 180 rpm, 500 µL da pré-cultura foram inoculados em 100 mL de LB líquido contendo rifampicina. O inóculo foi mantido a 28°C sob agitação constante até atingir a D.O de 0,6 a 600 nm, quando foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com água estéril e centrifugado por mais 2 vezes. As células foram ressuspensas no final em uma solução contendo 10% de glicerol estéril, aliqüotadas em volume de 100 µL e estocadas à -80°C. As alíquotas eram descongeladas somente para transformação (30).

Para a transformação, aproximadamente 2 µL do plasmídeo obtido no item 1.3 foram adicionados a 100 µL de células AGL1 competentes. A mistura foi mantida no gelo por 2 min. Após esse período, a suspensão contendo DNA e célula foi transferida para uma cubeta e submetida a um pulso elétrico de 2500 volts. A seguir, 1 mL de LB líquido foi adicionado às células e a suspensão foi incubada por 2h a 28°C sob agitação de 180 rpm. Por último, as bactérias foram inoculadas em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de spectinomicina (antibiótico de resistência do plasmídeo pH7FWG2) e mantidas a 28°C por 48h (30).

3.3. Transformação de Calos e Regeneração de Plantas

3.3.1. Obtenção de Calos de Arroz

A cultivar de arroz *japônica*, variedade Nipponbare, foi utilizada na transformação. Essa variedade foi escolhida por possuir um protocolo de transformação genética bem estabelecido.

Foram utilizados calos embriogênicos de arroz como tecido alvo para a transformação. Os calos foram induzidos a partir de sementes de arroz não transformados. As sementes tiveram suas cascas retiradas e foram esterilizadas por 1 min em etanol 70%, 30 min em hipoclorito de sódio 2%, sob agitação e posteriores lavagens com água destilada estéril. As sementes foram plaqueadas em meio de indução de calos N6D (Tabela 1) e mantidos a 25°C em fotoperíodo de 12h.

3.3.2. Transformação de Calos Embriogênicos

A transformação de calos embriogênicos de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada conforme protocolo adaptado de Upadhyaya e colaboradores (6). Calos embriogênicos foram selecionados e repicados em meio de cultura NB (Tabela 1) para proliferação.

A. Tumefaciens contendo o vetor pH7FWG2-OsVoz1 foram cultivadas previamente em um pré-inóculo de meio LB por 24h a 28°C sob agitação de 180 rpm e depois em um inóculo de 100 mL onde foram adicionados 500 µL do pré-inóculo e mantido sob as mesmas condições (6).

As bactérias cultivadas foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min e foram transferidas para 100 mL de meio NB líquido suplementado com 100 µM de acetoseringona (NBA). Os calos foram adicionados a este meio e incubados durante 30 min a temperatura ambiente. Os calos foram transferidos para placas contendo NBA sólido e mantidos por três dias a 28°C no escuro. Após esse período, os calos passaram por cinco lavagens de 10 min com água destilada estéril contendo timentina (150 µM), sendo transferidos, posteriormente para meio de seleção HTC (Meio NB contendo higromicina 50 µg/mL, timentina 100 µg/mL e cefotaxima 200 µg/mL) e mantidos no escuro por 30 dias a 28°C. Os calos não transformados não cresceram no meio de seleção e foram eliminados. Calos transformados cresceram e foram repicados para novo meio HTC para proliferação (6).

3.3.3. Regeneração de Plantas

Após a fase de seleção, os calos foram transferidos para o meio de regeneração descrito por Ozawa e colaboradores (31). Os calos foram incubados a 28°C sob fotoperíodo de 12h por 30 dias. Em seguida, os calos que apresentaram parte aérea verde e raízes foram transferidos para meio $\frac{1}{2}$ MS acrescido de higromicina (50 μ g/mL) (32). As plantas transformadas foram transferidas para substrato vermiculita, inicialmente protegidas por saco plástico para aclimação, sendo este removido aos poucos durante duas semanas. Após a aclimação, as plantas foram transferidas para vasos com solo, submergidas em água e colocadas sob fotoperíodo de 12h. Todo o procedimento resumido de transformação e regeneração de plantas pode ser encontrado na Figura 3.

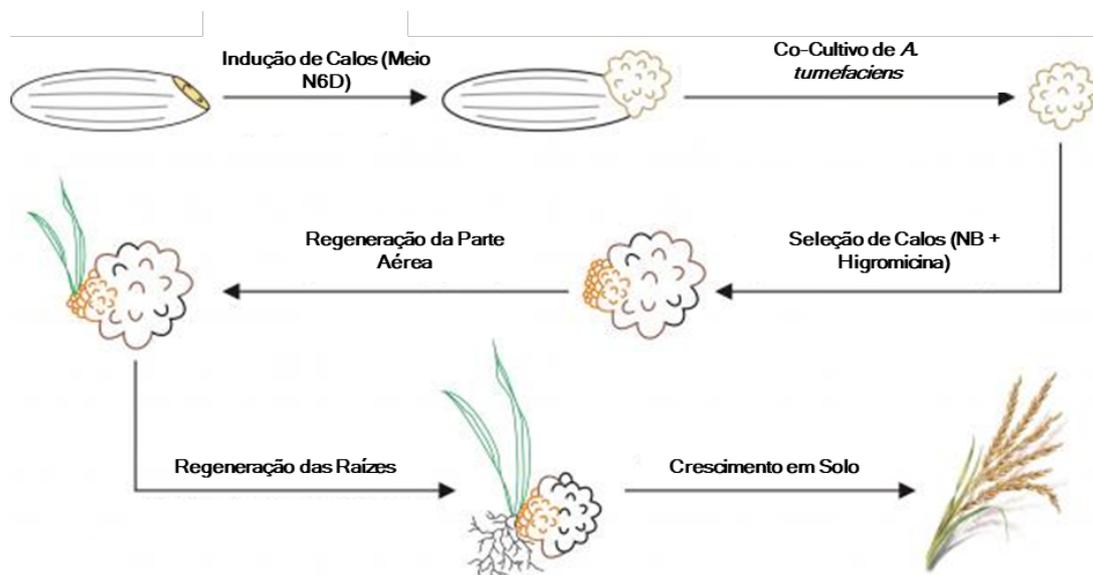


Figura 3. Esquema resumido da transformação e regeneração de plantas.

N6D – Indução de calos	1 litro
Macro elementos N6 (10x)	100ml
Micro elementos N6 (1000x)	1 ml
Vitaminas N6 (100x)	10 ml
FeEDTA (100X)	10ml
Mio-inositol	0,1g
Caseína hidrolisada	0,3g
Prolina	2,9g
2,4-D (1mg/ml)*	2ml
Sacarose	30g
Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M	
Fitigel	3g
H ₂ O até 1 litro	Autoclavar

HTC – Seleção	1 litro
Meio NB	1 litro
Higromicina (50mg/ml)	1ml
Timentina (300mg/ml)	500µl
Cefotaxina (200mg/ml)	500µl

NB – Sub cultura	1 litro
Macro elementos N6 (10x)	100ml
Micro elementos B5 (100x)	10 ml
Vitaminas B5 (100x)	10ml
FeEDTA (20mM)	10ml
2,4-D (1mg/ml)	2 ml
Sacarose	30g
Prolina	0,5g
Glutamina	0,5g
Caseína hidrolisada	0,3g
Ajustar pH para 5,8-5,85 com KOH 1M	
Fitigel	3g
H ₂ O até 1 litro	Autoclavar

NBA – Co-cultivo	1 litro
Meio NB	1 litro
Acetosseringona (1000x)	1ml

Ozawa – Regeneração	1 litro
MS basal medium	4,4g
Caseína Hidrolisada	2g
Sacarose	30g
Sorbitol	20g
KINETIN (100 mg/l)	25ml
ANA (200mg/l)	500µl
Ajustar pH para 5,8-5,85 com KOH 1M	
Fitigel	4g
H ₂ O até 1 litro	Autoclavar

Tabela 1. Composição dos meios utilizados para transformação e regeneração de plantas.

3.4. Análises Moleculares

3.4.1. Extração de DNA

Foi utilizado protocolo adaptado de Murray e colaboradores (33). Material foliar de arroz foi pulverizado em nitrogênio líquido dentro de tubos de microcentrifuga

utilizando pistilos. A cada tubo foram adicionados 0,6 mL de tampão de extração (Tris/HCL 10 mM pH8, EDTA 1 mM, SDS 1%) e a mistura foi agitada em um vórtex por 30 s. Após uma incubação à 65°C por 1 h, foram adicionados 3 µL de solução de RNase a 5 mg/mL e a mistura foi incubada durante 30 min à 37°C.

Após centrifugação à 16.000 xg por 3 min, foi adicionado à fase aquosa 200 µL de acetato de amônia a 6 M e a mistura foi agitada em vórtex por 30 s e centrifugada por 5 minutos a 13.000 xg. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) sendo a mistura agitada em um vórtex por 30 s e centrifugada por 10 min.

A fase aquosa foi recuperada em outro tubo e misturada a 600 µL de isopropanol, por inversão. Após a centrifugação por 5 min a 13.000 xg, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 3x com etanol 70%. O precipitado foi seco em estufa a 37°C por 15 min e solubilizado em água ultrapura estéril e estocado a -20°C.

3.4.2. Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação dos DNAs genômico e plasmidial foram realizadas usando *primers* específicos para o gene *OsVoz1* e para o gene *hpt* de resistência a higromicina (Tabela 2). Para a reação, foram adicionados 2 µL de DNA, 0,5 µL de dNTP a 10 mM, 2 µL de tampão de PCR 10x concentrato (Tris/HCl a 100 mM pH8, KCl a 500 mM), 1 µL de MgCl₂ a 10 mM, 1 µL de cada *primer* a 10 mM (*forward* e *reverse*), 0,2 µL de Taq DNA-polimerase (5 U/ µL) e 12,3 µL de água ultrapura estéril. As condições utilizadas na amplificação foram: 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (60°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min). O último ciclo foi seguido de uma extensão final de 5 min a 72°C. A amplificação e tamanho dos fragmentos de DNA foram confirmados por eletroforese em gel de agarose.

<i>Primer hpt</i>	Sequência	Temperatura de Anelamento
<i>Primer senso</i>	5' GAGCCTGACCTATTGCATCTCC3'	60 °C
<i>Primer antissenso</i>	5'GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG3'	
<i>Primer OsVoz1</i>	Sequência	Temperatura de Anelamento
<i>Primer senso</i>	5'CACCCGAGGTCCCAAGTAGCTTCT3'	60 °C
<i>Primer antissenso</i>	5'ATGGCGGCTACAACACTACAAG3'	

Tabela 2. Sequências dos primers projetados para o gene OsVoz1 e hpt.

4. Resultados e Discussão

4.1. Clonagem de *OsVoz1* no plasmídeo binário pH7FWG2

A primeira etapa do presente trabalho consistiu na recombinação do gene *OsVoz1* do vetor de entrada pENTR/D-TOPO para o vetor de expressão pH7FWG2. O plasmídeo pENTR/D-TOPO contendo o gene *OsVoz1* já havia sido obtido previamente em nosso laboratório (Machado 2017, resultados não publicados). O primeiro passo foi a confirmação da presença do gene *OsVoz1* no plasmídeo pENTR/D-TOPO através de uma reação de PCR utilizando *primers* específicos, conforme descrito no item 2.4.2 da metodologia. A amplificação por PCR resultou em uma banda de aproximadamente 1259 pb, conforme esperado (Figura 4).

O Sistema Gateway da Invitrogen é um sistema de clonagem de sequências de DNA que utiliza as propriedades de recombinação do bacteriófago Lambda. As sequências de DNA podem ser facilmente transferidas entre diferentes vetores utilizando os sítios específicos *attL1/attL2* presente no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e *attR1/attR2* presente no vetor de destino pH7FWG2 (29). Comparado ao método de clonagem baseado no uso de enzimas de restrição, o sistema Gateway tem uma maior eficiência, podendo até se tornar escalonável para a geração de bibliotecas de expressão, por exemplo (34,35).

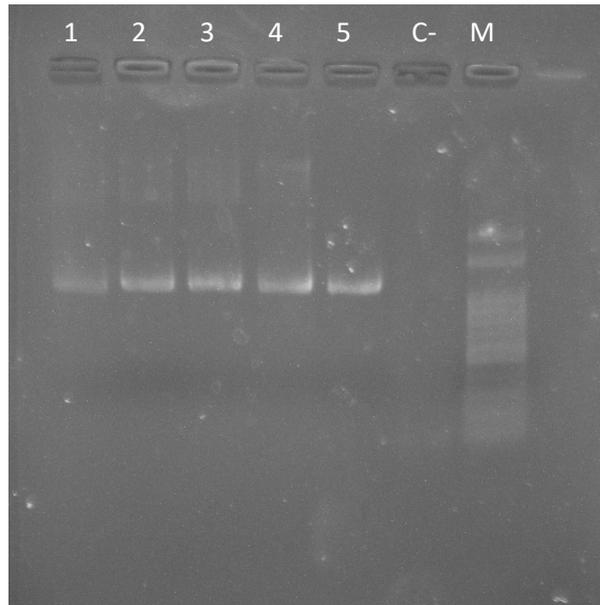


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR visando confirmar a presença do gene *OsVoz1* no plasmídeo pENTR/D-TOPO. Primers específicos ao fragmento de 1259 pb do gene *OsVoz1* foram utilizados na reação. A presença da banda permitiu confirmar a clonagem do gene no plasmídeo pENTR/D-TOPO. 1-4 amostras de minipreparação de plasmídeos pENTR/D-TOPO-VOZ1 a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX. 5 controle positivo, ou seja, pENTR/D-TOPO purificado. C- controle negativo, ou seja, mistura de reação sem adição de DNA. M marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Ludwig).

Uma vez confirmada a clonagem do gene *OsVOz1* no plasmídeo de entrada, o próximo passo foi a transferência do inserto para o plasmídeo pH7FWG2 de expressão em plantas. A transferência foi feita por recombinação utilizando o sistema Gateway (Invitrogen) com o uso da recombinase LR Clonase (Invitrogen), conforme descrito no item 3.1.3 da metodologia. Células termocompetentes de *Escherichia coli* OmniMAX foram transformadas com os produtos da reação de recombinação, o que resultou em colônias selecionadas com o antibiótico espectinomomicina, marca de seleção do plasmídeo pH7FWG2. Três dessas colônias foram inoculadas para extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina para posterior confirmação da inserção do gene por PCR (Figura 5). Todas as 3 colônias analisadas resultaram em amplificação do gene de tamanho esperado (1259 pb), confirmando a clonagem. Além disso, a inserção do gene no plasmídeo foi ainda verificada por clivagem utilizando a enzima *ApaI*. O plasmídeo pH7FWG2-*OsVoz1* apresenta 2 sítios de clivagem para essa enzima. Conforme esperado, foi observada a presença das duas bandas resultantes da clivagem com *ApaI*, diferente do resultado da clivagem da enzima com

o plasmídeo pENTR D-TOPO (Figura 6). Uma das colônias positivas foi utilizada para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

A utilização de enzimas de restrição como uma forma de verificar um plasmídeo é uma metodologia bastante eficiente. Neste trabalho, a utilização de enzimas de restrição, bem como a utilização do antibiótico de seleção foram eficientes para diferenciar o plasmídeo de entrada e o plasmídeo de expressão pH7FWG2.

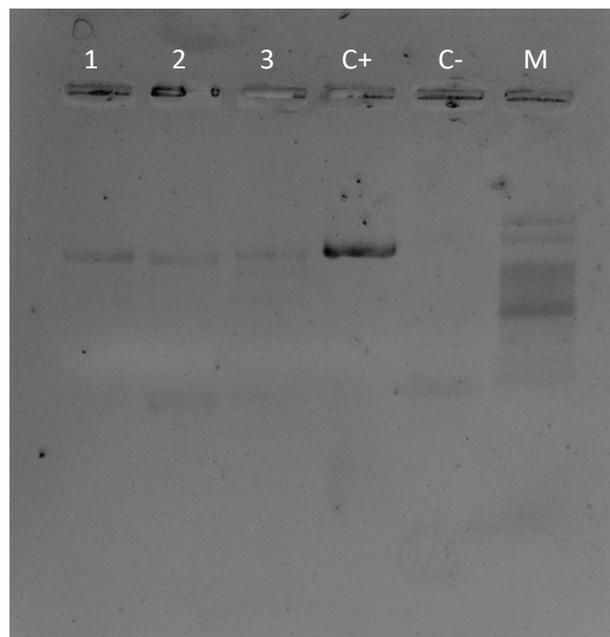


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR visando confirmar a presença do gene *OsVoz1* no plasmídeo pH7FWG2. Primers específicos para o gene *OsVoz1* foram utilizados na reação. A presença da banda de 1259 pb permitiu confirmar a presença do gene no plasmídeo pH7FWG2. 1-3 amostras de minipreparação de plasmídeos pH7FWG2 a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX. C+ controle positivo, ou seja, produto da PCR utilizando pENTR/D-TOPO-*OsVoz1* purificado como molde da reação. C- controle negativo, mistura de reação sem adição de DNA. M marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Ludwig).

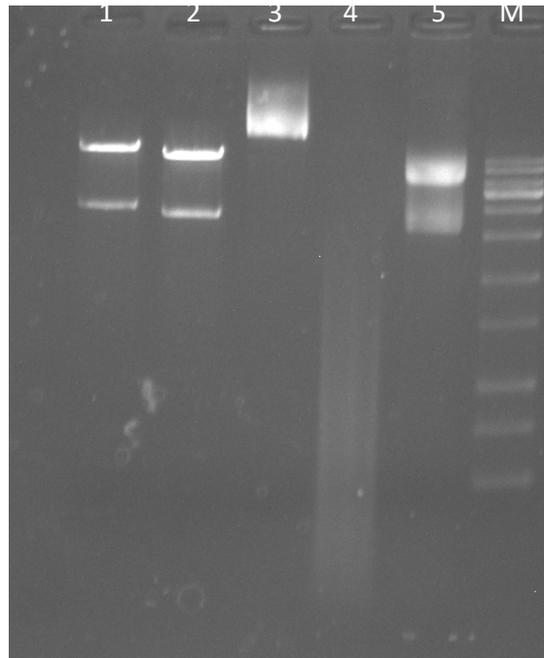


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do produto da clivagem do plasmídeo pH7FWG2-OsVoz1. Plasmídeos pH7FWG2-OsVoz1 minipreparados a partir das colônias foram clivados com a enzima de restrição Apal. Concomitantemente, o plasmídeo pENTR-OsVoz1 também foi clivado com essa enzima para comparação, mostrando a diferença dos plasmídeos. 1-2 minipreparação de plasmídeos pH7FWG2 a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX clivado. 3 plasmídeo pH7FWG2-OsVoz1 não clivado. 4 pENTR-OsVoz1 clivado. 5 pENTR-OsVoz1 não clivado. M marcador de tamanho molecular de DNA de 1 kb (Ludwig).

4.2. Transformação de *A. tumefaciens* AGL1 com pH7FWG2–OsVoz1

A transformação de *A. tumefaciens* com o vetor de expressão em plantas pH7FWG2-OsVoz1, pelo método de eletroporação, foi realizado conforme descrito no item 3.2.2. Foram obtidas colônias selecionadas com os antibióticos espectinomomicina (para a seleção do plasmídeo) e Rifampicina (para a seleção da *A. tumefaciens* AGL1). Oito colônias foram utilizadas para extração de plasmídeo para a confirmação por PCR utilizando *primers* específicos do gene *OsVoz1*. Todas as colônias analisadas foram consideradas positivas para o gene e, conseqüentemente, para o plasmídeo pH7FWG2-OsVoz1 (Figura 7).

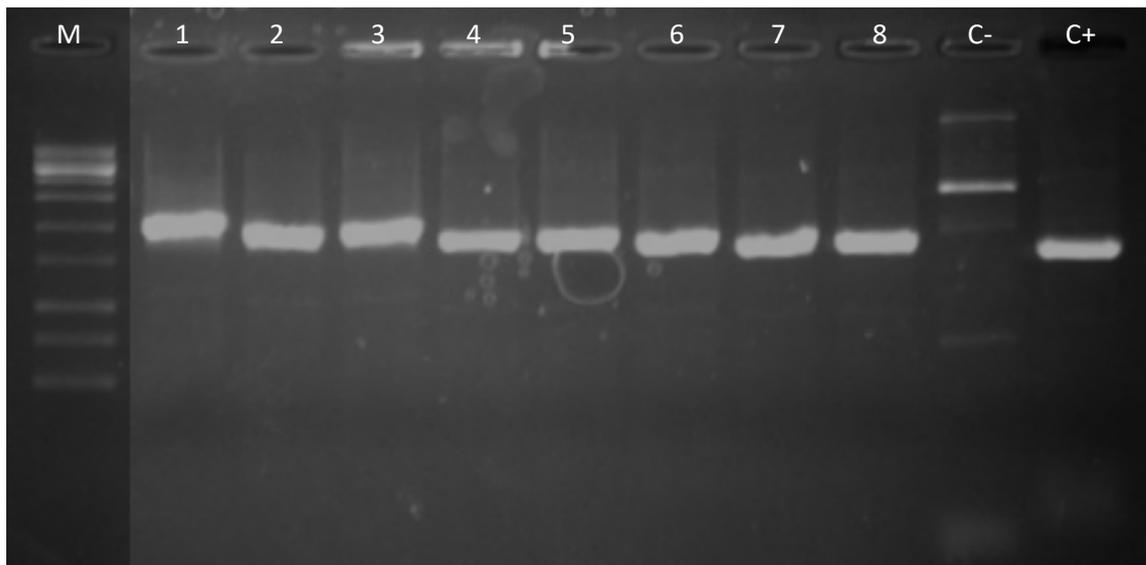


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR visando confirmar a introdução do plasmídeo pH7FWG2-OsVoz1 em *A. tumefaciens*. *Primers* específicos para o gene *OsVoz1* foram utilizados na reação. A presença da banda de 1259 pb permitiu confirmar a presença plasmídeo **pH7FWG2-OsVoz1** na *A. tumefaciens*. 1-8 amostras de minipreparação de plasmídeos pH7FWG2 a partir de colônias de *A. tumefaciens* AGL1. C+ controle positivo, ou seja, produto da PCR utilizando pH7FWG2-OsVoz1 purificado como molde da reação. C- controle negativo, mistura de reação sem adição de DNA. M marcador de tamanho molecular de DNA de 1 kb (Ludwig).

4.3. Transformação de *Oryza sativa* via *A. tumefaciens* contendo pH7FWG2-OsVoz1

A transformação foi realizada utilizando calos embriogênicos de arroz (Figura 8), conforme descrito no item 3.3. Aproximadamente 5 semanas após a co-cultura com *A. tumefaciens*, surgiram os primeiros calos resistentes. Calos potencialmente transformados foram transferidos para um novo meio HTC para uma nova rodada de seleção (Figura 9). Após duas rodadas de seleção em meio HTC, 4 eventos independentes de calos resistentes a higromicina seguiram para regeneração de plantas de arroz.



Figura 8. Calos embriogênicos de arroz em meio NB de proliferação.

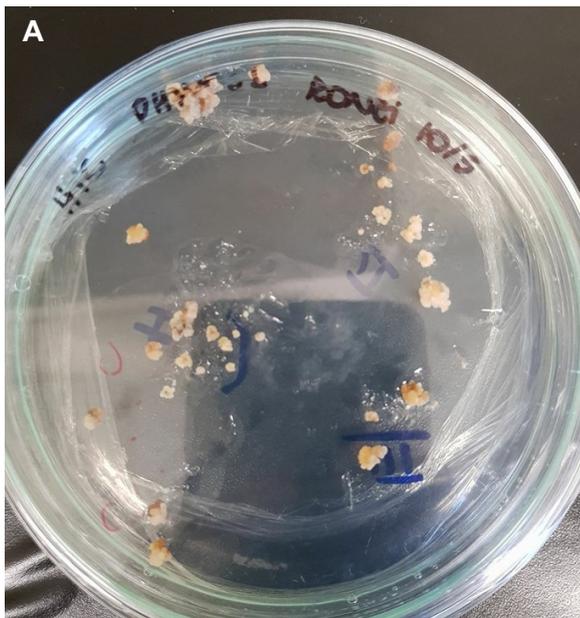


Figura 9. Calos embriogênicos de arroz co-cultivados com *A. tumefaciens* contendo pH7FWG2-OsVoz1 em meio de seleção HTC. A. Calos não transformados em meio de seleção HTC não conseguem proliferar devido a presença da Higromicina. B. Calos transformados selecionados, proliferam em meio de seleção devido a presença do gene *hpt*.

4.4. Regeneração de plantas de *O. sativa* transformadas

Para a regeneração, foi utilizado protocolo adaptado de Ozawa e colaboradores, conforme descrito no item 2.3.3. Os calos selecionados, bem como calos não transformados, foram incubados a 28 °C sob fotoperíodo de 12h por 30 dias (Figura 10). As plântulas regeneradas que apresentaram parte aérea verde e raízes foram transferidas para meio MS contendo higromicina para continuar a seleção por mais 10 dias (Figura 11). Dos 4 eventos de calos selecionados (L1, L14, L20 e L21), 2 deles não regeneraram plantas saudáveis (L14 e L20), pois as mesmas eram cloróticas e sem o crescimento das raízes. Esses eventos podem ser frutos da interrupção de genes importantes pela inserção do transgene em locais indevidos do genoma. Ou até mesmo devido a variações somaclonais, que são mutações ao acaso que ocorrem no genoma durante a regeneração, gerando linhagens inviáveis (36,37). As 2 linhagens restantes produziram plantas saudáveis (L1 e L21), que seguiram para aclimação e posterior desenvolvimento em plantas adultas (Figura 12).

As duas linhagens de plantas regeneradas apresentaram alguns fenótipos alterados: i) tamanho menor que as selvagens não transformadas, mesmo sendo plantadas no mesmo período; ii) tempo de florescimento adiantado. As plantas transformadas tiveram o aparecimento de panículas 10 dias antes das não transformadas (Figura 12). Fenótipo semelhante foi observado em *A. thaliana*, onde plantas superexpressando o gene ortólogo *AtVoz1* tiveram seu florescimento antecipado, se comparado às plantas não transformadas. Já se mostrou que os genes VOZ tem papel na regulação do tempo de florescimento das plantas (27,28,38).

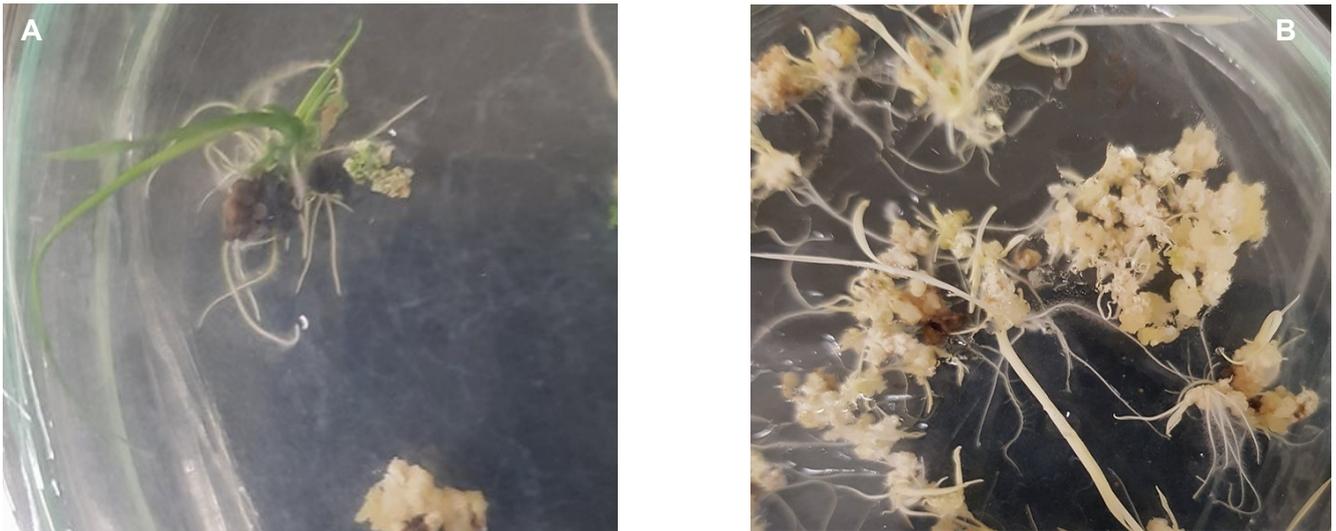


Figura 10. Plantas em regeneração potencialmente superexpressando *OsVoz1*. A. Plântulas em meio de regeneração desenvolvendo parte aérea verde e raízes. B. Eventos que regeneraram plantas anormais.



Figura 11. Plantas saudáveis regeneradas cultivadas em meio de MS.



Figura 12. Plantas regeneradas com 12 semanas de crescimento. A. Plantas completamente regeneradas *in vitro*, a esquerda são as plantas não transformadas e a direita as plantas transgênicas. B. Panículas nas plantas não transformadas. C. Panículas nas plantas transformadas da linhagem L1. As panículas entre as duas plantas se apresentaram semelhantes, a não ser pelo fato das plantas transformadas terem florescido 10 dias antes das não transformadas.

4.5. Confirmação da presença de *OsVoz1* em *O. sativa*

A extração de DNA foi feita conforme descrita no item 2.4.1, utilizando folhas jovens das plantas regeneradas, tanto das transformadas quanto da não transformada. A eletroforese em gel de agarose foi feita para avaliar a qualidade do DNA extraído, e mostrou que a extração de DNA foi bem sucedida, produzindo DNA genômico íntegro (dado não mostrado).

A confirmação da transformação foi realizada utilizando-se *primers* específicos para o gene *hpt*, que confere resistência a higromicina. Conforme esperado, houve a amplificação de um fragmento de 526 pb nas reações de PCR utilizando DNA de folhas de plantas regeneradas. Não houve amplificação no controle não transformado (Figura 14). Este resultado mostra que as plantas regeneradas contem pelo menos uma cópia do transgene.

Foi utilizado um protocolo híbrido de transformação, adaptado de Upadhyaya e colaboradores e Ozawa e colaboradores(6,31). A principal diferença entre esses protocolos é a presença de uma etapa de pré-regeneração no primeiro, enquanto no segundo, os calos selecionados vão diretamente para uma etapa de regeneração. O protocolo descrito por Upadhyaya era utilizado pelo nosso grupo de pesquisa, entretanto esse método começou a apresentar problemas, levando a dificuldades em gerar plantas adultas. Ambas as metodologias foram testadas (dados não publicados) e um híbrido entre as duas metodologias se mostrou mais eficiente e também mais rápido, uma vez que a etapa de pré-regeneração não é mais utilizada.

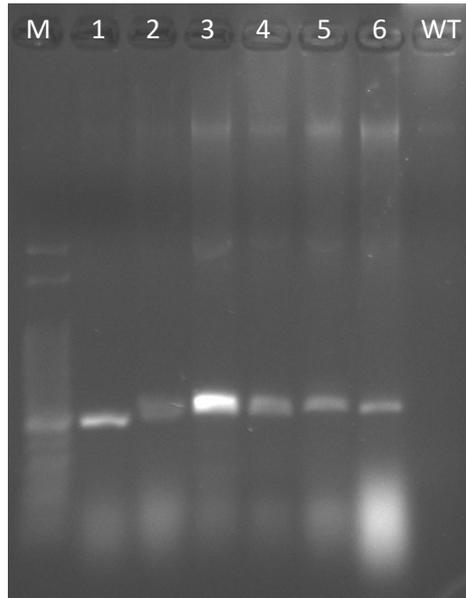


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR das plantas regeneradas, comprovando o transgene. *Primers* específicos para o gene *hpt* foram utilizados na reação. A presença da banda de 526v pb permitiu confirmar a integração do transgene nas plantas. 1-3 Produto de PCR de DNA de plantas da linhagem L1. 4-6 Produto de PCR de DNA de plantas da linhagem L21. WT Produto de PCR de DNA de plantas selvagens não transformadas. M marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Ludwig).

5. Conclusões e Perspectivas

A técnica de superexpressão é muito eficiente para a caracterização funcional de genes. A superexpressão de uma proteína na célula é uma das formas mais utilizadas para começar a elucidar o papel da mesma no organismo. Nesse trabalho, foi aplicado um protocolo de transformação de plantas de arroz que permitiu a obtenção de duas linhagens transgênicas independentes, as quais logo na primeira geração já apresentaram alguns fenótipos alterados. O protocolo utilizado se demonstrou bastante rápido, mesmo que a eficiência do mesmo não tenha sido possível ser medida devido a diversas perdas de transformação ao longo do processo, estima-se que o processo todo levou cerca de 8 meses. Essas perdas foram devidas principalmente a contaminações.

Ao longo do trabalho foi possível obter mais de uma linhagem independente. Analisar linhagens diferentes de um mesmo transgene é de extrema importância no estudo funcional de genes, pois é a partir disso que se pode analisar quais são os verdadeiros efeitos que o gene estudado está causando no organismo. Algumas vezes, a inserção do transgene acaba interrompendo algum outro gene importante, gerando fenótipos diferentes do que realmente se espera para a proteína estudada. Esse tipo de problema pode ser contornado quando se obtém mais de uma linhagem, permitindo verificar quais fenótipos são realmente referentes ao gene em estudo, e quais podem ter sido devido a localização da inserção durante a transformação.

Para a continuidade do projeto, os próximos passos consistirão na análise da expressão do gene *OsVoz1* em nível de mRNA, por RT-qPCR, e em nível de proteína por *Western Blot*. Além disso, será necessário avançar as gerações das linhagens obtidas a fim de obter o transgene em homozigose, para não correr o risco de se perder as linhagens transgênicas ao longo do tempo. Finalmente, será necessário realizar ensaios nos quais as plantas serão confrontadas contra estresses bióticos e abióticos a fim de averiguar os efeitos desse gene nas respostas de defesa do arroz.

BIBLIOGRAFIA

1. Importância [Internet]. [cited 2017 Nov 15]. Available from: https://www.agrolink.com.br/culturas/arroz/informacoes/importancia_361560.html
2. Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Importância econômica e social [Internet]. [cited 2017 Nov 15]. Available from: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe7457q102wx5eo07qw4xeynhsp7i.html>
3. Goff SA, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*. 2002 Apr 5;296(5565):92–100.
4. Jackson SA. Rice: the first crop genome. *Rice* (N Y). 2016 Dec;9(1):14.
5. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*. 1994 Aug;6(2):271–82.
6. Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Petra H. D. Schünmann, Taylor W, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Functional Plant Biology*. 2000;
7. Giri CC, Vijaya Laxmi G. Production of transgenic rice with agronomically useful genes: an assessment. *Biotechnol Adv*. 2000 Dec 1;18(8):653–83.
8. Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, et al. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Aug;80(15):4803–7.
9. Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Montagu MV, Schell J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J*. 1983;2(12):2143–50.
10. Jhansi Rani S, Usha R. Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of pharmacy research*. 2013 Aug;6(8):879–83.
11. Mitsuda N, Hisabori T, Takeyasu K, Sato MH. VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2004 Jul;45(7):845–54.
12. Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*. 2012 Mar;190(3):841–54.
13. Lee L-Y, Gelvin SB. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol*. 2008 Feb;146(2):325–32.
14. Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Mar;67(1):16–37, table of contents.

15. Tzfira T, Citovsky V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.* 2002 Mar;12(3):121–9.
16. Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 1984 Nov 26;12(22):8711–21.
17. Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature.* 1985 Dec;318(6047):624–9.
18. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:781–803.
19. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* 2003 Oct;6(5):410–7.
20. Zhu J-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2002;53:247–73.
21. Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, et al. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 1994 Nov 18;266(5188):1247–50.
22. Creelman RA, Mullet JE. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4114–9.
23. Quan L-J, Zhang B, Shi W-W, Li H-Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integr Plant Biol.* 2008 Jan;50(1):2–18.
24. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot.* 2002 May;53(372):1305–19.
25. Nakai Y, Nakahira Y, Sumida H, Takebayashi K, Nagasawa Y, Yamasaki K, et al. Vascular plant one-zinc-finger protein 1/2 transcription factors regulate abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2013 Mar;73(5):761–75.
26. Nakai Y, Fujiwara S, Kubo Y, Sato MH. Overexpression of VOZ2 confers biotic stress tolerance but decreases abiotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 2013 Mar;8(3):e23358.
27. Celesnik H, Ali GS, Robison FM, Reddy ASN. *Arabidopsis thaliana* VOZ (Vascular plant One-Zinc finger) transcription factors are required for proper regulation of flowering time. *Biol Open.* 2013 Apr 15;2(4):424–31.
28. Yasui Y, Mukougawa K, Uemoto M, Yokofuji A, Suzuri R, Nishitani A, et al. The phytochrome-interacting vascular plant one-zinc finger1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2012 Aug 17;24(8):3248–63.

29. Karimi M, Inzé D, Depicker A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002 May;7(5):193–5.
30. Main GD, Reynolds S, Gartland JS. Electroporation protocols for *Agrobacterium*. *Methods Mol Biol.* 1995;44:405–12.
31. Ozawa K. Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 2009 Apr;176(4):522–7.
32. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant.* 1962 Jul;15(3):473–97.
33. Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 1991 Mar 25;19(6):1349.
34. Festa F, Steel J, Bian X, Labaer J. High-throughput cloning and expression library creation for functional proteomics. *Proteomics.* 2013 May;13(9):1381–99.
35. Atanassov II, Atanassov II, Etchells JP, Turner SR. A simple, flexible and efficient PCR-fusion/Gateway cloning procedure for gene fusion, site-directed mutagenesis, short sequence insertion and domain deletions and swaps. *Plant Methods.* 2009 Oct 28;5:14.
36. Leva AR, Petruccelli R, Rinaldi LMR. Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive. In: Leva A, editor. *Recent Advances in Plant in vitro Culture.* InTech; 2012.
37. Pontaroli AC, Camadro EL. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genet Mol Biol.* 2005 Sep;28(3):423–30.
38. Yasui Y, Kohchi T. VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 repress the FLOWERING LOCUS C clade members to control flowering time in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014 Jul 10;78(11):1850–5.