UNIVERSIDADE FEDERALDO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL

MARILÉIA HOFFMANN

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA FAMÍLIA DE GENES *DREB* EM *Zostera marina,* UM MODELO POTENCIAL PARA TOLERÂNCIA À SALINIDADE

IMBÉ
2020

MARILÉIA HOFFMANN

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA FAMÍLIA DE GENES *DREB* EM *Zostera marina,* UM MODELO POTENCIAL PARA TOLERÂNCIA À SALINIDADE

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador (a): Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

IMBÉ
2020

Catalogação de Publicação na Fonte

H698c Hoffmann, Mariléia.
Caracterização *in silico* da família de genes *DREB* em *Zostera marina*, um modelo potencial para tolerância à salinidade. / Mariléia Hoffmann. – Imbé, 2020.
44 f.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Unidade em Litoral Norte - Osório; Imbé, 2020.

1. *DREB* gene. 2. *Zostera marina*. 3. Domain AP2. 4. Valina.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Bibliotecas da Uergs.

MARILÉIA HOFFMANN

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA FAMÍLIA DE GENES *DREB* EM *Zostera marina*, UM MODELO POTENCIAL PARA TOLERÂNCIA À SALINIDADE

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador (a): Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA:

_____
Prof. Dr. Wellington Ferreira Campos
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

_____
Profa. Dra. Kelen Haygert Lencina
Universidade Federal de Santa Catarina

IMBÉ
2020

Dedico este trabalho a minha filha Sarah Hoffmann, pois foi por ela que tive força para não desistir da minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador Enéas Ricardo Konzen, que confiou em mim e sempre me apoiou em todos os dias nessa grande oportunidade que foi realizar esse trabalho.

Agradeço a minha mãe Eliane F. M. da Rocha que, no dia que saiu a lista dos aprovados no vestibular disse que eu tinha conseguido subir apenas o primeiro degrau, passou toda essa trajetória ao meu lado, não deixando eu me abalar com os inúmeros imprevistos que aconteceram. Vibrando, torcendo por mim todo o tempo. Você, mãe, é meu alicerce, meu amor eterno.

Agradeço a meu pai Clóvis da Rocha por todo apoio.

Agradeço a meu irmão Diogo da Rocha por todas as vezes que me incentivou nas apresentações de trabalhos, por estar sempre ao meu lado. Amo-te incondicionalmente, essa conquista também é tua.

Agradeço ao meu marido e amigo Uilian Couto de Oliveira pela compreensão, pela paciência extrema com meus momentos de crise com o trabalho, pelo carinho.

Agradeço a minha cunha, irmã e cúmplice Aline Farias pelos desabafos e torcidas para que esse momento se concretizasse.

Agradeço ao meu sogro Renato Couto e minha segunda mãe Deroni Couto, por toda paciência e confiança para que esse trabalho fosse terminado. Amo vocês.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional e por sempre acreditar em mim.

Agradeço imensamente as minhas colegas Maitê, Vanessa, Fabiana, Manoela, Audrei pela parceria, pelas risadas e momentos infinitos e meu primo Eduardo Trajano por todo apoio na faculdade.

Agradeço à Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, pela formação gratuita e de qualidade que oferece.

A todas as pessoas que voluntariamente ou involuntariamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado!

A união indica a solidariedade entre mentes que aspiram à felicidade do próximo e à prosperidade da comunidade. O primeiro passo é abrir o coração, respeitar os outros e se preocupar com eles. Se esse espírito se disseminar, será possível construir uma sociedade realmente humana e assegurar um futuro radiante "(NRH, v.17 - capítulo Campos Verdejantes, p. 298).

RESUMO

As plantas em seu ambiente natural sofrem estresses causados por inúmeros fatores abióticos e, cada espécie desenvolve mecanismos para sua melhor adaptação. As ervas marinhas podem formar extensos prados que suportam uma elevada biodiversidade, executando papéis ecológicos vitais no ambiente marinho. Os limo-de-fita (*Zostera marina* L.) são plantas com flor amplamente distribuídas ao longo das costas temperadas e tropicais do mundo com uma amplitude que se estende por milhares de quilômetros de linha de costa. Apresenta mecanismos de tolerância a estresses abióticos por meio de uma rede de sinalizações específicas, particular às plantas. Os fatores de transcrição AP2/ EREBP (*EthyleneResponsiveElementBindingProtein*) são uma das superfamílias reguladas por estresses abióticos e bióticos, dividida em quatro subfamílias (AP2, RAV, ERF e DREB). A família DREB pode ser subdividida em seis grupos filogenéticos, tendo como premissa primordial a presença de apenas um domínio AP2 e a conservação de dois aminoácidos, a valina e o ácido glutâmico ao longo do domínio. Esta família engloba genes envolvidos principalmente em respostas à estresses abióticos como seca, salinidade e baixa temperatura. Até o momento, não havia uma categorização detalhada sobre estes genes em limo-de-fita, que é uma espécie modelo para plantas marinhas, tendo seu genoma sequenciado e depositado publicamente. Ao buscar sequências no banco do Phytozome, de 109 que apresentam o domínio AP2, 78 sequências foram excluídas por apresentarem outros domínios. No total, 31 prováveis genes *DREB* foram categorizados. A análise das sequências de aminoácidos das proteínas sugere motivos proteicos com papéis funcionais específicos para cada um dos genes. Distribuídos em seis subgrupos (A-1 a A-6), alguns genes mostraram respostas a altas temperaturas e respostas a estresses osmóticos, a partir da consulta de um conjunto de dados publicados para a espécie. A catalogação de dados de transcritoma das raízes, caule e estágios florais mostrou níveis de expressão diferentes dos genes em cada tecido. Tais análises são importantes para realizar estudos em outras espécies de plantas marinhas, como *Ruppia maritima*, que ocorre ao longo da costa brasileira, inclusive no Litoral Norte do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Gene *DREB. Zostera marina*. Domínio AP2. Valina

ABSTRACT

Plants in their natural environment suffer stresses caused by numerous abiotic factors and each species develops mechanisms for their best adaptation. Seagrass can form extensive meadows that support high biodiversity. They play vital ecological roles in the *marine* environment. Ribbon slime are flowering plants widely distributed along the temperate and tropical coasts of the world with an amplitude that extends for thousands of kilometers of coastline. It presents mechanisms of tolerance to abiotic stresses through a network of specific signals, particularly to plants. AP2 / EREBP transcription factors (*EthyleneResponsiveElementBindingProtein*) are one of the superfamilies regulated by abiotic and biotic stresses, divided into four subfamilies (AP2, RAV, ERF and DREB). The DREB family can be subdivided into six phylogenetic groups, having as primary premise the presence of only one AP2 domain and the conservation of two amino acids, valine and glutamic acid throughout the domain. This family includes genes mainly involved in responses to abiotic stresses such as drought, salinity and low temperature. To date, there was no detailed categorization of these genes in slime (*Zostera marina* L.), which is a model species for *marine* plants, having their genome sequenced and publicly deposited. When searching for sequences in the Phytozome bank, of 109 that present the AP2 domain, 78 sequences were excluded because they presented other domains. In total, 31 probable *DREB* genes were categorized. Analysis of protein amino acid sequences suggests protein motifs with specific functional roles for each of the genes. Distributed in six subgroups (A-1 to A-6), some genes showed responses to high temperatures and responses to osmotic stresses, based on the consultation of a set of published data for the species. The cataloging of transcriptome data for roots, stem and floral stages showed different levels of expression of genes in each tissue. Such analyzes are important to carry out studies on other species of marine plants, such as *Ruppia maritima*, which occurs along the Brazilian coast, including the North Coast of Rio Grande do Sul.

Keywords: *DREB* gene. *Zostera marina*. Domain AP2. Valina

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

FIGURA 1- ALINHAMENTO DO DOMÍNIO AP2 21

FIGURA 2- CATEGORIZAÇÃO DOS SUBGRUPOS 22

FIGURA 3- MOTIVOS CONSERVADOS 25

FIGURA 4- SEQUÊNCIAS DE GENES.....27

FIGURA 5- SUBGRUPOS EXPRESSOS 29

FIGURA 6- FILOGENIA E INDICADORES DE TRANSCRITOS 34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- AMINOÁCIDOS CONSERVADOS.....26

TABELA 2- TODAS AS SEQUÊNCIAS DE *ZOSTERA MARINA* 42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **13**

2. MATERIAL E MÉTODOS **16**

2.1 Busca de sequências contendo o domínio AP2 16

2.2 Verificação da presença do domínio AP2 16

2.3 Conservações dos aminoácidos ao longo do domínio AP2 16

2.4 Busca por motivos proteicos conservados 16

2.5 Alinhamentos das sequências completas 17

2.6 Construção da árvore filogenética 17

2.7 Localização dos íntrons e éxons 17

2.8 Expressão dos genes *DREB* em *Zostera marina* 17

3. RESULTADOS **19**

3.1 Sequências contendo o domínio AP2 19

3.2 Conservações dos aminoácidos valina e divisões em subgrupos 19

3.3 Motivos proteicos conservados 23

3.4 Elementos estruturais dos genes 26

3.5 Expressão de cada subgrupo em *Zostera marina* 28

4. DISCUSSÃO **31**

5. CONCLUSÃO **34**

REFERÊNCIAS **35**

1 INTRODUÇÃO

No ambiente natural, as plantas estão sujeitas a diversos estresses causados por fatores abióticos (SHARMA et al., 2010). A exposição de plantas a condições ambientais adversas como alta salinidade da água ou do solo durante o ciclo de vida limitam severamente o crescimento e o desenvolvimento (SHINOZAKI, 2000). Essas condições promovem a adaptação das plantas aos mais variados ambientes, favorecida pela tolerância às flutuações sazonais de temperatura e pela adaptação térmica, pois algumas espécies de plantas desenvolveram uma complexa rede de sinalização celular e molecular ao longo de sua evolução (SHARMA et al., 2010).

As angiospermas marinhas apresentam adaptações morfofisiológicas aos ambientes submersos e salinos, sendo as únicas plantas vasculares de pequeno porte que ocorrem praticamente em todos os sistemas costeiros (GUTIÉRREZ, 2016). As plantas que crescem em águas salinas com baixa profundidade são influenciadas pelo gradiente de disponibilidade de luz, diferente das espécies que crescem nas áreas mais profundas onde ocorrem respostas fotossintéticas de compensação da luz (WILLIAM e RANDALL, 1985). As regiões litorâneas, regidas pelas marés, apresentam ambiente ricos em nutrientes, comparados com áreas de grandes profundidades que sofrem influências das correntes oceânicas (SPALDING et al., 2003), eventos que possibilitam a dispersão de ervas marinhas e contribuíram para sua adaptação (MCROY, 1969).

Dentre as plantas vasculares, está *Zostera marina* Linnaeus, conhecida popularmente como limo-de-fita. Esta espécie pode ser considerada um modelo de estudo por apresentar adaptação ao ecossistema marinho (VALVERDE, 2004), ter seu genoma sequenciado e detalhadamente examinado (OLSEN et al., 2016). Esta planta ocorre na maioria dos ambientes marinhos de fundo mole com boa nitidez da água (MOORE e SHORT, 2006). Na costa europeia, especificamente no sul de Portugal, *Z. marina* encontra-se em regiões de até 12m de profundidade (MOORE e SHORT, 2006). Ocorre também no entorno da orla do Pacífico desde o Japão, Coréia e China, já no norte do Mar de Bering até o Golfo da Califórnia (MCROY, 1969). Na América do Norte, cresce muito mais a sul (MELING-LOPEZ e IBARRA-OBANDO, 2000). A espécie tem importante contribuição ecológica e econômica, sendo refúgio de peixes, crustáceos e moluscos de importância comercial, recreativa e ecológica. Representa um componente da alimentação de muitas espécies de

aves aquáticas (GREEN e SHORT, 2003).

Como todos os demais ecossistemas, os oceanos são impactados pela atividade humana e o declínio de populações de limo-de-fita é cada vez mais intenso (SHORT et al., 2006b). Os efeitos causados pelas alterações climáticas globais e sua influência são fatores importantes a serem considerados, embora difíceis de registrar (SHORT e NECKLES, 1999). Assim, é importante entender melhor a adaptação de plantas aos ambientes marinhos, incluindo o entendimento de genes associados à tolerância a estresses abióticos, bem como servir de base para o estudo de espécies relacionadas filogeneticamente.

A capacidade de concluir o ciclo de vida em um substrato que contém grandes concentrações de sais solúveis torna as plantas imensamente tolerantes ao estresse (SILVEIRA et al., 2010). Essa capacidade é determinada pelas múltiplas vias bioquímicas que promovem a retenção e/ ou a aquisição de água, resguardando as funções fotossintéticas e conservando a homeostase iônica (ESTEVES e SUZUKI, 2000). A priori, o excesso de sais na planta pode restringir o transporte de água, desencadeando uma sequência de reações, restringindo a abertura estomática e assimilação fotossintética de CO_2 (SILVEIRA et al., 2010). Dessa forma, o mecanismo de tolerância de algumas plantas é a capacidade de absorção seletiva de K^+ associada à extrusão de Na^+ (WILLANDINO e CAMARA, 2010). Muitas espécies tolerantes à salinidade acumulam metabólitos que realizam funções cruciais como osmoprotetores e a outros tipos de proteção (ESTEVES e SUZUKI, 2008).

O mecanismo molecular que *Z. marina* possui em resposta à tolerância a fatores abióticos (PAK et al., 1995), varia com a concentração de sal, influenciando a entrada e saída de Na^+, Cl^- e K^+ (TYERMAN, 1989). Isso envolve proteínas de transporte das membranas, ativando a permeabilidade para passagem de íons e permitindo que os solutos fluam através da membrana. Este sistema de transporte permite a manutenção de gradientes metabólicos e íons essenciais para o crescimento e desenvolvimento (GUTIÉRREZ, 2016).

A regulação da expressão gênica, processo essencial em vegetais, ocorre por mecanismos complexos, dentre os quais se destaca a regulação por fatores de transcrição (TF) (GROTEWOLD et al., 2010). Alguns fatores reagem como redes de sinalização associados que regulam a co-expressão de genes responsivos ao estresse para amenizar o dano celular (MALLIKARJUNA et al., 2011). Dentre os

reguladores existe a superfamília gênica APETALA 2 ethylene-responsive AP2/EREBP (*EthyleneResponsiveElementBindingProtein*), ligada a estresses bióticos e abióticos (REGO, 2015), composta pelo domínio AP2, normalmente formado por 60 aminoácidos (JOFUKU et al., 1994). Essa família é praticamente específica de plantas (SAKUMA et al., 2002), sendo subdividida em quatro subfamílias: *AP2*, *RAV*, *ERF* e *DREB* (MIZOI et al., 2012). Os *DREB* (*DehydrationResponsiveElementBinding*) são genes importantes para conferir tolerância a fatores abióticos (CHEN et al., 2016), codificando proteínas que reconhecem o elemento *cis DRE* (ITO et al., 2012). Estes fatores de transcrição podem ser classificados em seis subgrupos filogenéticos (A-1 a A-6), apresentando motivos proteicos que dão consideráveis suportes a esta classificação (KONZEN et al., 2019). Especificamente, para proteínas DREB, dois aminoácidos são altamente conservados, tendo um papel primordial na determinação da especificidade de ligação ao DNA, o aminoácido 14 (valina) em anexo na (tabela 2), contendo todas as sequências e 19 (ácido glutâmico) do domínio AP2 (SAKUMA et al., 2002).

O objetivo do presente trabalho consistiu em caracterizar os genes *DREB* de limo-de-fita, verificando aminoácidos conservados, separando-os em subgrupos e identificando motivos proteicos conservados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A expressão de todos os possíveis genes *DREB* foram catalogados a partir da publicação de Olsen et al., (2016), com dados de sequenciamento de RNA para tecidos das fases vegetativa, raízes e estágios de desenvolvimento floral, em *Zostera marina*.

Apresenta-se uma sequência de métodos para classificar os possíveis genes *DREB* na espécie.

2.1 BUSCA DE SEQUÊNCIA CONTENDO O DOMÍNIO AP2

Primeiramente, a busca teve como ponto de partida as sequências de *Z. marina* para os genes *DREB,* realizadas na ferramenta Phytozome 12.1 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html), com análises *in silicio* visando encontrar ortólogos em *Oryza sativa* e *Arabidopsis*. Para esta busca de sequências, o critério inicial foi à presença de domínio AP2. No total, 109 sequências foram exibidas após a pesquisa do termo “AP2”. As pesquisas foram feitas baseados nos trabalhos de Sakuma et al. (2002), Nakano et al. (2006) e Konzen et al. (2019).

2.2 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO DOMÍNIO AP2

As sequências foram verificadas quanto à presença de apenas uma cópia do domínio AP2, no NCBI Domain Finder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi).

2.3 CONSERVAÇÕES DOS AMINOÁCIDOS AO LONGO DO DOMÍNIO AP2

Seguindo Sakuma et al. (2002), foi verificado se os aminoácidos conservados nas posições 14 e 19 correspondiam à valina (V) e ácido glutâmico (E), respectivamente.

2.4 BUSCA POR MOTIVOS PROTEICOS CONSERVADOS

Os critérios de busca de motivos foram baseados em estudos anteriores

(NAKANO et al., 2006), utilizando a ferramenta MEME Suite (http://meme-suite.org/) (BAILEY et al., 2009). Usou-se o limiar de detecção de motivos com o número máximo de 20 motivos sem que houvesse similaridade significativa entre eles.

2.5 ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS

As possíveis proteínas DREB reconhecidas foram alinhadas no programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999). Verificou-se a conservação dos aminoácidos valina (V) e ácido glutâmico (E) no início do domínio AP2, essencial para a ligação das proteínas DREB aos seus reguladores, priorizando a valina (V) (SAKUMA et al., 2002). Descartaram-se as sequências que não atendiam a este critério.

2.6 CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

O alinhamento das sequências completas de proteínas categorizadas como possíveis DREB foi realizado no programa BioEdit, usando o algoritmo Clustal W (http://www.genome.jp/tools/clustalw/) e a análise filogenética foi feita no MEGA X (TAMURA et al., 2011). Comparando as sequências de DREB de *Arabidopsis* e *Oriza sativa* (NAKANO et al., 2006; ZHANG et al., 2008), verificou-se quais se agrupavam filogeneticamente com as sequências de limo-de-fita. Para realizar a construção da árvore, usou-se o modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT), com distribuição gama (G) como modelo de substituição de aminoácidos mais verossímil. A construção da árvore filogenética foi feita usando o método de máxima verossimilhança (MV). A árvore foi construída com 500 reamostragens (método bootstrap), que representou a porcentagem em que os ramos se mantinham.

2.7 LOCALIZAÇÕES DOS ÍNTRONS E ÉXONS

Para complementar os estudos, foi avaliada a estrutura dos prováveis genes *DREB* através da ferramenta GSDS 2.0 (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/) (BO H. et al., 2015) e a identificação dos íntrons e dos éxons.

2.8 EXPRESSÕES DOS GENES *DREB* EM *Zostera marina*

Dados obtidos da publicação de Olsen et al. (2016), de sequenciamento de RNA, permitiram compilar e calcular médias de expressão de cada um dos genes em tecidos, em diferentes fases do crescimento: raízes, folhas e diferentes estádios florais. Além disso, compilaram-se dados de expressão gênica de genes contendo domínio AP2 a partir de transcritoma realizado por Malandrakis et al. (2017), em espécie relacionada, a *Cymodocea nodosa*, sob estresse osmótico.

3 RESULTADOS

3.1 SEQUÊNCIAS CONTENDO O DOMÍNIO AP2

Do alinhamento desenvolvido no programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL,1999), sete sequências (Zosma258, Zosma2, Zosma29, Zosma49, Zosma320, Zosma7 e Zosma8 – ver no Anexo A) não apresentaram domínio AP2 conservados mas, a presença de Adaptin_Nsuperfamily, Alpha_adaptin_Csuperfamily, Alpha_adaptinC2, AP2_Mu_N, AP_MHD_Ctermsuperfamily, STKc_GAK_like, Herpes_BLLF1 superfamily, NEMO superfamily, Macoilinsuperfamily, F-box, AP2_sigma. Outras setes (Zosma178, Zosma214, Zosma48, Zosma224, Zosma89, Zosma56, Zosma99 – ver no Anexo A) apresentaram um domínio AP2 conservado mais a presença do complexo B3, DUF3984, Macoilinsuperfamily, TALPID3 superfamily, Bfil_C_ecoRII_N_B3 superfamily. Quinze sequências apresentaram dois domínios AP2 conservados e quarenta e cinco sequências apresentaram somente a presença de um domínio AP2 conservado, resultado que eliminou tais sequências. A análise foi reavaliada com minucioso cuidado para determinar com a melhor precisão os possíveis genes *DREB* de limo-de-fita.

Categorizou-se 31 prováveis genes *DREB* distribuídos entre seis subgrupos (A-1 a A-6), obtidos da amostra da espécie *Z. marina*. O processo para descrever as proteínas DREB seguiu Sakuma et al. (2002) e Konzen et al. (2019). O Anexo A apresenta a lista de domínio e a conservação dos aminoácidos de cada sequência.

3.2 CONSERVAÇÃO DO AMINOÁCIDO VALINA E DIVISÃO EM SUBGRUPOS

As proteínas DREB foram categorizadas e classificadas nos subgrupos (A-1 a A-6), com base na análise filogenética comparativa com *Oryza sativa* e *Arabidopsis.* Todas tiveram a posição 14 desde o início do domínio AP2 conservado sempre com o aminoácido valina (Figura 1). O aminoácido 19º foi representado pelo ácido glutâmico em todos os membros dos subgrupos A-2, A-3 A-4 e A-5, quatro proteínas do subgrupo A-1. No entanto, nenhum representante do subgrupo A-6 teve a presença de ácido glutâmico. Zosma330 oscilou entre dois subgrupos (A-5 e A-6), não sendo adicionada a um subgrupo específico, porém, mantida devido sua verificação contendo um domínio AP2 e o aminoácido valina (V) localizado na

posição 14. Contudo, algumas correções foram realizadas e o processo de construção das figuras para apresentar a filogenia *in silicio* seguiu com o programa inicial, Zosma106g00240 e Zosma106g00760 foram mantidas para demonstração de análise de conservação. A categorização das proteínas teve variação entre os subgrupos (A-1= 6; A-2 = 3; A-3 = 2; A-4 = 10; A-5 = 3; A-6 = 6) (Figura 2).

.

GRUPOS					
A1-17	-----YRGVR-CR GV-KW	V	SEIR ---	Q	PGK- AKRIWLGT YHLPEMAAIA YDVASFALRG -VDAVLNFPD SVKS-
A1-21	----YKGVR-KR NVDKW	V	CEVR ---	E	PNK- KSRIWLGT FPTAEMAARA HDVAAMALRG -RSACLNFAD S----
A1-81	----FHGVR-ER NGGKW	V	CEIR ----	E	PLK- KARIWLGT YQTPEMAARA HDVAAIALRG -KYAMLNFKD S----
A1-161	----YHGIR-KR KWGKW	V	SEIR ----	E	PGK- KTKIWLGS FESPEKAAVA YDVAALSLKG -HQAWLNFP- -----
A1-171	----YKGVR-RR NADKW	V	CEVR ---	E	PNK- KSRIWLGT FPTAEMAARA HDVAAIALRG -KSACLNFAD S----
A1-193	-----YRGVR-CR GV-KW	V	SEIR ---	Q	PGK- AKRIWLGT YHLPEMAAIA YDVASFTLRG -VDAVLNFPD SVKS-
A2-26	-NYRGVR-QR TWGKW	V	TEIR ---	E	PNR- GHRLWLGT FPTSLEAALA YDEAAKAMYG -SSARLNLPE -----
A2-37	---YRGVR-QR TWGKW	V	SEIR----	E	PNR- GARLWLGT FNTSLEAAQA YDHAARSLYG -DCARLNL-- -----
A2-141	-NYRGVR-QR TWGKW	V	AEIR----	E	PNR- GKRLWLGT FPTSLDAARA YDEAAKAMYS -SSARLNLNT SP---
A3-1	-RYRGVR-QR SWGKW	V	AEIR ---	E	PRK- RTRKWLGT FSTAEDAAKT YDRAALMLYG -SRAQLNLQP S----
A3-778	-RYRGVR-QR SWGKW	V	AEIR ---	E	PRK- RTRKWLGT FSTAVEAAKA YDRAAVMLYG -SRAQLNLQP SAP--
A4-5	--YRGVR-MR NWGKW	V	SEIR ---	E	PRK- KSRIWLGT FPTPEMAARA HDVAALSIKG -DAAFLNFP- -----
A4-19	--YRGVR-MR NWGKW	V	SEIR ---	E	PRK- KSRIWLGT FPTPEMAARV HDVAALSIKD -DVAFLNFPI SS---
A4-31	--YRGVR-MR NWGKW	V	SEIR ---	E	PKK- KSRIWLGT FPTAEMAARA HDVAALSIKG -ESTYLNFPE L----
A4-52	HYRGVR-MR NWGKW	V	SEIR ---	E	PRK- KTRIWLGT FPTAEMAARA HDVAALSIKG -ESAFLNFPE L----
A4-83g80	--YHGVR-MR SWGKW	V	SEIR ---	E	PKK- NSRIWLGT FRTAEMAARA HDVAARSIKG -ESAILNFP- -----
A4-83g90	-NYHGVRMRSWGKW	V	SEIR ---	E	PKK- KSRIWLGTFATAEMAARAHDVAACSIKGESAVVNFPEL
A4-98	-YHGVR-MR NWGRW	V	SEIR ---	E	PKK- KSRIWLGT YPTAEMAARA HDVAELTIKG KAAANLNFPE H----
A4-113	--YRGVR-MR NWGKW	V	SEIR ---	E	PRK- KSRIWLGT FPTPEMAARV HDVAALSIKG -NAAFLNFP- -----
A4-178	--YRGVR-MR NWGKW	V	SEIR ---	E	PRK- KSRIWLGT FRTPEMAARA HDVAAMSIKG -NSAILNFP- -----
A4-317	-SYHGVR-MR SWGKW	V	SEIR ---	E	PKK- KSRIWLGT FPTAKMAARA HDVAAMTVKG -SSAILNFPE L----
A5-51	-RYRGVR-MR KWGKW	V	AEIR ---	E	PNK- RSRIWLGS YSTAIAAAKA YDTAVFCLRG -RSARLNFPE ELAE-
A5-237	--KYRGIR-MR KWGKW	V	AEVR---	E	PNK- RSRIWLGS YSTPIAAAKA YDTAMFHLRG -RSARLNFPM EFADK
A5-440	----YKGIR-MR KWGKW	V	AEIR ---	E	PNK- RSRIWLGS YSTAIAAAKA YDIAVFCLRG -RSARLNFPE EFKEE
A6-2	---YRGVR-QR HWGKW	V	AEIR ---	L	PQN- RMRVWLGT YDSAETAAFA YDRAAHKLRG -EYARLNFPE LN---
A6-9	-KFRGVR-QR HWGSW	V	SEIR ----	H	PLL- KRRVWLGT FETAEEAAKA YDEAAVIMSG -RNAKTNFPV LEGHS
A6-16	---KFIGVR-QR QSGRW	V	AEIK ---	G	TSKTTQ- KIRMWLGT FKTAEEAARA YDEAACLLRG -S-------- -----
A6-25g360	-RYRGVR-QR HWGSW	V	SEIR ----	H	PLL- KTRVWLGT FETAEDAARA YDEAARWMCG -PRAKTNFPY DPNAS
A6-25g260	-NYRGVR-RR PWGKW	V	AEIR ----	N	PKQ- ATRVWLGT FETAEEAALS YDRAAIEFHG -PRAKLNFSP TL---
A6-234	-KFRGVR-QR HWGSW	V	SEIR ---	H	PLL- KRRVWLGT FETAEEAARA YDQAAVVMSG -RNAKTNFPV TTVNS
A-330	-QYRGVR-MR SWGSW	V	SEIR ---	A	PNQ- KTRIWLGS YSTAEAAARA YDAALFIVKG SINANFNFPE IL---
Zos106g0	---YRGVR-QR PWGKFA	A	EIR -----	D	PKKK GSRVWLGT YDTSVDAAKA YDLAAFKMRG -SKAILNFPN EINP-
Zos106g0	-HYRGVR-QR PWGKFA	A	EIR -----	D	PSKK GARVWLGT FKTSEEAALA YDRAAFRMRG -SRALLNFP- -----

Figura 1: Alinhamento do domínio AP2; aposição 14º descrita como importante para a ligação a proteínas, apresenta 100% de conservação do aminoácido Valina (V).

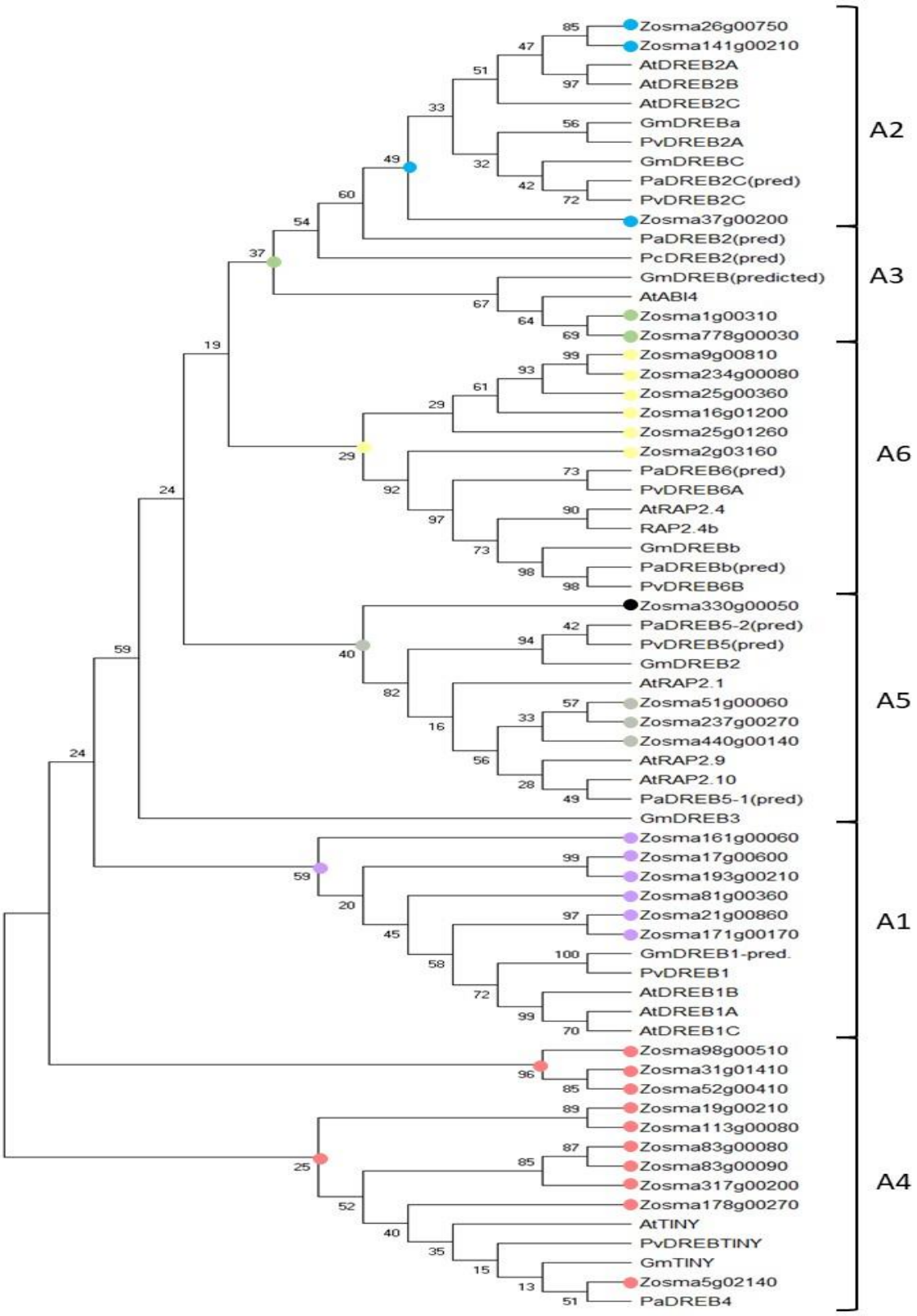


Figura 2: Árvore filogenética construída por máxima verossimilhança. Categorização dos subgrupos (A-1 a A-6).

3.3 MOTIVOS PROTEICOS CONSERVADOS

Motivos proteicos podem constituir marcadores filogenéticos para a definição de subgrupos DREB, podendo ter papéis funcionais específicos para cada um dos genes (KONZEN et al., 2019). Os motivos apresentaram sequências conservadas ao longo de cada proteína. MC1 (RIWLGTFPTAEMAARAYDVAALSJKGS) estava presente em todas as sequências. MC2 (YRGVRMRNWGKWVSEIREPNKKS) estavam presentes em 23 sequências (Zosma178, Zosma113, Zosma31, Zosma19, Zosma5, Zosma51, Zosma317, Zosma83g90, Zosma98, Zosma778, Zosma1, Zosma440, Zosma237, Zosma37, Zosma141, Zosma26, Zosma21, Zosma171, Zosma2, Zosma81, Zosma25g60, Zosma9 e Zosma16) analisadas nos subgrupos de A-1 a A-6. MC3 (SAVLNFPDLVDSLPRPASSSPKDIQAAAAKAA) estava presente em 14 sequências (Zosma52, Zosma178, Zosma317, Zosma5, Zosma83g80, Zosma31, Zosma17, Zosma98, Zosma21, Zosma193, Zosma83g90, Zosma161, Zosma171 e Zosma81) entre os subgrupos A-1 e A-4. MC4 (WGKWVSEIRZP) foi encontrado em sete sequências nos subgrupos A-1, A-4 e A-6, em posições diferentes ao longo da sequência do peptídeo e na sequência Zosma330 (Zosma161, Zosma83g80, Zosma52, Zosma234, Zosma25g60, Zosma193 e Zosma17). MC5 (SARLNFP) foi encontrado em 16 sequências nos subgrupos A-2, A-3, A-4, A-5 e A-6, mais a proteína Zosma330 (Zosma440, Zosma237, Zosma51, Zosma2, Zosma234, Zosma9, Zosma19, Zosma25g360, Zosma113, Zosma26, Zosma25g60, Zosma16, Zosma778, Zosma1, Zosma37 e Zosma141). O MC6 (DKEIKELAWEDENHEFMDEDEMYNMPKFLENMAEAMLMSPPRMNPAASDE) foi encontrado em apenas duas sequências (Zosma17 e Zosma193), caracterizados dentro do subgrupo A-1. MC7 (RYQISIAKQLIQEGSDSWNTISGKDLNHAPLLVKINETLVHKV) foi encontrado em duas sequências (Zosma19 e Zosma113) no subgrupo A-4. MC8 (KGCMKGKGGPDNSNC) foi encontrado em quatros sequências (Zosma141, Zosma37, Zosma26 e Zosma778) nos subgrupos A-2 e A-3. MC9 (YRGVRMR) foi encontrado em sete sequências (Zosma193, Zosma17, Zosma52, Zosma25, Zosma83g80, Zosma234 e Zosma161) nos subgrupos A-1, A-4 e A-6, mais o peptídeo Zosma330. MC10 (EDKTLFDLPDLFVDHCGNVDCFYSFL) foi encontrado em quatros sequências (Zosma52, Zosma31, Zosma98 e Zosma317) no subgrupo A-4. MC11 foi detectado apenas no subgrupo A-6

(VLSQKLRRCCKTPSPSLTCLRLDAEKSHIGVWQKRAGVKSDSNWVMKIEF) presente em duas sequências (Zosma234 e Zosma9). MC12 (KRKAGRTKFKETRHP) foi encontrado em três sequências (Zosma171, Zosma21 e Zosma81) no subgrupo A-1. MC13 (EELGZIIELPRID) foi encontrado em cinco sequências (Zosma83g80, Zosma83g90, Zosma5, Zosma178 e Zosma317) no subgrupo A-4. MC14 (KVWKNPDLNQKPSPECS) foi encontrado em três sequências (Zosma51, Zosma237 e Zosma440) no subgrupo A-5. MC15 (MEEGADQRRCPIEQYH) foi encontrado em duas sequências (Zosma1 e Zosma778) no subgrupo A-3. MC16 (IRKKATEVGARVDAVQ) foi encontrado em três sequências (Zosma51, Zosma440 e Zosma237) no subgrupo A-5. MC17 (DDSVPTPLALRKSPTSSSSAMVGVDGNHLMPAASTASPGKH) e MC18 (PKGSDCDAILWNHDL) foram encontrados em duas sequências (Zosma17 e Zosma193), membros do subgrupo A-1. MC19 (GIDEEDKIALQMIEELLNRNC) foi encontrado em duas sequências (Zosma9 e Zosma234), nos representantes do subgrupo A-6 e, MC20 (KWKQLNRQLENGKDG) foi encontrado em duas sequências (Zosma26 e Zosma141), ambas do subgrupo A-2.

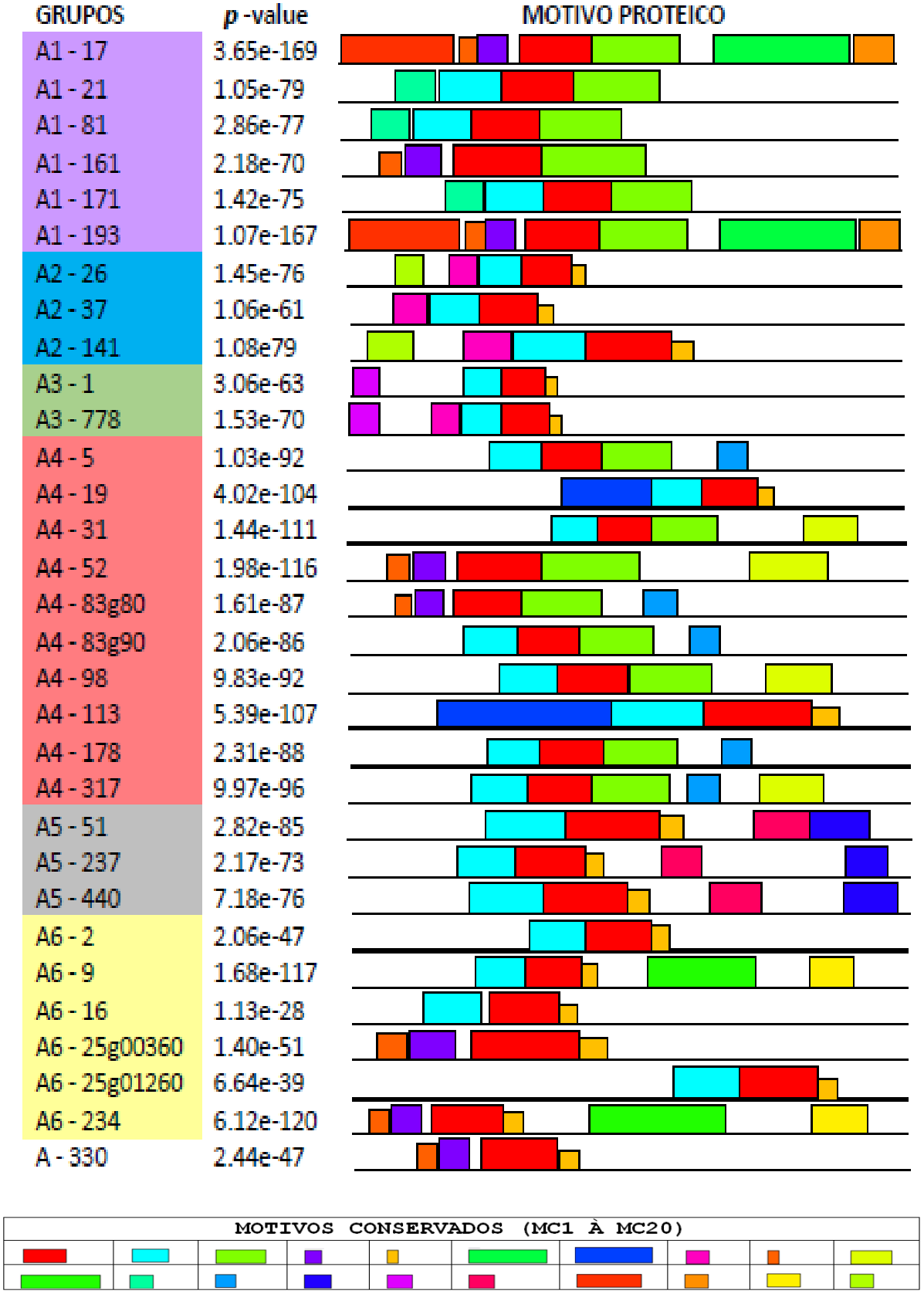


Figura 3: Motivos proteicos conservados ao longo da cadeia de aminoácidos de 31 prováveis proteínas DREB, divididas por subgrupos.

TABELA 1: MOTIVOS PROTEICOS CONSERVADOS AO LONGO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS EM *Zostera marina*.

Nº	Símbolos	Motivos Conservados	Amin./Cons.	Grupos
MC1		RIWLGTFPTAEMAARAYDVAALSJKGS	Arginina	(A-1 à A-6)
MC2		YRGVRMRNWGKWVSEIREPNKKS	Tirosina	(A-1 à A-6)
MC3		SAVLNFPDLVDSLPRPASSSPKDIQAAAAKAA	Serine	(A-1 a A-4)
MC4		WGKWVSEIRZP	Triptofano	(A-1, A-4 e A-6)
MC5		SARLNFP	Serine	(A-2, A3, A4, A5 e A-6)
MC6		DKEIKELAWEDENHEFMDEDEMYNMPKFLENMAEAMLMSPPRMNPAASDE	Acido aspártico	(A-1)
MC7		RYQISIAKQLIQEGSDSWNTISGKDLNHAPLLVKINETLVHKV	Arginina	(A-4)
MC8		KGCMKGKGGPDNSNC	Lisina	(A-2 a A-3)
MC9		YRGVRMR	Tirosina	(A-1, A-4 e A-6, mais o peptídeo Zosma330)
MC10		EDKTLFDLPDLFVDHCGNVDCFYSFL	Acido glutâmico	(A-4)
MC11		VLSQKLRRCCKTPSPSLTCLRLDAEKSHIGVWQKRAGVKSDSNWVMKIEF	Valina	(A-6)
MC12		KRKAGRTKFKETRHP	Lisina	(A-1)
MC13		EELGZIIELPRID	Acido glutâmico	(A-4)
MC14		KVWKNPDLNQKPSPECS	Lisina	(A-5)
MC15		MEEGADQRRCPIEQYH	Metionina	(A-3)
MC16		IRKKATEVGARVDAVQ	Isoleucina	(A-5)
MC17		DDSVPTPLALRKSPTSSSSAMVGVDGNHLMPAASTASPGKH	Acido aspártico	(A-1)
MC18		PKGSDCDAILWNHD	Prolina	(A-1)
MC19		GIDEEDKIALQMIEELLNRNC	Glicina	(A-6)
MC20		KWKQLNRQLENGKDG	Lisina	(A-2)

3.4 ELEMENTOS ESTRUTURAIS DOS GENES

A maioria dos genes não apresentou íntrons, apenas uma região codificadora contínua. Regiões Upstream/Downstrean se mostraram presente na maioria das sequências dentro dos subgrupos (A-1 a A-6). Os íntrons localizaram-se apenas em algumas sequências dos subgrupos A-2, A-4 e A-6 (Zosma26, Zosma19, Zosma113, Zosma9, Zosma25 e Zosma234). A inexistência desse complexo ocorreu nos subgrupos A-1, A-3 e A-5 (Figura 4).

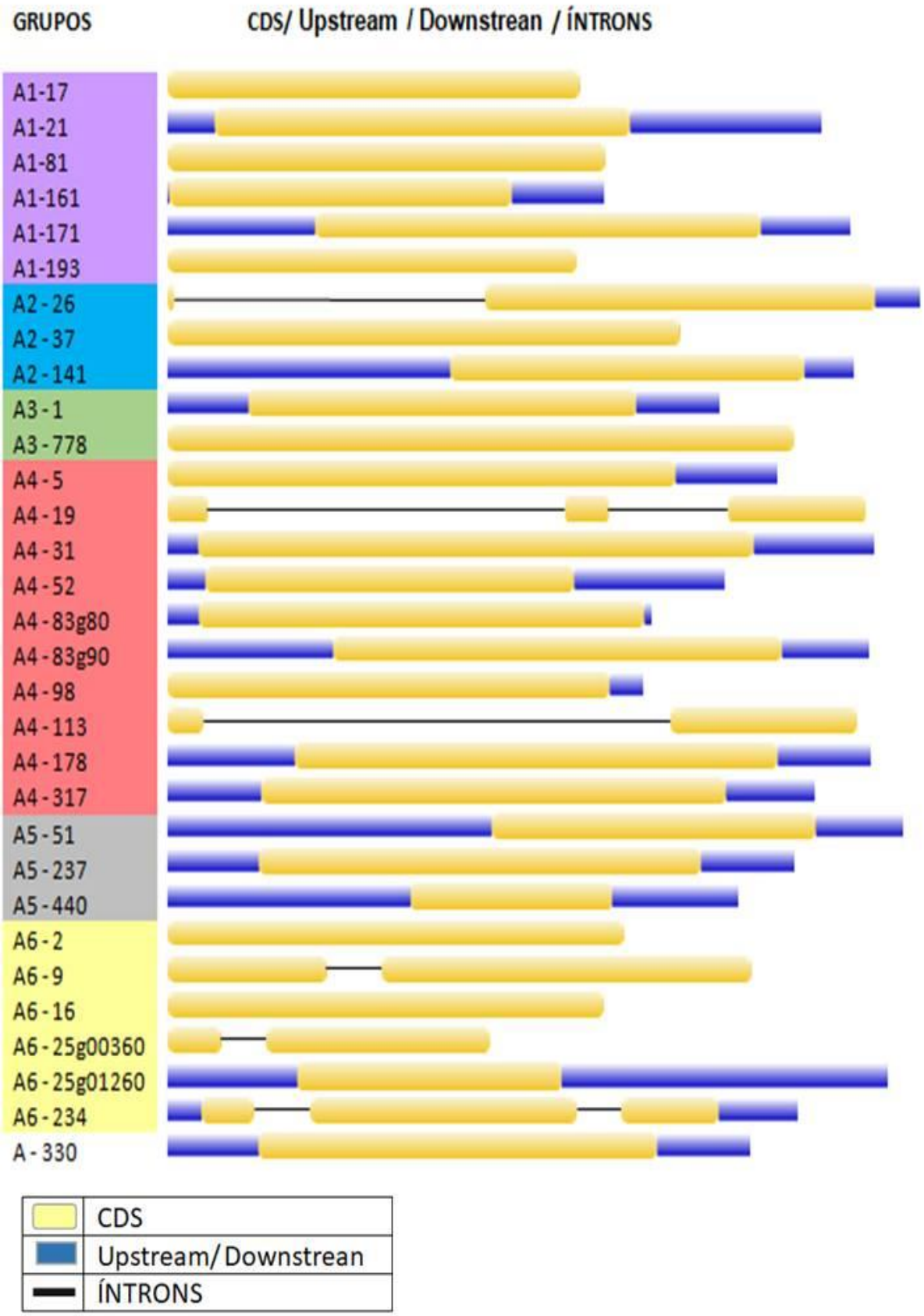
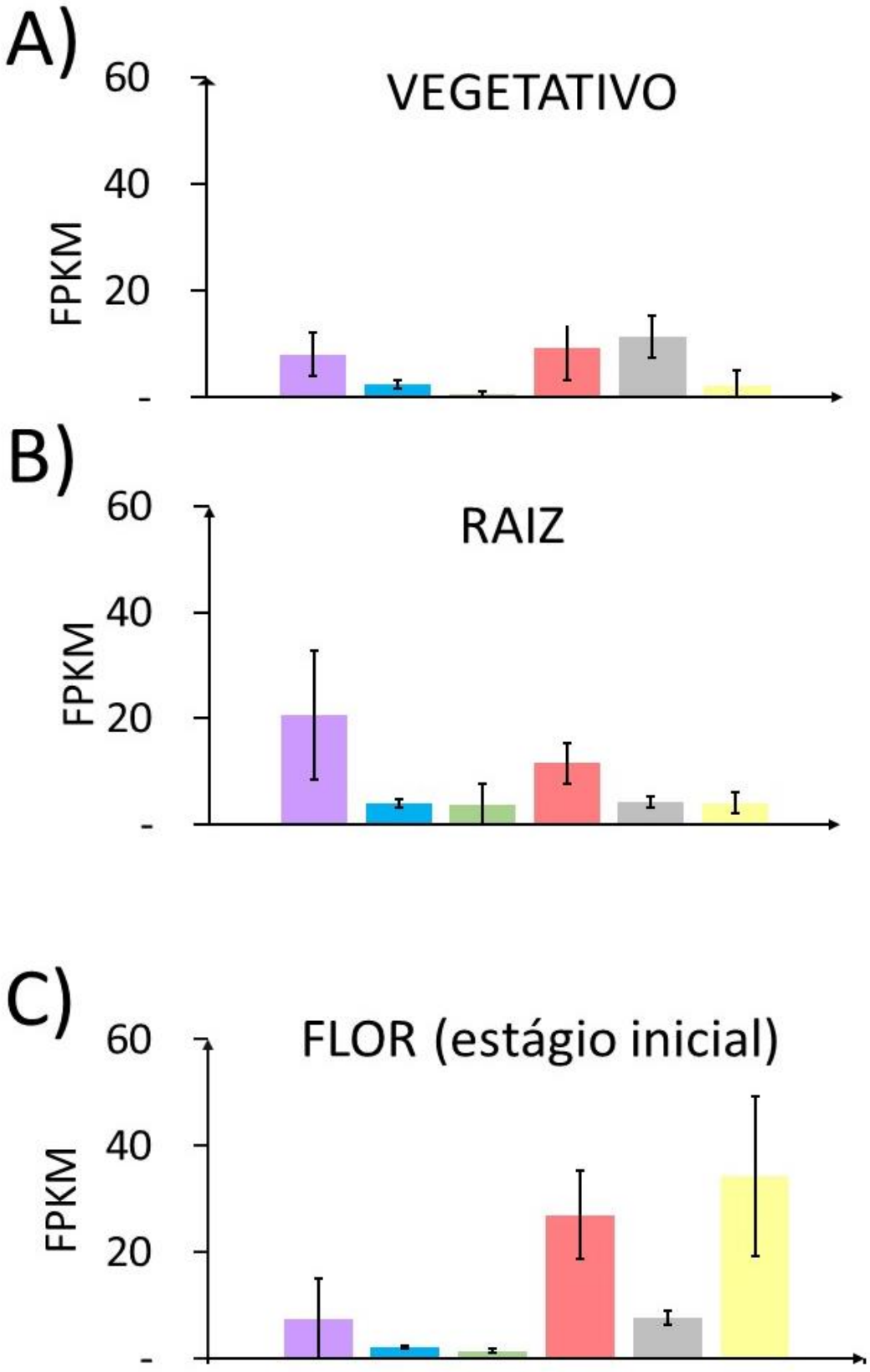


Figura 4: Sequências de genes *DREB* de *Zostera marina.* Íntrons e éxons estão representados nas cores em preto e amarelo.

3.5 EXPRESSÃO DE CADA SUBGRUPO EM *Zostera marina*

Os fatores de transcrição aumentam sua expressão quando ativados por determinados estímulos, como os induzidos por fatores abióticos. Os resultados dos valores de FPKM recuperados da base de dados suplementares foram compilados (Figura 5) para os genes *DREB* categorizados em *Z. marina.* Predominantemente na fase vegetativa a expressão maior foi pelos membros dos subgrupos A-1, A-4 e A-5. Na raiz os valores de expressão foram maiores entre os subgrupos A-1 e A-4. Os subgrupos A-4 e A-6 tiveram alta expressão no estágio inicial de floração, em seguida o subgrupo A-3 apresentou-se semelhante aos subgrupos A-4 e A-6, diminuindo consideravelmente sua expressão no estágio seguinte.


A)
VEGETATIVO
FPKM
60
40
20
-
B)
RAIZ
FPKM
60
40
20
-
C)
FLOR (estágio inicial)
FPKM
60
40
20
-

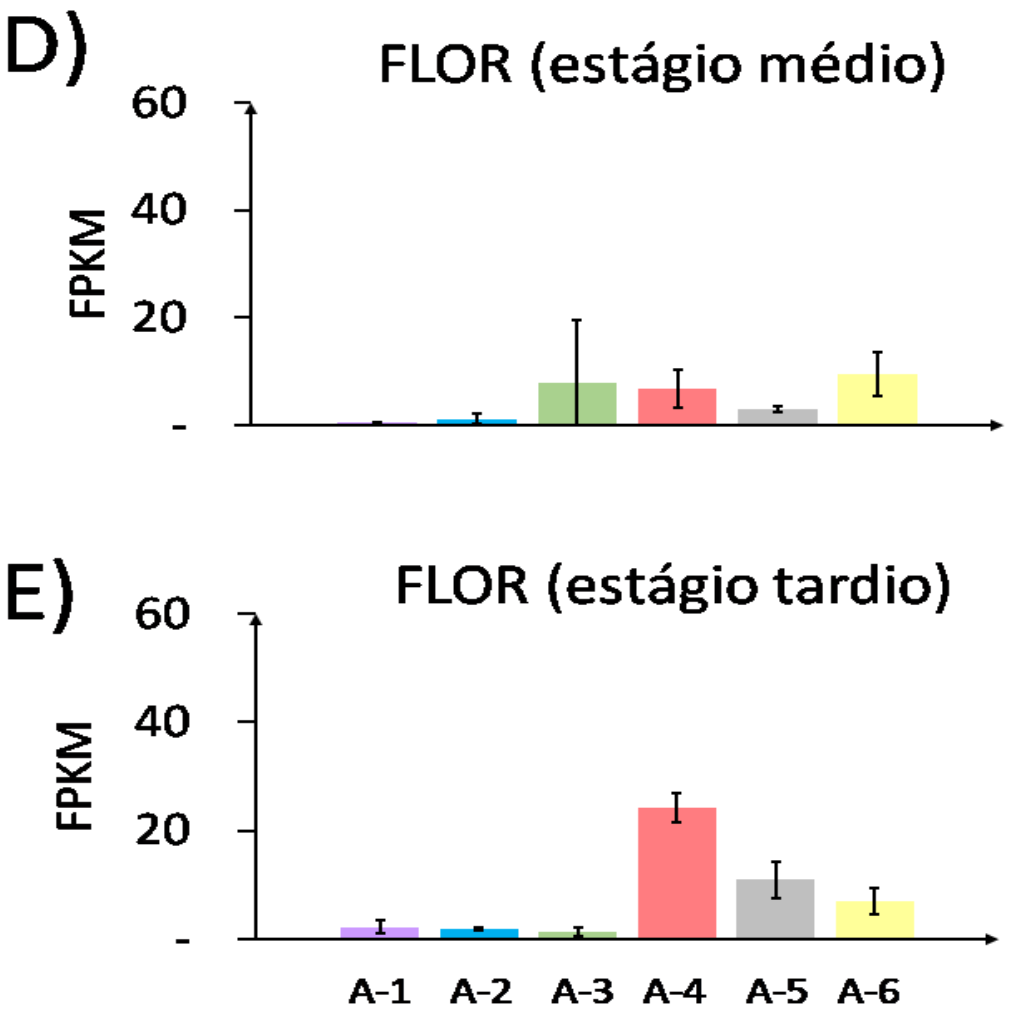


Figura 5: Subgrupos expressos nas fases de crescimento. Baseado e compilado a partir do transcritoma de Olsen et al. (2016).

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho categorizou-se a subfamília de genes *DREB* em *Zostera marina.* O resultado contou com 31 prováveis genes *DREB* que foram divididos em seis subgrupos, de acordo com estudos anteriores para *Arabidopsis* (SAKUMA et al., 2002; NAKANO et al., 2006). Todos os genes categorizados apresentaram a conservação do 14º aminoácidos dentro do domínio AP2 que identifica os genes, sendo a valina (SAKUMA et al., 2002). O número de genes *DREB* categorizados em limo-de-fita foi semelhante à soja (*Glycinemax*), descrita com apenas 36 supostos genes *DREB* (*GmDREB*) (ZHANG et al., 2008). Número inferior comparado com a categorização em *A. thaliana*, que possui 57 genes *DREB* (*AtDREB*) separados em quatro subgrupos principais na superfamília AP2/ERF (NAKANO et al., 2006). No feijoeiro, 54 genes *DREB* foram categorizados (KONZEN et al., 2019).

A análise dos motivos proteicos no MEME Suite mostrou regiões conservadas dentro dos subgrupos DREB, indicando o seu potencial como marcadores filogenéticos para cada subdivisão. A exclusividade de alguns motivos dentro dos subgrupos pode estar relacionada com funções específicas nas quais os membros estão envolvidos (KONZEN et al., 2019). As sequências foram alinhadas com representantes de *Arabidopsis, Oryza sativa* e *Z. marina*, usando o método de substituição de aminoácidos, e posteriormente a reconstrução da árvore seguiu o modelo de máxima verossimilhança (ML) (HARTLEY e RAO, 1967).

Esse controle na taxa de iniciação da transcrição por fatores de regulação representam o meio principal utilizado pelas células para modular a expressão (MESHI e IWABUCHI, 1995). A busca dos fatores transcricionais que controlam a expressão dos possíveis genes *DREB* em *Zostera marina* envolvidos nas respostas a estresses é de fundamental importância para auxiliar no conhecimento do mecanismo de funcionamento das vias nas plantas em geral. Genes induzidos por estresses caracterizados em *Arabidopsis* e *Oriza sativa* mostraram indicadores para a percepção dos sinais nas células das plantas, fatores estes que controlaram a expressão de vários grupos ao mesmo tempo e podem ser o ponto de interação entre vias de sinalização que levaram ao controle da resposta comum a diferentes estresses (COSTA et al., 2008). Dependentes ou independentes de ácido abscísico (ABA) são sinais fisiológicos que ativam respostas de estresses (HUBBARD et al., 2010). Induzindo a ativação de genes que atuam em ajustamento osmótico,

compartimentalização de íons, condutividade hidráulica da raiz, regulação do crescimento da parte aérea, do sistema radicular e a limitação da taxa de transpiração (VERSLUES e ZHU, 2005).

Os cálculos realizados nesta categorização mostraram as expressões dos subgrupos (A-1 a A-6), em tecidos das fases vegetativa, raiz e flores. Estudos em distância evolutiva mostram que os membros do subgrupo A-3 têm função na sinalização de ABA e são altamente relacionados aos membros do subgrupo A-2 (MIZOI et al., 2012). Os representantes A-2 estão envolvidos primordialmente em respostas a estresses osmóticos, enquanto o subgrupo A-1 quando induzidos, ativam os genes responsivos à baixa temperatura (SAKUMA et al., 2002).

Os membros do subgrupo A-4 não mostram um padrão consistente de resposta aos estresses abióticos (KARABA et al., 2007). Entretanto, estão relacionados ao subgrupo A-1 (MIZOI et al., 2012), e podem desempenhar um papel na configuração das respostas aos estresses (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012). Os membros do subgrupo A-5, mostram-se repressores a outros genes *DREB.* (OHTA et al., 2001). Estes genes foram relatados como regulador positivo quando os membros dos subgrupos A-1 e A-2 apresentam um elevado nível transcricional (MARUYAMA et al., 2004; SAKUMA et al., 2006). Os membros do subgrupo A-6 também são sensíveis ao estresse, análises mostraram que em feijão o gene *PvDREB6A* também apresentou sensibilidade à seca, sal e frio (KONZEN et al., 2019). Portanto, eles funcionam na regulação dos estresses, mas parecem ter alvos diferentes dos subgrupos A-1 e A-2 (MIZOI et al., 2012).

O Rio Grande do Sul apresenta vastos ambientes de plantas nativas e exóticas. O estuário da Lagoa dos Patos é foco de muitos estudos regionais, o ambiente recebe altas descargas de água salina, é um local que propicia a formação de extensas pradarias de *Ruppia maritima* L. (CAFRUNI, 1983). Essa espécie ainda não possui seu genoma sequenciado e publicado, porém, uma reconstrução filogenética (Figura 6) exibe semelhança com a espécie *Cymodocea nodosa*, a espécie possui alta plasticidade fisiológica. Seu transcritoma foi montado em experimentos envolvendo três tratamentos de estresses e um grupo controle (MALANDRAKIS et al., 2019). A construção deste experimento ocorreu independente do genoma e a comparação com sequências homólogas reforçou a efetividade do experimento. Quando submetida ao estresse salino, *C. nodosa* apresentou uma regulação negativa de proteínas e enzimas estruturais. Diversos

genes integrantes da família ERF, incluindo os DREB mostraram aumento ou diminuição da expressão em relação a tratamento controle, quando expostas à alta salinidade. A expressão foi reprimida em relação ao controle para: 1º (-) *Serine decarboxylase 1*, 2° (-) *ERF109*, 3° (-) *ERF109*, 4º (-) *ERF024*, 5º (-) *ERF024*, 6º (-) *DREB1A*, 7º (-) *ERF109*, 8º(-) *ERF025*. A expressão foi ativada em relação ao controle para: 1º (+) *ERF060*, 2º (+) *ERF060*, 3º (+) *RAP2-4* (MALANDRAKIS et al., 2019). O entendimento da expressão destes genes em *Zostera marina* e *Cymodocea nodosa* mostra como é complexo prever as respostas aos estresses das plantas a vários estímulos simultâneos, ressaltando a dificuldade de entender o contexto de uma resposta ao estresse, o que envolve diferentes vias moleculares. A análise em questão é uma contribuição para pesquisas futuras na espécie *Ruppia maritima* encontrada no Litoral Norte do Rio Grande do Sul – Brasil, uma espécie filogeneticamente próxima, mas que ainda não apresenta informações genômica publicadas. Estudar a expressão de genes *DREB* já categorizados em outras espécies próximas pode auxiliar em estudos mais específicos com estes genes na espécie, visando entender também a sua adaptação aos ambientes salinos.

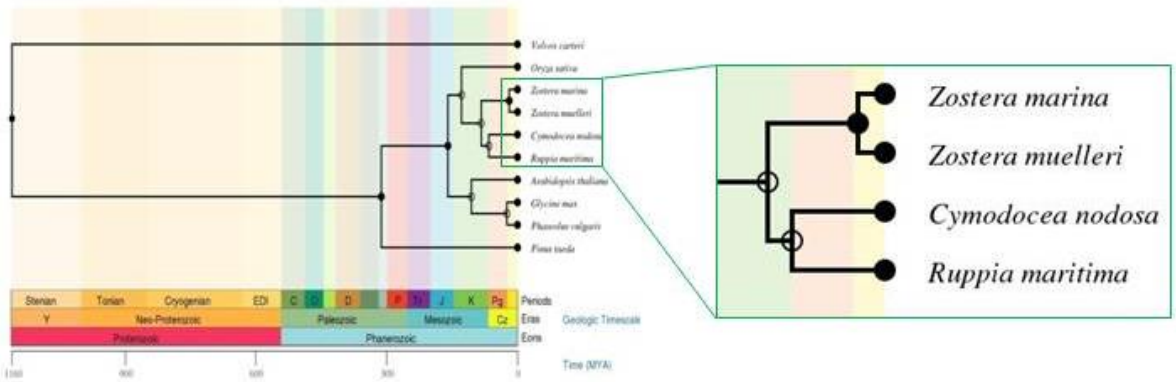


Figura 6: Filogenia de espécies próximas de *Z. marina*, construída usando o aplicativo TimeTree (http://www.timetree.org/).

5 CONCLUSÃO

A categorização da subfamília de genes *DREB* permitiu definir 31 genes em *Z. marina*, de acordo com múltiplas particularidades, ajustando-se a seis subgrupos principais (A-1 a A-6), por análise filogenética. Os níveis de expressão dos genes de cada subgrupo foram diferentes entre tecidos. Como os genes *DREB* estão essencialmente envolvidos com a regulação do estresse abiótico, o estudo contribui para melhorar as análises em limo-de-fita e pode servir de base para estudar outras espécies, como a nativa da costa brasileira *Ruppia maritima*, que ainda carece de informações genômica.

REFERÊNCIAS

ALONSO, J. M.; STEPANOVA, A. N.; LEISSE, T. J. Genome wideinsertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 301, p. 653–657, 2003.

BAILEY, T. L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **ProcIntl ConfIntellSyst Mol Biol**, v. 2, p. 28–36, 1994.

CAVALCANTI, N. M. S. Estudo in silício de genes que codificam fatores de transcrição responsivos à seca, salinidade e congelamento nos genomas do eucalipto, cana e arroz. Dissertação de Pós-graduação em Genética, **Universidade Federal de Pernambuco**. Recife- PE, 2007.

CHALCO, J. P. M. Ciência da Computação: **Identificação de regiões codificantes de proteína através da transformada modifificada de Morlet.,** São Paulo, 2005.

CHEN, H.; LIU, L.; WANG, L.; WANG, S.; CHENG, X. VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from Vignaradiata, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **J Plant Res**, v.129, p. 263-273, 2016.

COSTA, M. D. L.; REIS, P. A. B.; VALENTE, M. A. S.; IRSIGLER, A. S. T.; CARVALHO, C. M.; LOUREIRO, M. E.; ARAGÃO, F. J. L.; BOSTON, R. S.; FIETTO, L. G.; FONTES, E. P. B. A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. The Journal of Biological Chemistry, 283, 29, 20209-20219. 2008.

DIEDHIOU, C. J.; POPOVA, O. V.; DIETZ, K. J.; GOLLDACK, D. The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. BMC Plant Biol. 8, 49, 2008.

ELLIOTT, R. C.; BETZNER, A. S.; HUTTNER, E.; OAKES, M. P.; TUCKER, W. Q.; GERENTES, D.; PEREZ, P.; SMYTH, D. R. AINTEGUMENTA, an APETALA2- like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. **The PlantCell**, v. 8, p.155–168, 1996.

ESTEVES, B. S. E SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecol. Bras**., v. 4, p. 662-679, 2008.

GHEYI et al., Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade. Fortaleza – CE, 2010.

GROTEWOLD, E.; AUER, H. **The DNA proteome**: recent advances towards establishing the protein-DNA integration space. International Journal of Computer Bioscience, v. 1, p. 1-3; 2010.

GUTIÉRREZ, Ángela Hoces. Clonal growth in *Zostera marina* populations. Monografia Graduação. Universidade da Coruña, 21 f., 2016.

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98. 1999.

HIGGINS D., THOMPSON J., GIBSON T. THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJCLUSTAL W: aprimorando a sensibilidade do alinhamento progressivo de múltiplas sequências por meio de ponderação de sequência, penalidades de intervalo específico de posição e escolha da matriz de peso. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680. 1994.

HUBBARD, K. E.; NISHIMURA, N; HITOMI, K.; GETZOFF, E. D.; SCHROEDER, J. I. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newlydiscovered components and newly emerging questions. **Genes and Development**, 24, 1695–1708, 2010.

HURST, H.C. Leucine Zippers Transcription Factors. Academic Press, San Diego, USA, 1995.

ITO, T. M. et al. Fatores de transcrição da família AP2/ERF e reposta em plantas aos estresses abióticos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 207-214, jul./dez. 2012.

JAMES A. MARSH, JR., WILLIAM C. DENNISON, RANDALL S. ALBERTE, Effects of temperature on photosynthesis and respiration in eelgrass (*Zostera marina* L.). **J. Exp.Mar. Biol. Ecol.**, v.101, p. 257-267, 1986.

JOFUKU, K. D. et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. **The Plant Cell,** Rockville, v. 6, n. 9, p. 1211-1225, 1994.

KONZEN, E. R., RECCHIA, G. H., CASSIERI, F., CALDAS, D. G. G., BERNY MIER Y TERAN, J. C., GEPTS, P., & TSAI, S. M. (2019). DREB Genes from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Show Broad to Specific Abiotic Stress Responses and Distinct Levels of Nucleotide Diversity. **International Journal of Genomics**, 2019.

KONZEN, E. R.; RECCHIA, G. H.; CASSIERI, F; CALDAS, D. G. G.; BERNY, J. C.; PALKOVIC, A.; **GEPTS, P.**; **TSAI, S. M.** ***DREB*** **genes as candidates for improving drought tolerance in common bean.** In: Bean Improvement Cooperative Meeting - BIC, 2014, Portland. Annual Report of Bean Improvement Cooperative, v. 57. 2014.

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, AND TAMURA K MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547-1549; 2018.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, 14, 4731-4748, 2011.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 10, 1391–1406, 1998.

MALLIKARJUNA, L.; MALLIKARJUNA, K.; REDDY, M. K.; KAUL, T. Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnol Lett**., v. 33, p. 1689-1697, 2011.

MESHI, T. e IWABUCHI, M. Plant transcription factors. Plant Cell Physiol. 36 (8): 1405-1420, 1995.

MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1819, 86-96, 2012.

MURPHY, L. R.; KINSEY, S. T.; DURAKO, M. J.; Physiological effects of short-term salinity changes on *Ruppia maritima*. Aquat. Bot. 75, 293–309, 2003.

NAKANO, T. et al. Genome wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**, New York, v. 140, n. 2, p. 411-432, 2006.

NAM J, KIM J, LEE S, AN G, MA H, NEI M. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-anddeath evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. PNAS 101 (7), 1910-1915, 2004.

NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K. et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **The Plant Journal,** 34, 137–148, 2003.

NAWAZ, M.; IQBAL, N.; IDREES, S.; ULLAH, I. DREB1A from *Oryza sativa* var. IR6: homology modelling and molecular docking. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 1095-1102, 2014.

NIBAU, C., CHEUNG, A. Y. New insights into the functional roles of CrRLKs in the control of plant cell growth and development. Plant Signal. Behav. 6, 655–659, 2011.

OLSEN, J. L.; ROUZÉ, P.; VERHELST, B.; LIN, Y.; BAYER, T.; COLLEN, J.; DATTOLO, E.; PAOLI, E.; DITTAMI, S.; MAUMUS, F.; MICHEL, G.; KERSTING, A.; LAURITANO, C.; LOHAUS, R.; TÖPEL, M.; TONON, T.; VANNESTE, K.; AMIREBRAHIMI, M.; BRAKEL, J.; BOSTRÖM, C.; CHOVATIA, M.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; JUETERBOCK, A.; MRAZ, A.; STAM, W.; TICE, H.; BAUER, E.; GREEN,P.; PEARSON, G.; PROCACCINI, G.; DUARTE, C.; SCHMUTZ,J.; REUSCH3, T.; & PEER, Y. V. The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea, **NATURE**, v. 530, 2016.

PAK J.Y.; FUKUHARA T.; NITTA T. Discrete subcellular localization of membranebound ATPase activity in marine angiosperm and marine algae, p. 196-1522, 1995.

POSPI S.; ILOVA, J.; SYNKOVA H.; HAISEL, D.; BATKOVA, P. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during ex vitro transfer of micropropagated tobacco plantlets. **Biologia Plantarum** 53, 11–20, 2009.

QIN, Q.; LIU, J.; ZHANG, Z.; PENG, R.; XIONG, A.; YAO, J. Isolation, optimization, and functional analysis of the cDNA encoding transcription factor Os DREB1B in *Oryza Sativa* L. **Mol Breeding**, v. 19, p. 329-340, 2007.

RAE, L.; LAO, N.; KAVANAGH, T. Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis*by a pair of recently duplicated DREB transcription factors, **Planta**, doi: 10.1007/s00425-011-1414-z, 2011.

RIECHMANN, J. L. e RATCLIFFE, O. J. A genomic perspective on plant transcription factors. Curr. Opn. Plant Biol. 3 (5): 423-434, 2000.

ROCHA, D.C. e MARTINS, D. Levantamento de plantas daninhas aquáticas no

reservatório de alagados Viçosa-MG, v. 29, n. 2, p. 237-246, 2011.

RONTEIN, D.; NISHIDA, I.; TASHIRO, G.; YOSHIOKA, K.; WU, W.-I.; VOELKER, D. R.; BASSET, G.; HANSON, A. D., Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. J. Biol. Chem. 276, 35523–35529, 2001.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis DREBs*, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemicaland Biophysical Research Communications**, 290, 998–1009, 2002.

SCHOSSLER, T. R.; MACHADO, D. M.; ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; PIAUILINO, A. C. Salinidade: Efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Centro Científico Conhecer**, v. 8, p.1563, 2012.

SHARMA, M. K. et al. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. Molecular **Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 6, p. 455-475, 2010.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 217-223, 2000.

SILVEIRA et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade**. Fortaleza – CE 2010.

SUDHIR, P.; MURTHY, S. D. S. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. **Department of biochemistry**, v. 4, p. 481-486, 2004.

SUN, X. L.; YU, Q. Y.; TANG, L. L.; JI, W.; BAI, X.; CAI, H.; LIU, X. F.; DING, X. D.; ZHU, Y. M.; GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress v. 170, p. 505, 2013. J. Plant Physiol. 176, 218, 2015.

SUZUKI, N.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multi protein bridging factor 1c. Plant Physiol. 139, 1313–1322, 2005.

TIMOTHY L. BAILEY E CHARLES ELKAN, "Ajustando um modelo de mistura por maximização de expectativas para descobrir motivos em biopolímeros", *Anais da Segunda Conferência Internacional sobre Sistemas Inteligentes para Biologia Molecular*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, Califórnia, 1994.

TIMOTHY L. BAILEY e MICHAEL GRIBSKOY, Combining evidence using p-values: application to Sequence homology sarches, **bioinformatics**, v. 14, p. 48-54, 1998.

TSUTSUI, T. et al. *DEAR1*, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in *Arabidopsis*. **J. Plant Res.** 122, 633–643, 2009.

TYERMAN SD. Solute and water relationship of seagrasses. En: Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA, eds. **Biology of Seagrasses. Amsterdam**: Elsevier Science Publications, 1989.

VALVERDE, LOURDES RUBIO. Mecanismos de transporte de nitrato, amônio y fosfato y homeostasis citoplasmática de sódio en *Zostera marina* L. **Universidade de Málaga. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Vegetal**, Tese Doutorado, 23 f., 2004.

VERSLUES P. E.; ZHU, J. K. Before and beyond ABA, upstreamsensing and internal signals that determine ABA accumulation andresponse under abiotic stress. **Biochemical Society Transactions**, 33, 375–379, 2005.

WANG, W.; HABERER, G.; GUNDLACH, H.; GLASSER, C.; NUSSBAUMER, T.; LUO, M. C.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M.; KERSTETTER, R. A.; SHANKLIN, J.; BYRANT, D. W.; MOCKLER, T. C.; APPENROTH, K. J.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; CHOW, J.; CHOI, C.; ADAM, C.; CAO, X. H.; FUCHS, J.; SCHUBERT, I.; ROKHSAR, D.; SCHMUTZ, J.; MICHAEL, T. P.; MAYER, K. F. X.; MESSING, J. The Spirodela polyrhiza genome reveals insights into its neotenous reduction fast growth and aquatic lifestyle. Nat. Commun. 5, 2014.

WARREN, A. L. Eukaryotic transcription factors. Curr. Opn. In Struct. Biol., 107-114, 2002.

WILLADINO, K.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas a salinidades: Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, p. 2, 2010.

WILLIAM C. DENNISON; RANDALL S. ALBERT, Role of daily light period in the

depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). **Mar. Ecol. Prof. Ser**., v. 25, p. 51-61, 1985.

WINGENDER, E., CHEN, X, HEHL, R., KARAS, H., LIEBICH, I. &MATYS, V. TRANSFAC: na integrated system for gene expression regulation. Nucleic Acids Res., 28: 316-319 2000.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review in Plant Biology**, 57, 781-803, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., AND SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends Plant Sci.** 10, 88–94, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell, 6,251–264 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Molecular Genomics and Genetics**,236, 331–340, 1993.

YE, C. J.; ZHAO, K. F.; Osmotically active compounds and their localization in the *marine halophyte* e elgrass. Biol. Plant. 46, 137–140, 2003.

ZHAO, L.; HU, Y.; CHONG, K.; WANG, T. *ARAG1*, an ABA-responsive *DREB* gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. **Annals of Botany**, 105, 401-409, 2010.

ANEXO A – Sequências de *Zostera marina* e sua categorização segundo domínios proteicos e aminoácidos conservados ao longo do domínio AP2.

Sequência	AP2	B3	14º (V) Valina	19º (E)Ac.glut.	DREB	Outros Domínios
Zosma106g00240	1		1			
Zosma106g00250	1		1	1		
Zosma106g00650	1		1			
Zosma106g00760	1		1			
Zosma113g00080	1		1	1	1	
Zosma115g00200	2					
Zosma11g01280	1					
Zosma122g00040	2					
Zosma122g00260	1					
Zosma123g00340	1					
Zosma123g00770	2					
Zosma124g00230	1					
Zosma135g00520	1					
Zosma141g00210	1		1	1	1	
Zosma142g00200	2					
Zosma14g01480	1					
Zosma152g00050	2					
Zosma161g00060	1		1	1	1	
Zosma166g00650	2					
Zosma169g00300	2					
Zosma16g01200	1		1		1	
Zosma171g00170	1		1	1	1	
Zosma178g00270	1		1	1	1	
Zosma178g00500	1	1				
Zosma17g00600	1		1		1	
Zosma189g00120	1					
Zosma193g00210	1		1		1	
Zosma196g00250	1					
Zosma19g00210	1		1	1	1	
Zosma1g00310	1		1	1	1	
Zosma200g00090	1					
Zosma209g00070	1					
Zosma20g00630	1					
Zosma214g00080	2					
Zosma214g00470	1	1				
Zosma21g00860	1		1	1	1	
Zosma223g00250	1					
Zosma223g00500	1					
Zosma224g00220	1					X
Zosma22g01270	1					
Zosma22g01290	1					
Zosma230g00110	2					
Zosma234g00080	1		1		1	
Zosma237g00270	1		1	1	1	
Zosma248g00430	2					

Zosma258g00290						XX
Zosma25g00300	2					
Zosma25g00360	1		1		1	
Zosma25g01260	1		1		1	
Zosma264g00060	1					
Zosma26g00750	1		1	1	1	
Zosma288g00100	1					
Zosma28g00430	1					
Zosma28g00820	1					
Zosma291g00180	1					
Zosma29g00640						XX
Zosma2g02420						XXX
Zosma2g03160	1		1		1	
Zosma304g00070	1					
Zosma310g00160	1					
Zosma312g00060	2					
Zosma317g00200	1		1	1	1	
Zosma318g00100	2					
Zosma31g01410	1		1	1	1	
Zosma320g00050						XXXX
Zosma330g00050	1		1		1	
Zosma34g00530	1					
Zosma37g00200	1		1	1	1	
Zosma391g00090	1					
Zosma41g00590	1					
Zosma41g01140	1					
Zosma42g00960	1					
Zosma42g00970	1					
Zosma43g00930	1					
Zosma43g00940	1					
Zosma440g00140	1		1	1	1	
Zosma452g00110	1					
Zosma48g00040	1	1				
Zosma49g01020						X
Zosma4g00290	1					
Zosma50g00130	1					
Zosma51g00060	1		1	1	1	
Zosma52g00410	1		1	1	1	
Zosma54g00490	1					
Zosma56g01090	1					X
Zosma5g02140	1		1	1	1	
Zosma61g00240	1					
Zosma63g00340	1					
Zosma65g00020	1					
Zosma68g00670	1					
Zosma70g00410	1					
Zosma74g00070	2					
Zosma778g00030	1		1	1	1	
Zosma79g00140	1					
Zosma79g00170	1					

Zosma7g00790						X
Zosma81g00360						X
Zosma81g00520	1		1	1	1	
Zosma81g00960	1					
Zosma82g00860	1					
Zosma83g00060	1			1		
Zosma83g00080	1		1	1	1	
Zosma83g00090	1		1	1	1	
Zosma87g00240	2					
Zosma89g01190	1					X
Zosma8g01520						X
Zosma98g00510	1		1	1	1	
Zosma99g00770	1					X
Zosma9g00810	1		1		1	