



Centro Universitário de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

**Transformação de planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) com transgene que confere resistência a seca**

Elifas Davi Mendes Lisboa

Brasília-2003



Centro Universitário de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

**Transformação de planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) com transgene que confere resistência a seca (BIP)**

Elifas Davi Mendes Lisboa

Monografia apresentada como requisito para a conclusão do curso de Biologia do Centro Universitário de Brasília.

Orientação: Eduardo Romano (Embrapa)  
Cláudio Henrique Cerry e Silva  
(FACS-UniCEUB)

Brasília- 2º/2003

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a minha família pela confiança em mim depositada, pela cooperação e apoio incondicional. Ao meu orientador, Eduardo Romano que muito contribuiu com seus ensinamentos para minha formação acadêmica e a minha namorada...

## **Resumo**

A escassez de água é fator limitante na produção de diversas culturas agrícolas resultando em enormes quedas na produção e tendo profundas implicações socio-econômicas. Por outro lado, a super expressão de BiP (proteína de ligação) em tabaco conferiu alta tolerância quando submetida a estresse hídrico, demonstrando o potencial deste gene para o desenvolvimento de plantas transgênicas tolerantes à seca em culturas importantes para o agronegócio e agricultura familiar. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais BIP confere tolerância não são conhecidos. Por outro lado, o uso da transgenia tem levantado uma série de questões a respeito de possíveis efeitos pleiotrópicos que podem resultar da expressão de transgenes. Para entender os mecanismos moleculares envolvidos na super-expressão do gene BIP e detectar possíveis efeitos pleiotrópicos advindos da expressão de BIP, plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*) foram transformadas com o este gene através do método de infiltração por botão floral mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas submetidas ao tratamento de transformação foram autopolinizadas em casa de vegetação e as sementes resultantes foram coletadas, esterilizadas e semeadas em placas de petri contendo meio MS acrescido de antibiótico (fator de seleção). Os possíveis transformantes foram transferidos para meio de enraizamento e aclimatados. O gene *ntpII* (resistência ao antibiótico) foi detectado através de reação de PCR utilizando DNA genômico das plantas confirmando que vários eventos transgênicos foram obtidos. Os transformantes agora estão sendo submetidos a estresse hídrico e RNA destas plantas e de plantas sem tratamento serão utilizados como sonda em experimentos de “microarrays” em chips comerciais contendo todos os 27.000 genes de *Arabidopsis thaliana*.

**Palavras-chaves:** BiP, chaperone, transformação, *Agrobacterium*, *Arabidopsis thaliana*.

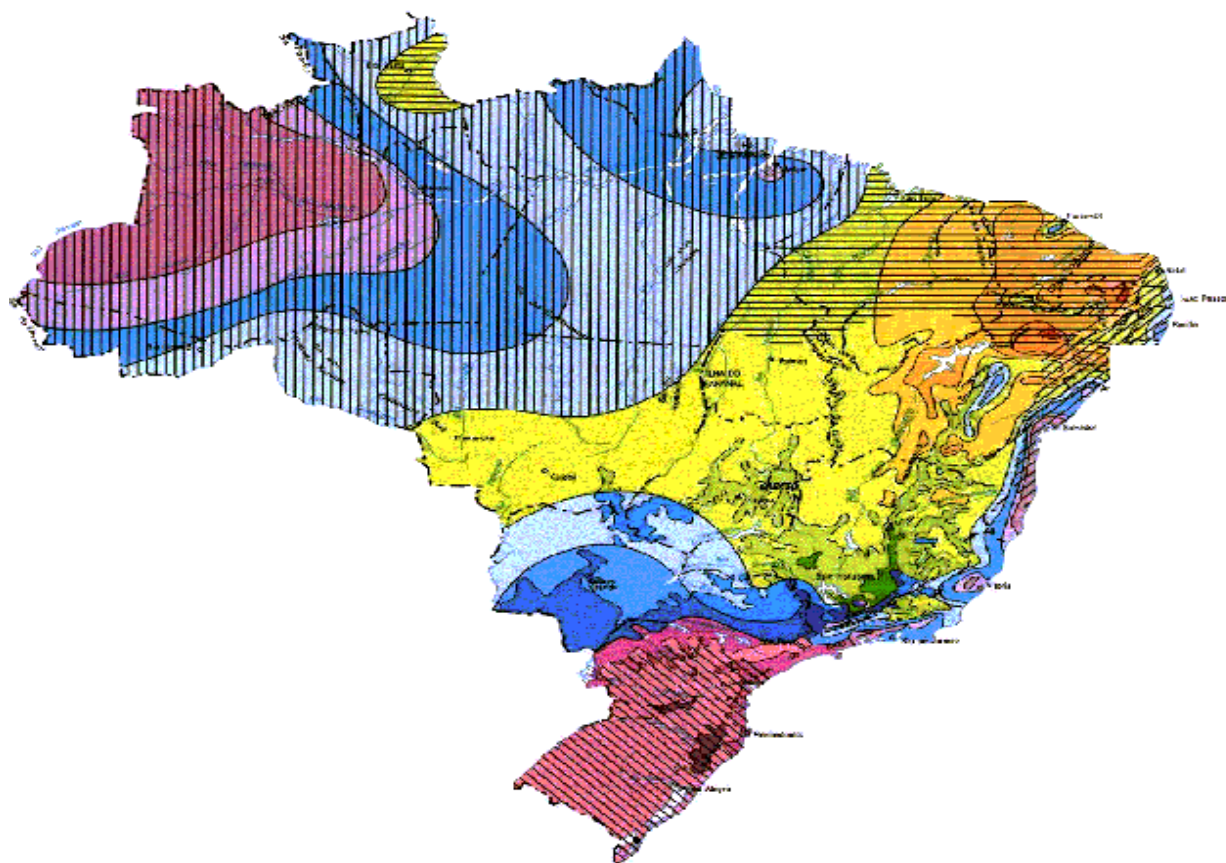
## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>6</b>
1.1. A Região Nordeste, A Água como fator limitante e Experimentos em Biotecnologia. .....	6
1.2. O Chaperone Molecular BiP .....	8
1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo .....	10
1.3.1. Histórico .....	10
1.3.2. Anatomia .....	11
1.3.3. Vantagens da utilização da planta como modelo.....	13
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Materiais e Métodos:</b> .....	<b>13</b>
3.1 Transformação de bactéria, com plasmídeo binário contendo o BIP .....	13
3.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilizando método de choque térmico .....	14
3.3. Transformação das plantas via infiltração de botão floral utilizando <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	14
3.4. Seleção dos transformantes .....	15
3.5. Aclimação .....	16
<b>4. Resultados</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Discussão</b> .....	<b>19</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>20</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>21</b>

## 1. Introdução

### 1.1. A Região Nordeste, A Água como fator limitante e Experimentos em Biotecnologia.

O Brasil por ser um país de dimensão continental possui diversas regiões com diferentes tipos de unidades climáticas (figura 1).



**Figura 1.** Mapa do território brasileiro destacando unidades climáticas e entre elas a região de semi-árido nordestino em cor laranja. Fonte Brasil 2003

A Região Nordeste ocupa uma área de 1.539.000 km<sup>2</sup>, correspondente a 18% do território brasileiro, e abriga uma população de 45,5 milhões, equivalentes a 29% do total nacional. Apresenta algumas singularidades no cenário geo-econômico brasileiro. Na Região vivem cerca de metade da população pobre do país (Duarte, 2001).

Em termos geográficos a região mostra-se bastante heterogênea, apresentando grande variedade de situações físico-climáticas. A região semi-árida, com mais de 860 mil quilômetros quadrados compreende 86% da área total (978 mil quilômetros) legalmente definida como Polígono das Secas. É tamanho maior do que muitos países europeus (Leal 1998).

As variações climáticas existentes já são conhecidas, principalmente no que diz respeito à má distribuição das chuvas ao longo do ano, o que traz impactos diretos na produção de culturas vegetais.

As secas podem ocorrer sob a forma de drástica diminuição ou de concentração espacial e/ou temporal da precipitação pluviométrica anual. Quando ocorre uma grande seca a produção agrícola se perde, a pecuária é debilitada ou dizimada e as reservas de água de superfície se exaurem.

A água é um componente essencial das plantas, sendo um dos principais constituintes das células vegetais, variando entre 10% e 95% do peso fresco de órgãos vegetais. É fundamental para todos os processos metabólicos dos vegetais como, crescimento, fotossíntese e transpiração.

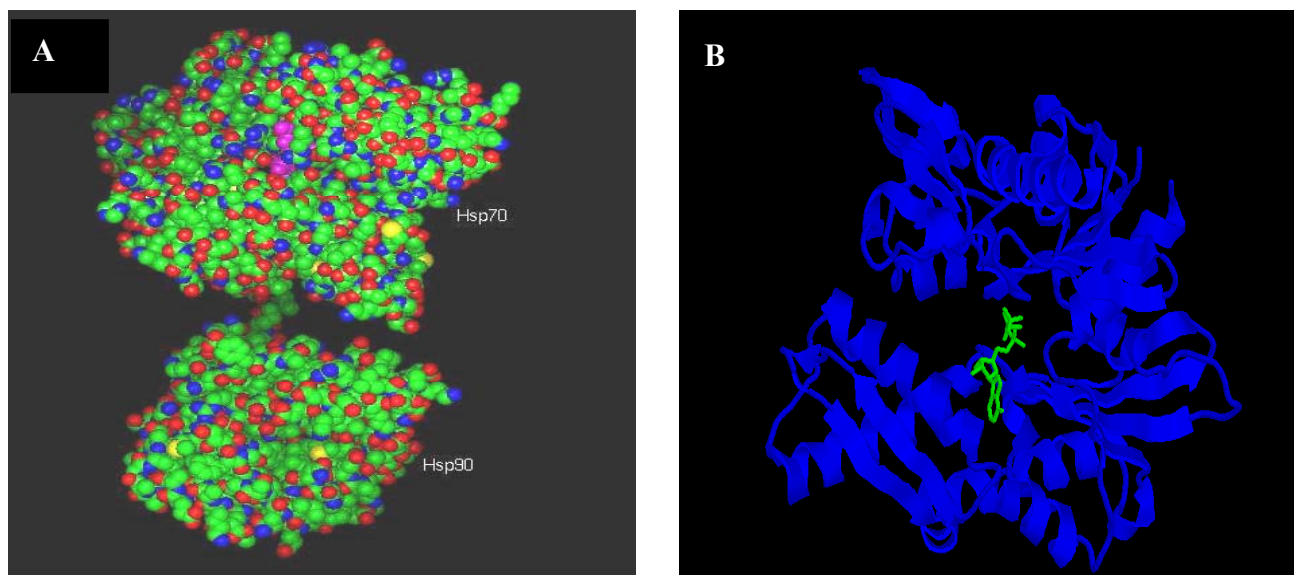
Os diversos mecanismos naturais de resistência à seca e o uso racional da água não são por si só suficientes para desenvolver a região. Faz-se portanto necessário outras alternativas, inserindo-se nesse contexto as pesquisas e soluções em biotecnologia voltados para culturas adaptadas à seca.

A proteína BiP confere resistência a estresse hídrico quando super expressada o que a torna uma excelente alternativa para a criação de transgênicos resistentes a seca . Seu mecanismo de ação é pouco conhecido e as alterações provocadas a nível de expressão gênica dentro do organismo vegetal não . Estudos em planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) e uma alternativa viável e importante para que essas alterações sejam entendidas.

## 1.2. O Chaperone Molecular BiP

A escassez de água e fator limitante tanto para a escolha de culturas em determinadas áreas como para produtividade. Pesquisas científicas voltadas para obtenção de plantas com necessidades reduzidas de água conduziram ao estudo do chaperone molecular BiP.

Os chaperones moleculares são proteínas responsáveis pelo dobramento e estabilização de outras proteínas (Stryer 1996). Elas são estruturalmente classificadas na família das Hsp70 e entre as proteínas constituintes estão a Hsp70 no citosol e na matriz mitocondrial, a DnaK de bactéria e a BiP no retículo endoplasmático (Lodish *et al*, 2002). Os membros da família Hsp70 têm um domínio ATPase amino-terminal bem conservado de aproximadamente 45kDa e um domínio de um C-terminal que promove a divisão de um domínio da ligação do substrato de aproximadamente 15kDa e um subdomínio do C-terminal de 10kDa com função desconhecida. Alguns membros da família contêm as extensões curtas do N-terminal ou do C-terminal promovendo a retenção da proteína no compartimento celular apropriado (figura 2).



**Figura 2.** **A** - Estrutura em terceira dimensão de uma Hsp70 e uma Hsp90; **B** – estrutura de um domínio ATPase de uma Hsc70. A molécula de ATP está mostrada na cor verde.

FONTE **HSP 70**

A proteína de ligação (BiP) representa um dos chaperones moleculares melhor caracterizado. A BiP contém um sinal de quatro aminoácidos no seu amino terminal carboxila que faz com que ela permaneça retida no lúmen (interior) do retículo endoplasmático. A BiP possui 78kD e está relacionada com a biogênese, transporte e degradação de proteínas celulares. Seu mecanismo de ação se dá por meio de ligamentos às seqüências de aminoácidos expostas de proteínas impedindo que essas se agreguem, além de auxiliar na conformação correta das mesmas (Alberts *et al* 1997, Nuttall *et al* 2003). A BiP também está relacionada na interação de outros mecanismos celulares como:

- Polipeptídios de BiP são capazes de se ligarem ao  $\text{Ca}^{2+}$ , afetando a quantidade deste cátion no citoplasma (Olinevich & Khokhloua 2003);
- A indução de BiP pela secagem parcial ou lenta de sementes preparadas melhora os estresses ocorridos durante a desidratação e o armazenamento, contribuindo para longevidade e melhoramento da semente (Gurusinghe *et al* 2002);
- O acúmulo de BiP em plantas transgênicas confere tolerância para estresse hídrico (Alvim *et al* 2001).

Embora a BiP seja codificada por apenas um gene em animais, em plantas algumas espécies apresentam apenas uma cópia de BiP enquanto outras apresentam família multigênica. Por exemplo, no espinafre três formas de BiP foram descritas (Cascardo *et al* 2000).

Nas plantas, como em mamíferos e em leveduras, a expressão de BiP é regulada de acordo com exigências celulares para a atividade do chaperone. Com isso têm sido proposto que durante períodos de estresse, BiP interage com proteínas desnaturadas no RE, auxiliando na manutenção da integridade celular (Castel *et al* 1999). Assim, o aumento da atividade secretora e a acumulação de proteínas desdobradas dentro do RE resultam na indução da síntese de BiP nas plantas (Cascardo *et al* 2000).

Esta indução é ativada por uma via de transdução de sinal que regula a transcrição de proteínas residentes no RE, como a BiP (Alvim *et al* 2001).

A expressão de BiP em planta foi descrita respondendo a uma variedade de condições tanto abióticas como bióticas de estresse, tais como o estresse hídrico, infestação de fungos, ataques do insetos, de estresse nutritivo e aclimação para frio (Alvim *et al* 2001).

A super expressão da BiP em tabaco conferiu a planta alta tolerância quando submetida a estresse hídrico (falta de água), porém os efeitos pleiotrópicos advindos da expressão de BIP são desconhecidos justificando a transformação de plantas modelo (*arabidopsis*) para estudar os mecanismos envolvidos na super expressão de BiP.

### **1.3. *Arabidopsis thaliana* como planta modelo**

#### **1.3.1. Histórico**

O primeiro registro da *A. thaliana* na literatura foi feito por Alexander Braun em 1873, descrevendo uma planta mutante encontrada em um campo perto de Berlim.

Na literatura experimental o aparecimento da *A.thaliana* aconteceu em 1907, quando Friedrich Laibach (1885 - 1967), realizou uma publicação descrevendo o número de cromossomos de diversas plantas.

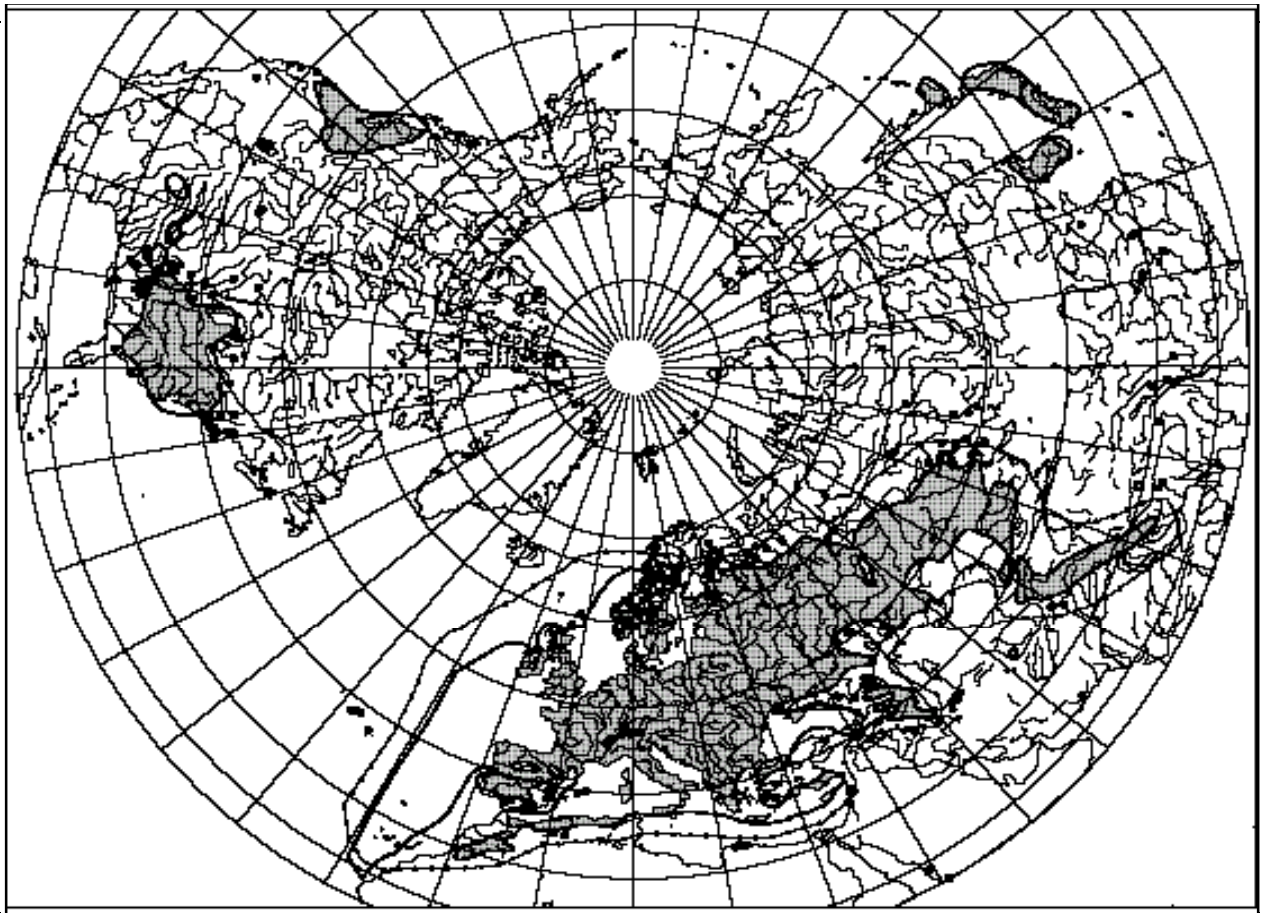
A aparição seguinte da *A.thaliana* foi registrada em um artigo no ano de 1935 resultado de uma expedição Russa para encontrar uma planta que poderia ser usada como planta-modelo em experimentos de genética e citogenética. Embora o número pequeno dos cromossomos e o curto ciclo de vida terem sido considerados características úteis, o tamanho pequeno da planta e de suas estruturas foram considerados uma desvantagem assim como a inabilidade de distinguir pares diferentes dos cromossomos. Experimentos realizados por Laibach conduziram à primeira coleção de mutantes de *Arabidopsis* (Meyerowitz 2001).

Um boletim de notícias chamado serviço de informação de *arabidopsis* foi fundado em 1964 e suas publicações continuaram até 1990. A adoção da *arabidopsis* como uma planta modelo ocorreu nos anos 80. A primeira seqüência de um gene foi publicada em 1986, e a transformação de *arabidopsis* foi primeiramente estabelecida em 1986 (Meyerowitz 2001). O projeto de pesquisa multinacional do genoma da *Arabidopsis*

*thaliana* foi estabelecido em 1990 para promover a cooperação internacional na pesquisa básica e aplicada com *arabidopsis*. A conclusão do genoma se deu em dezembro de 2000.

### 1.3.2. Anatomia

A *Arabidopsis thaliana* é uma angiosperma (figura 3), membro da família da mostarda (Brassicaceae) que possui uma ampla distribuição natural em toda Europa, Ásia, e América do Norte (Hoffmann 2002).



**Figura 3.** Mapa geral da distribuição da *Arabidopsis thaliana*.

FONTE Hoffmann 2003

Muitos ecotipos diferentes foram coletados das populações naturais e estão disponíveis para a análise experimental. Os ecotipos de Colômbia e de Landsberg são os padrões aceitos para estudos em genética e biologia molecular.

O ciclo de vida completo, incluindo a germinação das sementes que é dependente de luz e de baixas temperaturas, a formação inicial da planta, aparecimento da haste principal, floração, e a maturação das primeiras sementes, dura aproximadamente 6 semanas (Fankhauser 2002).

Quanto à anatomia as arábidos são pequenas (Figura 4). As flores têm 2 milímetros de comprimento, as sementes são 0,5 milímetros no comprimento na maturidade, as raízes são simples na estrutura e as plantas maduras alcançam 15 a 20 cm de altura (Meinke *et al*, 1998).



**Figura 4.** *Arabidopsis thaliana* em estágio adiantado de desenvolvimento.

### 1.3.3. Vantagens da utilização da planta como modelo

Entre as principais vantagens da planta como modelo de pesquisa estão: o tamanho pequeno; cultivo fácil; ciclo de vida curto; genoma pequeno e seqüenciado (27000 genes); protocolo de transformação simples e estabelecido (Bent 2000); disponibilidade de mutantes numerosos; produção de sementes férteis e o compartilhamento de genes com diversas espécies de plantas como arroz e trigo. As vantagens citadas reforçam a *arabidopsis* como planta modelo.

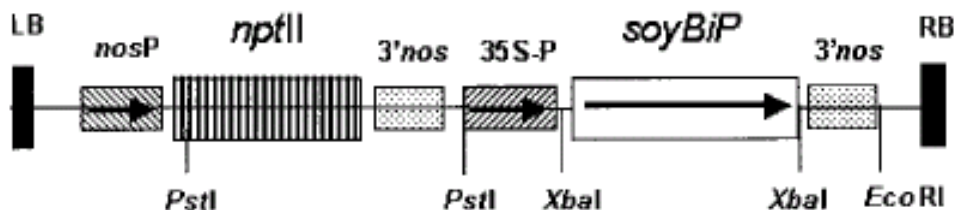
## 2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo obter plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com o gene BiP. Estas plantas transgênicas serão utilizadas posteriormente em estudos de expressão gênica em “microarrays” (Seki *et al* 2001).

## 3. Materiais e Métodos:

### 3.1 Transformação de bactéria, com plasmídeo binário contendo o BiP

O gene BiP de soja foi clonado no vetor binário pBI121 (Clontech). Esse vetor é constituído do gene *nptII* de resistência a canamicina (Xiang *et al* 1999) sob controle do promotor *nosP* e do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) o qual ficou responsável pela expressão de BiP (LeClere & Bartel 2001). Essa construção foi gentilmente cedida pela Dra.Elizabeth P.B. Fontes (figura 5).



**Figura 5.** – Construção utilizada para transformação contendo gene BiP.

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem X11blue foram transformadas via eletroporação utilizando a construção com bip. Os transformantes foram selecionados em meio seletivo (canamicina), e uma colônia foi inoculada em meio LB. As células foram centrifugadas e foi feita extração de DNA plasmidial (Kotchoni *et al* 2003). O DNA obtido foi quantificado e utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem LBA4404 (Brasileiro 1998).

### **3.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* utilizando método de choque térmico**

A partir de uma placa com agrobacterium, foi coletada uma colônia isolada, e transferida para 5 ml de meio LB. Incubou-se a colônia por 16 horas a 28 °C, 2 ml da cultura foram transferidos para 50 ml de meio LB. Novamente incubou-se a cultura no gelo por 15 minutos 28 °C, com agitação. As células foram centrifugadas, resuspendidas em 1ml de CaCl<sub>2</sub> 20mM. As células foram aliqüotadas em 100 µL, em tubos de microcentrifuga resfriada (Romano & Lacorte 2000).

Para a transformação das células foram adicionados aproximadamente 1 µg de DNA plasmidial para uma aliqüota e misturou-se delicadamente. Incubou-se no gelo por 20 minutos e depois em N<sub>2</sub> líquido até a solidificação. Incubou-se as células a 37 °C; Adicionou-se 1 ml de meio LB, e incubou-se por 2 horas a 28 °C; As células foram plaqueadas em meio LB com meio seletivo; As placas foram deixadas na estufa a 37 °C até o aparecimento de colônias isoladas.

### **3.3. Transformação das plantas via infiltração de botão floral utilizando *Agrobacterium tumefaciens***

Foram Preparados copos de 300 ml com terra autoclavada e telas mosquiteiras. Nos copos foram semeadas as *A. thaliana* do ecotipo Columbia. As plantas crescerem na casa de vegetação por quatro semanas e tiveram a inflorescência cortada por 3 vezes.

A *Agrobacterium* foi cultivada em meio LB acrescido de 50 mg/L de Kanamicina e 100 mg/L de higromicina, a 28 °C até atingir densidade óptica a 600 nm (OD600) entre 0,7-0,8. A seguir, foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e ressuspensa em meio de

infiltração (sacarose mais silwet). A infiltração foi promovida mergulhando as plantas no meio contendo agrobactéria por 5 minutos.

Apos o mergulho as plantas foram deixada na horizontal dentro do saco plástico por vinte e quatro horas.

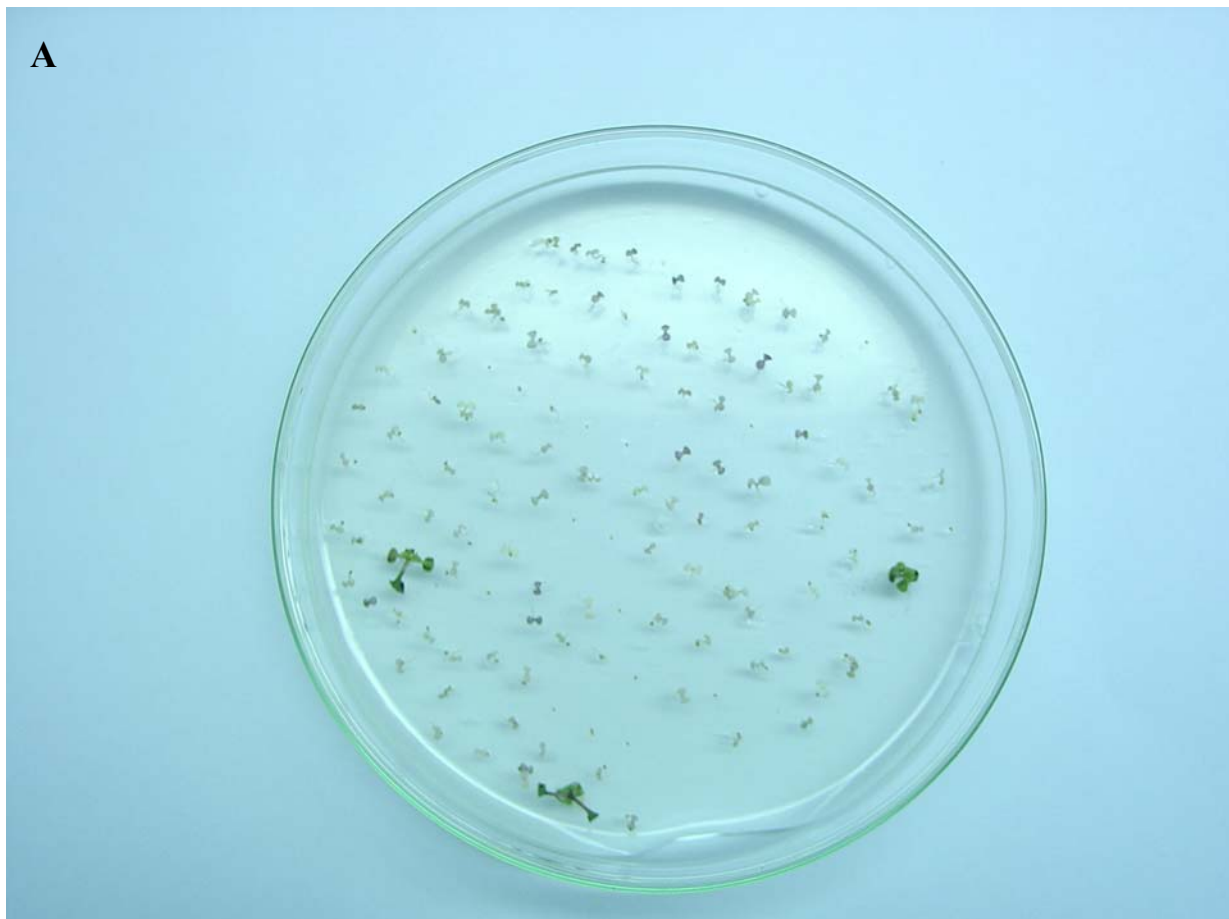
As plantas continuaram seu desenvolvimento na casa de vegetação por três a quatro semanas até a coleta das sementes.

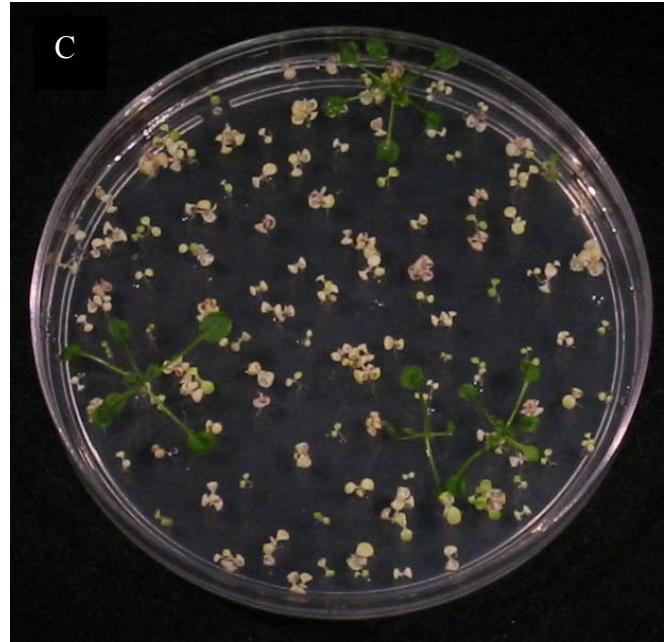
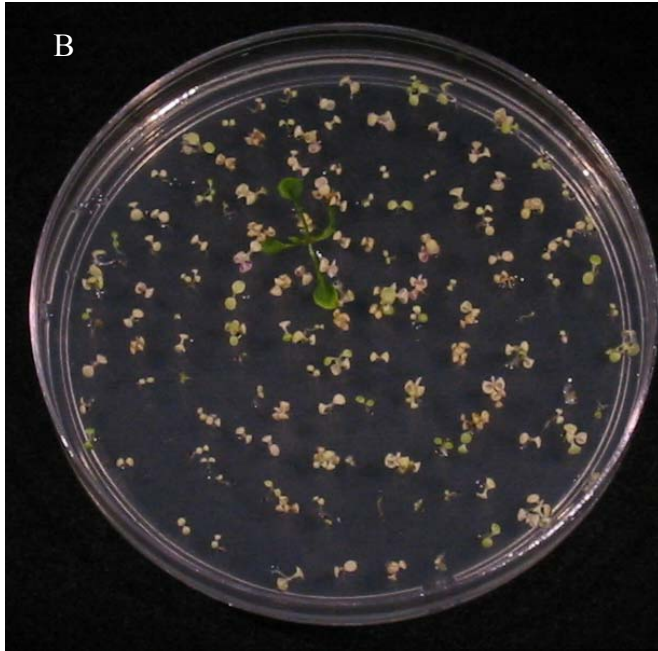
### **3.4. Seleção dos transformantes**

As sementes resultantes foram esterilizadas: 1 minuto em alcool 70%; 10 minutos em hipoclorito de sódio 1% e lavar com agua destilada.

Colocadas em meio seletivo (placas de petri) as sementes foram deixadas em câmara fria a 4 °C para quebra da dormência e em seguida deixadas em sala cultura de tecido sob as seguintes condições: luz por 14 horas; ausência de luz por 10 horas e 27 °C variando por 2 graus a mais ou a menos.

Após aproximadamente dez dias, o resultado foi notório (figura 6).

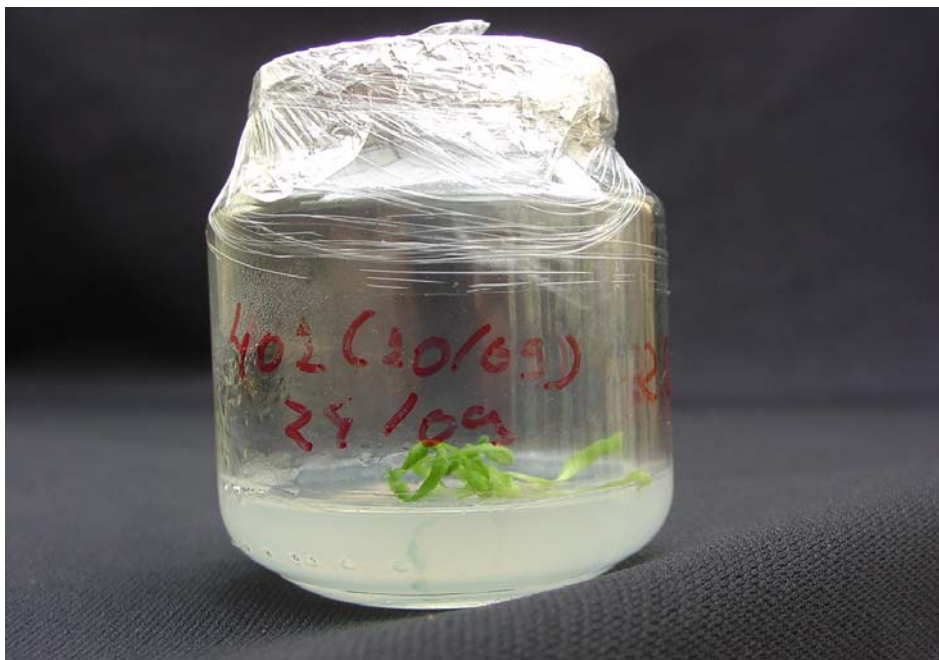




**Figura 6.** **A** - Três plantas transformadas crescendo em meio seletivo (MS com kanamicina); **B** - Uma planta transformada; **C** - Quatro transformantes.

### 3.5. Aclimação

Os transformantes foram transferidos para potes “baby” contendo meio de enraizamento (MS meio) e deixadas por duas semanas (figura 7).



**Figura 7.** Arabidopsis transformada crescendo em meio de enraizamento.

As plantas foram transferidas para copos contendo terra e um pouco de vemiculita e foram encobertas com saco plástico contendo furos, por uma semana (figura 8).



**Figura 8.** Arabidopsis transformada passando pela fase de aclimação.

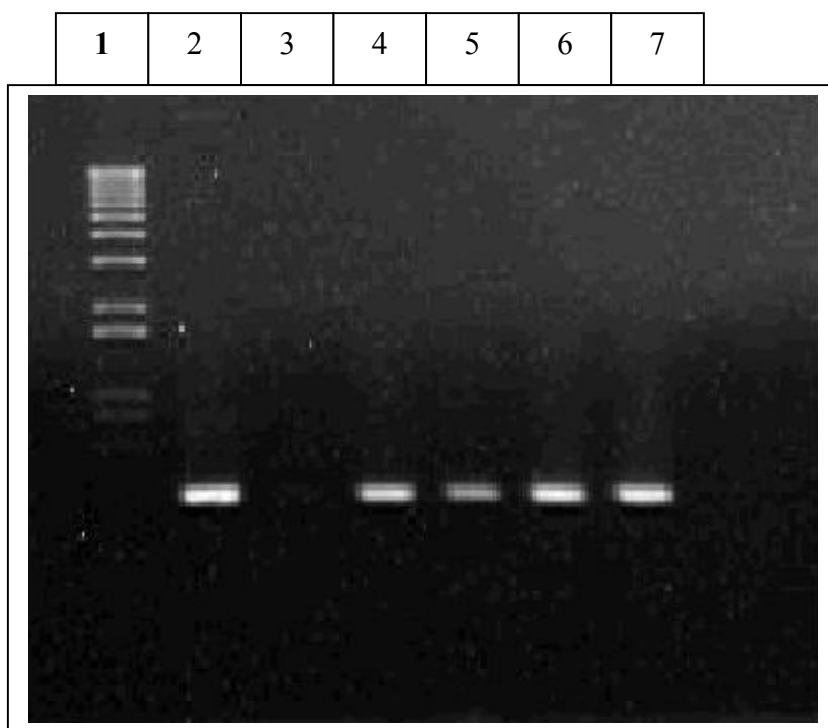
Os sacos foram retirados e as plantas estão sendo cultivadas na casa de vegetação.

A transformação foi confirmada através da reação de PCR utilizando primers específicos para o gene *nptII* sob as seguintes condições: temperatura de desnaturação 94 °C; temperatura anelamento 55 °C e temperatura alongamento 55°C.

#### 4. Resultados

A eficiência de transformação encontrada foi de 0,75% calculada através de regra de três simples. Em doze placas com cem sementes cada, obteve-se nove possíveis transformantes (resistentes a canamicina)

Os possíveis transformantes foram analisados por PCR para determinar se estes realmente possuem o transgene *npt II* (figura 9).



**Figura 9.** Gel de agarose 1% mostrando reação de PCR confirmando a transformação das plantas. No gel: 1 (primeiro poço) - e o marcador DNA plus 1Kb ladder (invitrogen); 2 (segundo poço) - controle positivo (DNA plasmidial contendo gene *nptII*); 3 (terceiro poço) - *Arabidopsis* selvagen; 4 (quarto poço) - planta transgênica 2; 5 (quinto poço) - planta transgênica 5; 6 (sexto poço) - planta transgênica 6; 7 (sétimo poço) - planta transgênica 8. Gel corado com brometo de etídio. As bandas mostradas são de 400 pb.

Uma vez confirmadas as plantas transgênicas estas estão sendo cultivados em casa de vegetação (figura 10).



**Figura 10.** Exemplo de transformante.

## **5. Discussão**

Plantas transgênicas são cultivadas comercialmente em aproximadamente 60 milhões de hectares, o que corresponde a 1/5 de toda área cultivada no mundo. No entanto, uma série de questões relacionadas com a biossegurança de plantas transgênicas tem sido levantada recentemente. Para que a resistência a seca transferida para plantas é necessário responder a uma serie de questões relacionadas a biossegurança.

Resistência à seca é uma característica extremamente importante e que pode dar enormes contribuições sócio-econômicas se incorporada em variedades comerciais de plantas de agricultura familiar como feijão e feijão-de-corda. A EMBRAPA possui o gene BiP que confere alta resistência à seca e este está sendo introduzido nas culturas supracitadas. No entanto os mecanismos moleculares da ação de BiP assim como eventuais efeitos pleiotrópicos advindos da super-expressão de BiP são desconhecidos. Por exemplo, a super-expressão de BiP pode levar à indução de proteínas anti-nutricionais ou alteração de vias metabólicas importantes como no metabolismo de carboidratos. Estes efeitos pleiotrópicos podem ser avaliados através de experimentos de “microarrays”. Esta técnica permite que a expressão de todos os genes de um organismo sejam analisados simultaneamente. No caso de arabisidopsis, “chips” comerciais contendo todos os 27.000 genes estão disponíveis, o que possibilita analisar o efeito da expressão de um transgene (ex. BiP) em todos os genes deste organismo. Para tanto, é necessário a obtenção de plantas transgênicas de arabisidopsis super-expressando o gene BiP. Neste trabalho foram obtidos nove transformantes independentes, que foram auto-polinizados e as sementes geradas estão sendo coletadas. Estas serão germinadas e as plântulas serão submetidas a regime de privação de água. Os transformantes mais resistentes serão utilizados para os experimentos de “microarrays”. Estes transformantes são a base para os estudos de “microarrays” posteriores que permitirão avaliar os possíveis efeitos pleiotrópicos advindos da expressão de BiP e portanto darão uma importante contribuição para análise de biossegurança de plantas transgênicas que podem dar enormes contribuições para o desenvolvimento do semi-árido nordestino.

## **6. Conclusão**

Os resultados obtidos neste trabalho estão dentro do esperado (obtenção de plantas transgênicas), o que promoveu a conclusão da fase inicial do macro-projeto de resistência à seca com satisfação.

As plantas transformadas serão submetidas ao estresse hídrico e utilizadas em experimentos de “microarrays” onde será analisado o perfil de expressão gênico das plantas transgênicas super-expressando BiP e que possuem alta resistência à seca, além dos possíveis efeitos pleiotrópicos advindos da super expressão de BiP .

## 7. Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D.  
*Biologia Molecular da Célula*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Medicas, 1997
- ALVIM, Fátima C.; CAROLINO, Sônia M.B.; CASCARDO, Júlio C.M.; NUNES,  
Cristiano C.; MARTINEZ, Carlos A.; OTONI, Wagner C.; FONTES Elizabeth P.B.  
Enhanced Accumulation of BiP in Transgenic Plants Confers Tolerance to Water  
Stress. *Plant Physiology*, V. 126, pp. 1042–1054. 2001
- BENT, Andrew F. Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects  
for Transformation of Other Species. *Plant Physiology*, Vol. 124, p. 1540–1547. 2000.
- BRASIL, IBGE-SIDRA (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Disponível em:  
<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 2003.
- BRASILEIRO, A. C. M., *et al.* Manual de Transformação Genética de Plantas. 1. ed.  
Brasília: Embrapa, 1998.
- CASCARDO, J. C. M.; ALMEIDA, Raul S.; BUZELI, Reginaldo A. A.; CAROLINO  
Sônia M. B.; OTONI, Wagner C.; FONTES, Elizabeth P. B. The Phosphorylation State  
and Expression of Soybean BiP Isoforms Are Differentially Regulated following  
Abiotic Stresses. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 275, No. 19,  
pp. 14494–14500, 2000.

CASTEL, Nathalie L.; DOOREN, E. P. W. M. J. V.; CROFTS, Andrew J.; DENECKE, J.

Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. *The Plant Cell*, V 11, p. 459–469. 1999.

DUARTE, R. Seca, pobreza e políticas públicas no nordeste do Brasil. *POBREZA, Desigualdad socialy ciudadanía los limites de las politicas sociales en America Latina*, p. 425-440. 2001.

FANKHAUSER, C.; STAIGER, D. Photoreceptors in Arabidopsis thaliana: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock *Planta*, n. 216, p. 1–16. 2002.

GURUSINGHE, S.; POWELL, Ann L.T.; BRADFORD1 Kent J. Enhanced Expression of BiP Is Associated with Treatments that Extend Storage Longevity of Primed Tomato Seeds *J. AMER. SOC. HORT.* V 127, p. 528–534. 2002

HOFFMANN, Matthias H. Biogeography of Arabidopsis thaliana(L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography*, n. 29, p.125-134. 2002.

Hsp70 homologues, *HPS70*. Disponível em:

<<http://pps98.man.poznan.pl/assignments/projects/mak/general.htm>>. Acesso em 2003

KOTCHONI, Simeon O.; GACHOMO, Emma W.; BETIKU, Eriola.; SHONUKAN Olusola. A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *African Journal of Biotechnology*, V .2(4), p. 88–90. 2003.

- LEAL, L. O. P. Seca do Nordeste: verdades e mitos. *Manchete Rural*, V.5. 1998.
- LECLERE S.; BARTEL B. A library of *Arabidopsis* 35S-cDNA lines for identifying novel mutants. *Plant Molecular Biology*, V. 46, p. 695–703. 2001.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.; *Biologia Celular e Molecular*. 4. ed. Rio de Janeiro: Reinventer Ltda, 2002.
- MEINKE, David W.; CHERRY, J. Michael; DEAN, Caroline; ROUNSLEY, Steven D.; KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis*. *SCIENCE*, v. 282, p. 678-682. 1998.
- MEYEROWITZ, Elliot M. Prehistory and History of Arabidopsis Research. *Plant Physiology*, V. 125, pp. 15–19. 2001.
- NUTTALL, J.; VITALE, A.; FRIGERIO, L. C-terminal extension of phaseolin with a short methionine-rich sequence can inhibit trimerisation and result in high instability. *Plant Molecular Biology* 51, p. 885–894. 2003.
- OLINEVICH, O. V.; KHOKHLOVA, L. P. The Effects of Low Temperature and an Antimitotic Drug on the Content and the Localization of Ca<sup>2+</sup>- Binding Proteins of the Endoplasmic Reticulum in Wheat. *BULG. J. PLANT PHYSIOL.*, SPECIAL ISSUE , p.232–241. 2003.
- ROMANO, E.; LACORTE, C. Metodologia para introdução de vetores em *Agrobacterium tumefaciens*. *Comunicado Técnico*, V. 45, p. 1-8. 2000.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; SHINOZAKI, K. Y.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *The Plant Cell*, V 13, p. 61–72. 2001.

STRYER, L. *Bioquímica*. 4. ed . Rio de Janeiro: Gunabara Koogan S.A, 1996

XIANG, C.; HAN, P.; OLIVER, D. J. *In solium* Selection for Arabidopsis Transformants Resistant to Kanamycin. *Plant Molecular Biology*, V 17, p. 59–65. 1999.

