

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular**

Identificação de fatores reguladores da expressão de genes  
*ASR (ABA, Stress and Ripening)* de arroz (*Oryza sativa*)

**Mariana Schünemann**

**Orientadora:** Profa. Dra. Márcia Pinheiro Margis

**Co-orientador:** Dr. Rafael Augusto Arenhart

**Porto Alegre**

**Março de 2015**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular**

Identificação de fatores reguladores da expressão de genes  
*ASR (ABA, Stress and Ripening)* de arroz (*Oryza sativa*)

**Mariana Schünemann**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientadora:** Profa. Dra. Márcia Pinheiro Margis

**Co-orientador:** Dr. Rafael Augusto Arenhart

**Porto Alegre**

**Março de 2015**

## **Instituição e fonte financiadora**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS.

As agências de financiamento deste trabalho foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Luiz e Angela, e à minha irmã, Paula, por todo o amor, apoio e incentivo durante toda a minha vida.

À minha orientadora, Márcia, e ao meu co-orientador, Rafael, por toda a ajuda, atenção, dedicação, paciência e por todos os conselhos e ensinamentos.

Às minhas colegas, Leila e Ana Paula, por todo o auxílio e todas as sugestões para a realização do ensaio de mono-híbrido.

A todas as pessoas do grupo de pesquisa da Márcia: Rafael, Ana Paula, Leila, Gisele, Ronei, Rauber, Lauro, Fernanda, Graciela, Douglas e Andréia.

Ao pessoal do laboratório de Genética Vegetal, pelas conversas, discussões, recomendações e por tornarem o trabalho mais divertido e animado.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação, Elmo, por sempre estar disposto a ajudar.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público e de qualidade e pela oportunidade de realizar pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de qualquer forma para a minha formação e para a realização deste trabalho.

## Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. Arroz como modelo vegetal .....	15
1.2. Alumínio.....	16
1.3. Genes <i>ASR</i> ( <i>ABA</i> , <i>Stress and Ripening</i> ).....	18
1.4. Estudo de promotores .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Obtenção de vetores de transformação de protoplastos .....	24
3.2. Obtenção de vetores de transformação para mono-híbrido .....	24
3.3. Transformação de protoplastos de arroz.....	26
3.4. Transformação de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
3.5. Ensaio de atividade de GUS.....	27
3.6. Análise estatística .....	28
3.7. Mono-híbrido .....	28
3.8. Sequenciamento de cDNAs.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
4.1. Clonagem de fragmentos da região promotora .....	30
4.2. Atividade de GUS em protoplastos de arroz tratados com Al .....	36
4.3. Ensaio de transativação em protoplastos de <i>A. thaliana</i> .....	42
4.4. Mono-híbrido .....	45
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>56</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>
ANEXO I – Sequências de oligonucleotídeos utilizados .....	72
ANEXO II – Mapas de vetores utilizados .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

4-MUG – 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicuronídeo

aa – aminoácido(s)

ABA – ácido abscísico

AD – domínio de ativação, do inglês, *Activation Domain*

Al – alumínio

ASR – *Abscisic acid, Stress and Ripening*

ATP – adenosina trifosfato

bHLH – *basic Helix-Loop-Helix*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

BTF3 – *Basal Transcription Factor 3*

bZIP – *Basic Leucine Zipper*

°C – grau(s) Celsius

CaMV – *Cauliflower Mosaic Virus*

CAT – cloranfenicol acetiltransferase

CCLR – *Cell Culture Lysis Reagent*

cDNA – DNA complementar

CDS – *Coding DNA Sequence*

ChIP – *Chromatin Immunoprecipitation*

ci21A – *cold-induced 21A*

cv – cultivar

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMSA – *Electrophoretic Mobility-Shift Assay*

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ESTs – *Expressed Sequence Tags*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FT – fator de transcrição

GCN4 – *General Control Nondepressible 4*

GFP – *Green Fluorescent Protein*

GO – *Gene Ontology*

GUS –  $\beta$ -D-glicuronidase  
h – hora(s)  
His – aminoácido histidina  
HIS3 – gene de biossíntese da histidina  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo  
LacZ – gene da  $\beta$ -galactosidase  
LB – meio *Lysogeny Broth* (meio de cultura universal para o cultivo de *Escherichia coli*)  
Leu – aminoácido leucina  
Luc – luciferase  
M – molar  
mg – miligrama(s)  
min – minuto(s)  
mL – mililitro(s)  
mM - milimolar  
mRNA – RNA mensageiro  
MS – meio de Murashige e Skoog (meio de cultura universal para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais)  
MU – metilumbeliferona  
NAC – *Nascent polypeptide-Associated Complex*  
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*  
ng – nanograma(s)  
NLS – *Nuclear localization Signal*  
nm – nanometro(s)  
ORF – *Open Reading Frame*  
Os – *Oryza sativa*, arroz  
OsASR – *Abscisic acid, Stress and Ripening* de *Oryza sativa*  
OSH1 – *Oryza sativa Homeobox 1*  
pb – par(es) de base  
PCR – *Polymerase Chain Reaction*  
PEG – polietilenoglicol

Pfam – *Protein Family*  
pH – potencial hidrogeniônico  
RNA – ácido ribonucléico  
RNAi – RNA de interferência  
rpm – rotação(ões) por minuto  
RT-qPCR – *Reverse Transcription - Quantitative (or real-time) Polymerase Chain Reaction*  
SD – *Synthetic Dropout*  
SMART – *Simple Modular Architecture Research Tool*  
Solyc – *Solanum lycopersicum*, tomate  
STAR1 – *Sensitive to AI Rhizotoxicity 1*  
TAFs – *Tightly Associated Factors*  
TFIID – *Transcription Factor of RNA Polymerase II D*  
Trp – aminoácido triptofano  
UTR – *Untranslated Region*  
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo  
WD – triptofano-aspartato  
WDS – *Water Deficit Stress*  
 $\beta$  – letra grega beta  
 $\mu$ L – microlitro(s)  
 $\mu$ M – micromolar



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Região promotora dos genes *OsASR1* e *OsASR5*. Números acima da linha tracejada = posições de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados na clonagem dos fragmentos; Números em negrito = posições de *cis*-elementos GCCCA; **GCCCA** = sequência de ligação do fator de transcrição ASR5.....25

**Figura 2.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR1* no vetor de entrada pGEM-T-Easy. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **1** = pGEMproAsr1\_500pb; **2** = pGEMproAsr1\_1000pb; **3** = pGEMproAsr1\_1500pb; **4** = pGEMproAsr1\_2000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações; **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig).....31

**Figura 3.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR1* no vetor de destino pGusXX. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **1** = pGusXXproAsr1\_1000pb; **2** = pGusXXproAsr1\_500pb; **3** = pGusXXproAsr1\_1500pb; **4** = pGusXXproAsr1\_2000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações; Canaletas **1+**, **2+**, **3+** e **4+** = controles positivos (em pGEM) das respectivas reações; **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **M1** = marcador de 1 kb (Ladder 1 kb da Ludwig).....32

**Figura 4.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR5* no vetor de destino pGusXX. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **1** = pGusXXproAsr5\_500pb; **2** = pGusXXproAsr5\_1500pb; **3** = pGusXXproAsr5\_2000pb; **4** = pGusXXproAsr5\_1000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações.....33

**Figura 5.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR5* no vetor de destino pHIS2.1. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **1** = pHIS2.1proAsr5\_1-500pb; **2** = pHIS2.1proAsr5\_500-1000pb; **3** =

pHIS2.1proAsr5\_1000-1500pb; **4** = pHIS2.1proAsr5\_1500-2000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações.....35

**Figura 6.** Teste de viabilidade de protoplastos de arroz após diferentes tempos de tratamento com  $AlCl_3$  a 100  $\mu M$ . Após 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h e 4h de tratamento com  $AlCl_3$ , protoplastos de arroz foram observados em microscópio óptico. Fotos tiradas em aumento na lente objetiva de 40X.....37

**Figura 7.** Ensaio de expressão transiente do gene *GUS* regulada pelos fragmentos do promotor de *OsASR1* em protoplastos de arroz. A atividade enzimática de GUS (mM de MU/min) foi determinada pelo método quantitativo de 4-MUG e normalizada em relação à atividade da Luciferase. Colunas azuis representam o controle e colunas vermelhas representam o tratamento com  $AlCl_3$  a 100  $\mu M$ . Barras verticais pretas representam desvio padrão entre replicatas técnicas. Asteriscos (\*) representam diferença estatisticamente significativa por teste *t* de *Student* em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Correlação de Pearson (*r*) calculada para grupos controle e tratado com Al. Esse ensaio foi repetido quatro vezes sendo mostrado um experimento representativo dos resultados. **pGusXX** = vetor pGusXX vazio; **pGusSH** = controle positivo, *GUS* fusionado ao promotor CaMV35S.....38

**Figura 8.** Ensaio de expressão transiente do gene *GUS* regulada pelos fragmentos do promotor de *OsASR5* em protoplastos de arroz. A atividade enzimática de GUS (mM de MU/min) foi determinada pelo método quantitativo de 4-MUG e normalizada em relação à atividade da Luciferase. Colunas azuis representam o controle e colunas vermelhas representam o tratamento com  $AlCl_3$  a 100  $\mu M$ . Barras verticais pretas representam desvio padrão entre replicatas técnicas. Asteriscos (\*) representam diferença estatisticamente significativa por teste *t* de *Student* em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Correlação de Pearson (*r*) calculada para grupos controle (todos os fragmentos) e tratado com Al (sem o fragmento de 2000 pb). Esse ensaio foi repetido quatro vezes sendo mostrado um experimento representativo dos resultados. **pGusXX** = vetor pGusXX vazio;

**pGusSH** = controle positivo, *GUS* fusionado ao promotor CaMV35S.....40

**Figura 9.** Ensaio de transativação em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. A atividade enzimática de *GUS* (mM de MU/min) foi determinada pelo método quantitativo de 4-MUG e normalizada em relação à atividade da Luciferase. Barras verticais pretas representam desvio padrão entre replicatas técnicas. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa por ANOVA de uma via ( $p < 0,01$ ). Esse ensaio foi repetido duas vezes sendo mostrado um experimento representativo dos resultados. **pGusXX** = vetor pGusXX vazio; **pGusXXproAsr1\_500** = fragmento de 500 pb do promotor de *OsASR1* fusionado ao gene *GUS*; **pGusXXproAsr5\_1000** = fragmento de 1000 pb do promotor de *OsASR5* fusionado ao gene *GUS*; **ASR1** = gene *OsASR1* fusionado ao promotor CaMV35S para superexpressão da proteína ASR1; **ASR5** = gene *OsASR5* fusionado ao promotor CaMV35S para superexpressão da proteína ASR5.....43

**Figura 10.** Teste de auto-ativação da transcrição do gene repórter com consequente biossíntese de histidina na levedura Y187. Quatro colônias de cada transformação foram crescidas em meio seletivo SD – TH (sem triptofano e histidina) com 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) em concentrações crescentes (0 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM). Fotos tiradas após 7 dias de incubação a 28 °C.....46

**Figura 11.** Teste da intensidade de interação dos clones His-positivos com o promotor de *OsASR5*. (1 – 8) Clones crescidos em meio seletivo SD – LTH (sem leucina, triptofano e histidina) com concentrações crescentes de 3-AT (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM e 50 mM). **C-** = controle negativo não transformado com a biblioteca. Fotos tiradas após 3 dias de incubação a 28 °C.....48

**Figura 12.** Confirmação da presença de plasmídeo da biblioteca de cDNA nos clones His-positivos da levedura Y187. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, utilizando os oligonucleotídeos 5'AD/3'AD. **C-** = controle negativo da reação; **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig);

**1** = clone 1; **2** = clone 2; **3** = clone 3; **4** = clones 4A (banda de 1000 pb) e 4B (banda de 500 pb); **5** = clone 5; **6** = clone 6; **7** = clone 7; **8** = clone 8.....49

**Tabela 1.** Clones da biblioteca de cDNA identificados por sequenciamento.....51

## RESUMO

Os estresses abióticos impostos à planta no campo, tais como o estresse salino, toxidez por alumínio, frio, seca, entre outros, afetam seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Dentre as gramíneas cultivadas, o arroz (*Oryza sativa*) é uma das culturas de maior importância no Brasil, cuja oscilação na produção acarreta prejuízos consideráveis à economia brasileira. Dessa forma, o estudo das interações entre os estresses abióticos e as respostas dos vegetais frente a esses estímulos ambientais é fundamental para um conhecimento detalhado desses mecanismos. O arroz é um dos cereais mais tolerantes ao alumínio (Al), sendo um ótimo modelo para o estudo de mecanismos de tolerância. Neste trabalho, foi estudado o papel das proteínas ASR na tolerância ao Al. A expressão dos genes *ASR* (*ABA, Stress and Ripening*) é induzida por ABA, estresses e amadurecimento do fruto. Essas proteínas foram caracterizadas como chaperonas e fatores de transcrição. Os genes da família *OsASR* também têm o nível de transcritos aumentado em resposta ao Al, sendo *OsASR1* e *OsASR5* os genes com expressão mais abundante em arroz. No entanto, as regiões promotoras responsivas ao Al e os fatores de transcrição reguladores da expressão desses genes ainda não foram descritos. Assim, este trabalho tem como objetivo geral a identificação dos fatores que regulam a transcrição dos genes *OsASR1* e *OsASR5*. Para tanto, construções contendo fragmentos dos promotores desses genes dirigindo a expressão do gene repórter *GUS* foram obtidas, visando ensaio de expressão transiente em protoplastos de arroz submetidos ao tratamento com Al. Os fragmentos das regiões promotoras de ambos os genes *OsASR1* e *OsASR5* foram todos responsivos ao Al. Também foi realizado ensaio de transativação em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* para verificar a existência de auto-regulação nesses genes. Tanto *ASR1* quanto *ASR5* foram capazes de transativar seus próprios promotores. Além disso, foi realizada uma triagem de biblioteca de cDNAs por mono-híbrido em levedura com fragmento da região promotora de *OsASR5*. Com essa abordagem, foram identificados sete genes candidatos a codificadores de fatores capazes de interação DNA-proteína.

**Palavras-chave:** ASR, arroz, alumínio, transativação, mono-híbrido

## ABSTRACT

The abiotic stress that plants in the field are subjected to, such as salt, aluminum, cold, drought, among others, affect their growth, development and productivity. Among cultivated grasses, rice (*Oryza sativa*) is one of the most important crops in Brazil, whose oscillation in production causes considerable costs to the Brazilian economy. Thus, the study of interactions between abiotic stresses and plant responses to these environmental stimuli is essential to a detailed knowledge of these mechanisms. Rice is one of the most Al-tolerant crops, being a great model for studying Al-tolerance mechanisms. In this work, the role of ASR proteins in Al tolerance was studied. The expression of ASR (ABA, Stress and Ripening) genes is induced by ABA, stresses and fruit ripening. These proteins were characterized as chaperones and transcription factors. The *OsASR* genes also have increased transcript accumulation in response to Al, and *OsASR1* and *OsASR5* have the most abundant expression in rice. However, the Al-responsive promoter regions and the transcription factors that regulate these genes have not yet been described. Therefore, the goal of this work is to identify regulating factors of *OsASR1* and *OsASR5* gene transcription. For this, vectors containing promoter fragments of these genes driving the expression of the *GUS* gene were constructed and transient expression assays were performed in rice protoplasts subjected to Al treatment. All of the promoter fragments were Al-responsive for both *OsASR1* and *OsASR5* genes. Transactivation assays in *Arabidopsis thaliana* protoplasts were also conducted in order to verify the existence of auto-regulation in these genes. Both ASR1 and ASR5 were able to transactivate its own promoters. Furthermore, a library screening was performed by yeast one-hybrid using a promoter fragment from *OsASR5*. With this approach, seven candidate genes encoding transcription factors capable of DNA-protein interactions were identified.

**Keywords:** ASR, rice, aluminum, transactivation, yeast one-hybrid

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Arroz como modelo vegetal

O arroz (*Oryza sativa*) é considerado a planta modelo de estudo para as monocotiledôneas, possuindo um genoma pequeno de 390 Mb (*Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare), o menor entre os cereais (*Rice Genome Annotation Project*, 2007). Dentre as várias características que fazem do arroz um modelo para estudos fisiológicos, genéticos e evolutivos (Shimamoto & Kyojuka 2002), incluem-se seu genoma totalmente sequenciado, que possui sintonia com o genoma de outros cereais como milho e trigo (Moore *et al.* 1995), a disponibilidade de fragmentos de genes expressos ou ESTs (*Expressed Sequence Tags*), de mapas moleculares saturados (*International Rice Genome Sequencing Project*, 2005) e de protocolos bem estabelecidos para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Upadhyaya *et al.* 2000). A metodologia de transformação de protoplastos de arroz também é amplamente utilizada (Tao *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006), possibilitando uma análise mais rápida sem necessitar do processo de regeneração de plantas transgênicas.

Dentre os cereais cultivados, o arroz é uma das culturas de maior importância mundial, destacando-se pela produção e área de cultivo. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no planeta, atingindo uma produção de mais de 700 milhões de toneladas, sendo o Brasil o nono maior produtor mundial (FAO 2012). O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico, sendo produto no comércio internacional de muitos países latino-americanos, tanto em importações quanto exportações. É considerado o cultivo alimentar de maior relevância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e na Oceania. Esse cereal é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária à dieta humana (EMBRAPA 2005).

No Brasil, a safra nacional de arroz em 2014 chegou a 12,2 milhões de toneladas. Esta produção supera em 3,3% a obtida em 2013 (11.758.663 t) e as estimativas do IBGE para a safra de 2015 são ainda maiores (12,5 milhões de

toneladas). O Rio Grande do Sul, maior produtor de arroz do país, foi responsável por 67,8% desta produção em 2014 (IBGE 2014). Entretanto, a produção mundial do grão não vem acompanhando o crescimento do consumo. Tem-se observado que, enquanto a produção aumenta cerca de 1,09% ao ano, a população cresce 1,32% e o consumo aumenta 1,27% (EMBRAPA 2012). Além disso, a degradação ambiental e a redução de áreas aráveis e de água para a plantação vêm prejudicando a produção do cereal (Peng *et al.* 2004). Os estresses abióticos (como por exemplo, seca, salinidade, alta intensidade luminosa, estresse hídrico, toxidez por alumínio) têm efeito negativo na produção agrícola, reduzindo a produtividade da colheita de grãos em até 50% (Boyer 1982; Bray *et al.* 2000; Mahajan & Tuteja 2006), o que acarreta prejuízos consideráveis à economia brasileira.

Considerando a importância social e econômica do arroz no mundo e os efeitos extremamente danosos dos estresses ambientais sobre a agricultura, os estudos visando um melhor entendimento dos mecanismos de tolerância a esses estresses são essenciais. Nesse contexto, o estudo funcional de genes envolvidos em respostas vegetais a esses estresses é um ponto estratégico para o desenvolvimento de culturas mais adaptadas ao meio ambiente.

## 1.2. Alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre, constituindo aproximadamente 7% do solo (Wolt 1994). Sua solubilidade aumenta em solos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ), resultando na mobilização do íon trivalente  $\text{Al}^{3+}$ , que é tóxico mesmo em baixas concentrações para todas as células vivas (Crapper *et al.* 1973; Driscoll 1985; Yokel 2000). Embora o mecanismo exato de toxidez por  $\text{Al}^{3+}$  ainda não seja bem conhecido e pode variar em diferentes espécies vegetais, esse metal parece atuar em diversos sítios celulares (Kochian *et al.* 2005; Ma 2007; Poschenrieder *et al.* 2008), resultando em danos funcionais e estruturais. O Al reduz a extensibilidade da parede celular de raízes de trigo (*Triticum aestivum*, Ma *et al.* 2004), bloqueia canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*, Kawano *et al.* 2004) e células da raiz em trigo (Huang *et al.* 1992), além de causar peroxidação em lipídeos de membrana (Cakmak &



Horst 1991; Wagatsuma *et al.* 1995; Yamamoto *et al.* 2001). O íon  $\text{Al}^{3+}$  também afeta rotas de sinalização (como a via inositol-trifosfato), interferindo na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , na integridade da bicamada lipídica e em componentes do citoesqueleto (Jones & Kochian 1997; Blancaflor *et al.* 1998). Além disso, o  $\text{Al}^{3+}$  bloqueia o transporte simplástico, induzindo deposição de calose em plasmodesmas em raízes de trigo (Sivaguru *et al.* 2000) e em células de tabaco (Sivaguru *et al.* 2005). Esse metal também afeta funções mitocondriais, provocando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em raízes de ervilha (*Pisum sativum*, Yamamoto *et al.* 2002), de milho (*Zea mays*, Jones *et al.* 2006), em células de tabaco (Yamamoto *et al.* 2002) e em batata (*Solanum tuberosum*, Tabaldi *et al.* 2009).

Todos esses distúrbios prejudicam o crescimento da raiz e, conseqüentemente, a absorção de água e nutrientes (Barceló & Poschenrieder 2002; Famoso *et al.* 2010), afetando o desenvolvimento vegetal e aumentando a sensibilidade da planta a estresses como a seca. O Al é, portanto, considerado um importante fator limitante da produção agrícola em solos ácidos, que constituem cerca de 50% das terras cultiváveis no mundo (Fageria *et al.* 1988; von Uexkull & Mutert 1995). A acidificação do solo também é progressivamente aumentada devido ao uso de fertilizantes ou chuva ácida causada pela poluição atmosférica (van Breemen 1985; Smith 1990), agravando ainda mais o problema.

Para sobreviver em ambientes ácidos com alta toxicidade por  $\text{Al}^{3+}$ , as plantas desenvolveram estratégias tanto externas quanto internas para desintoxicar esse metal (Ma 2007; Kochian *et al.* 2015). Os mecanismos externos de desintoxicação consistem na exclusão do  $\text{Al}^{3+}$  por secreção de ácidos orgânicos (citrato, malato e oxalato) ou outros ligantes (fosfato inorgânico e compostos fenólicos) que formam complexos com o  $\text{Al}^{3+}$  e impedem sua entrada nas células da raiz, ou ainda por mudança no pH da rizosfera (Kidd *et al.* 2001; Hoekenga *et al.* 2003; Piñeros *et al.* 2005; Magalhaes *et al.* 2007) que altera a concentração da forma tóxica  $\text{Al}^{3+}$ . Já os mecanismos internos incluem quelação de  $\text{Al}^{3+}$  com ácidos orgânicos e ligantes fenólicos (Nagata *et al.* 1992; Morita *et al.* 2004; Morita *et al.* 2008; Tahara *et al.* 2014), sequestro de Al para dentro do vacúolo através de transportadores (Larsen *et al.* 2005; Huang *et al.* 2009; Xia *et*

al. 2010; Xia *et al.* 2014), eliminação de espécies reativas de oxigênio (Basu *et al.* 2001), modificações na composição lipídica da membrana plasmática (Ryan *et al.* 2007; Khan *et al.* 2009) e na composição da parede celular (Eticha *et al.* 2005; Yang *et al.* 2008; Yang *et al.* 2011).

Para se pesquisar os mecanismos de tolerância ao Al, culturas de cereais tornam-se excelentes modelos de estudo, sendo o arroz considerado uma das espécies mais tolerantes entre os cereais (Foy 1988; Famoso *et al.* 2010; Famoso *et al.* 2011). No entanto, nessa espécie também se encontra a maior complexidade de mecanismos fisiológicos e genes responsáveis pela tolerância ao Al (Ma *et al.* 2002; Nguyen *et al.* 2003; Kochian *et al.* 2015), não se sabendo exatamente como todos eles atuam e interagem. A identificação e a caracterização de genes e proteínas envolvidas em mecanismos de tolerância a Al podem fornecer informações moleculares para o desenvolvimento de cultivares com melhor adaptabilidade a solos ácidos (Kochian *et al.* 2015).

### **1.3. Genes *ASR* (*ABA*, *Stress and Ripening*)**

Os genes *ASR* são encontrados em diversas espécies vegetais. O primeiro gene *ASR* identificado e clonado foi em tomate (*Lycopersicon esculentum*, lusem *et al.* 1993). Desde então, foram descritos mais de trinta genes *ASR* em outras plantas como batata (*Solanum tuberosum*, van Berkel *et al.* 1994), pomelo (*Citrus maxima*, Canel *et al.* 1995), pinheiro (*Pinus taeda*, Chang *et al.* 1996), milho (*Zea mays*, Riccardi *et al.* 1998), lírio (*Lilium longiflorum*, Wang *et al.* 1998), arroz (*Oryza sativa*, Vaidyanathan *et al.* 1999), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, Sugiharto *et al.* 2002), melão (*Cucumis melo*, Hong *et al.* 2002), uva (*Vitis vinifera*, Cakir *et al.* 2003), *Gingko biloba* (Shen *et al.* 2005), petúnia (Bai *et al.* 2010), banana (*Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, Henry *et al.* 2011), entre outras. No entanto, não foram encontrados genes *ASR* na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Frankel *et al.* 2006). Em arroz, existem 6 cópias do gene (*OsASR1* – *OsASR6*), distribuídas em diferentes cromossomos, constituindo uma família gênica, cuja nomenclatura não está bem definida e varia em diferentes estudos (Frankel *et al.* 2006; Philippe *et al.* 2010; Joo *et al.* 2013), sendo *OsASR1* e

OsASR5 os genes com expressão mais abundante dentre toda a família (Arenhart *et al.* 2013; Joo *et al.* 2013).

A expressão dos genes *ASR* é induzida por ácido abscísico (Amitai-Zeigerson *et al.* 1995; Vaidyanathan *et al.* 1999; Finkelstein & Gibson 2001; Joo *et al.* 2013), durante o amadurecimento de frutos (Maskin *et al.* 2001; Hong *et al.* 2002; Cakir *et al.* 2003; Dóczy *et al.* 2005) e por diversos estresses abióticos, por isso a denominação *ASR* (do inglês, *Abscisic acid, Stress and Ripening*). Entre esses estresses abióticos incluem-se salinidade, seca, frio, lesão mecânica e toxidez por Al (van Berkel *et al.* 1994; Amitai-Zeigerson *et al.* 1995; Silhavy *et al.* 1995; Padmanabhan *et al.* 1997; Riccardi *et al.* 1998; Vaidyanathan *et al.* 1999; Kawasaki *et al.* 2001; Sugiharto *et al.* 2002; Wang *et al.* 2003a; Henry *et al.* 2011; Arenhart *et al.* 2013). Entretanto, seus padrões de expressão variam entre diferentes órgãos e tecidos e diferentes fases de desenvolvimento (Padmanabhan *et al.* 1997; Maskin *et al.* 2008; Joo *et al.* 2013).

Yang e colaboradores (2007) verificaram que a proteína ASR5 aumentou sua expressão em resposta ao alumínio (Al) em raízes de arroz. Em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (Arenhart *et al.* 2013), utilizando RT-qPCR (PCR quantitativa), foi relatado um aumento nos níveis de transcritos dos genes *ASR* em raízes de arroz em resposta ao Al. Além disso, a indução na expressão ocorreu em cultivar de arroz considerada tolerante ao Al (cv Nipponbare), mas não em cultivar sensível ao Al (cv Taim), sugerindo um papel dos genes *ASR* no mecanismo de resistência ao Al. Estes resultados demonstram que apesar do arroz ser um dos cereais mais tolerantes ao Al (Foy 1988; Famoso *et al.* 2010), existe variabilidade genotípica entre suas cultivares.

A superexpressão de genes *ASR* em plantas transgênicas tem demonstrado potencial para aumentar a tolerância de plantas aos estresses abióticos. O gene *ASR1* de tomate (*Lycopersicon esculentum*) superexpresso em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), aumentou a tolerância a NaCl (Kalifa *et al.* 2004a). Do mesmo modo, o gene *ASR1* de trigo (*Triticum aestivum*) superexpresso em tabaco (Hu *et al.* 2013), e o gene *ASR* de banana (*Musa acuminata*) superexpresso em *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.* 2014), conferiram maior tolerância à seca nessas espécies. A superexpressão do gene

ASR de lírio (*LLA23*) em *A. thaliana* também aumentou a tolerância da planta à seca e à salinidade (Yang *et al.* 2005), ao frio e ao congelamento (Hsu *et al.* 2011), enquanto a superexpressão de ASR de *Musa paradisiaca* aumentou a tolerância de *A. thaliana* ao estresse osmótico (Dai *et al.* 2011). Em plantas de arroz, quando os genes *OsASR1* e *OsASR5* foram superexpressos, a tolerância à seca e ao frio também foram aumentadas (Joo *et al.* 2013). Além disso, o silenciamento por RNAi de genes ASR em arroz provocou um aumento da sensibilidade da planta à seca e ao Al (Arenhart *et al.* 2013).

As proteínas ASR são pequenas (menos de 300 aa), hidrofílicas, estáveis ao calor e intrinsecamente não estruturadas (Silhavy *et al.* 1995; Frankel *et al.* 2006; Goldgur *et al.* 2007). Devido a essas características elas poderiam atuar como osmoprotetores, retendo água dentro da célula. Algumas proteínas ASR também possuem atividade similar às chaperonas (Konrad & Bar-Zvi 2008; Kim *et al.* 2012) e de eliminação de espécies reativas de oxigênio (Kim *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013), tendo, portanto, funções diversificadas e ainda não totalmente estabelecidas.

Segundo diversos autores, essas proteínas possuem dois domínios conservados: um na região N-terminal, que é rico em resíduos de histidina e contém uma sequência de ligação ao DNA dependente de  $Zn^{+2}$ , e um na porção C-terminal, que contém um NLS (*Nuclear Localization Signal*) e forma o domínio WDS (*Water Deficit Stress*), característico da família ASR (Cakir *et al.* 2003; Kalifa *et al.* 2004b; Yang *et al.* 2005). Em diversas espécies vegetais, as proteínas ASR são localizadas no núcleo onde podem se ligar a sequências de DNA (de forma dependente de  $Zn^{2+}$ ) e regulam promotores específicos (Wang *et al.* 2003b; Kalifa *et al.* 2004b; Wang *et al.* 2005, Yang *et al.* 2005, Rom *et al.* 2006; Ricardi *et al.*, 2012), possuindo atividade de fator de transcrição (Cakir *et al.* 2003; Frankel *et al.* 2007; Saumonneau *et al.* 2008; Arenhart *et al.* 2014).

Recentemente, foi identificado o motivo de ligação ao DNA de *OsASR5* em arroz (Arenhart *et al.* 2014), e de *SolycASR1* em tomate (Ricardi *et al.* 2014) utilizando a mesma metodologia (ChIP-seq). Essa sequência consenso (GCCCA) é encontrada na região promotora de diversos genes envolvidos com a tolerância ao Al e adaptações ao estresse em arroz (Arenhart *et al.* 2014), incluindo os

promotores dos genes *OsASR1* e *OsASR5*, não estando claro, porém, se esses genes podem ou não sofrer uma auto-regulação.

#### 1.4. Estudo de promotores

O estudo de regiões promotoras tem grande importância na biotecnologia agrícola. O uso de promotores (tanto constitutivos quanto induzíveis) para direcionar a expressão de genes em plantas transgênicas pode auxiliar no melhoramento da tolerância a estresses e, conseqüentemente, da produtividade da cultura.

Análises *in silico* permitiram a identificação de diversos *cis*-elementos responsivos a estresses, hormônios, açúcares, entre outros. Entretanto, elementos responsivos a metais foram pouco caracterizados (Qi *et al.* 2007; Dong *et al.* 2010).

Outra estratégia de estudo de regiões promotoras consiste nas análises de expressão de genes repórteres como *GFP* (*Green Fluorescent Protein*, Sheen *et al.* 1995), *Luc* (luciferase, Ow *et al.* 1986), *GUS* ( $\beta$ -glicuronidase, Jefferson *et al.* 1987), *LacZ* ( $\beta$ -galactosidase, Teeri *et al.* 1989), *CAT* (cloranfenicol acetiltransferase, Davis *et al.* 1992) sob o controle do promotor de interesse, revelando a expressão em diferentes tecidos e órgãos da planta, em diferentes fases do desenvolvimento e em resposta a diferentes tratamentos. Alguns desses genes repórteres, inclusive, possibilitam avaliações quantitativas da ativação do promotor, podendo-se avaliar a expressão do gene em diferentes condições.

A transativação também é uma técnica comumente utilizada no estudo de promotores (Bossche *et al.* 2013). Esse ensaio tem a finalidade de testar se uma proteína (com capacidade de ligação ao DNA e atividade de fator de transcrição) consegue ativar a expressão de um gene repórter fusionado a uma região promotora que se deseja estudar. A ativação do repórter é determinada por métodos quantitativos. Portanto, a transativação identifica *trans*-elementos de regulação da transcrição do gene de interesse, assim como regiões do promotor ativadas por esses fatores.

O método de mono-híbrido em levedura também tem o objetivo de identificar fatores *trans* reguladores da expressão gênica pela triagem de

bibliotecas de cDNAs (*Current Protocols in Molecular Biology Online* 2003; *BD Matchmaker Library Construction & Screening Kits User Manual* 2003). Nesse sistema, a detecção é baseada na interação de um fator de transcrição (presa) com uma sequência de DNA regulatória (isca) fusionada a montante de um gene repórter. Para se certificar que essa ligação ao DNA resulta na ativação do gene repórter, a biblioteca de expressão é construída de forma que o cDNA da proteína “presa” seja clonado unido ao domínio de ativação (AD) de um fator de transcrição conhecido, geralmente o fator GAL4. Assim, esta técnica constitui-se uma importante ferramenta na identificação de fatores de transcrição (Figueiredo *et al.* 2012). Todo o ensaio é conduzido em levedura, o que, ao contrário dos sistemas de expressão em procaríotos, evita algumas possíveis dificuldades, como dobramento incorreto de proteínas ou a falta de modificações pós-traducionais necessárias para a correta conformação e funcionalidade da proteína. O gene repórter e os genes de seleção de transformação da levedura são responsáveis pela biossíntese de aminoácidos essenciais para a sobrevivência desse organismo. Dessa forma, a levedura que apresentar interação entre a sequência “isca” e a proteína “presa” irá expressar o gene repórter para a síntese de histidina e poderá crescer em meio seletivo na ausência desse aminoácido.

Entender a regulação da expressão gênica por *cis*- e *trans*-elementos é fundamental para a melhor compreensão das vias de sinalização envolvidas na resposta a estresses ambientais. Portanto, a identificação de fatores de transcrição e de regiões promotoras regulatórias, através dessas metodologias citadas, é um tema de grande importância, tendo provável aplicação no melhoramento de plantas. Além disso, o estudo de possíveis regiões regulatórias dos promotores de genes responsivos ao Al é fundamental para a identificação de *cis*-elementos característicos da resposta a esse metal.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi identificar fatores reguladores da expressão dos genes *OsASR1* e *OsASR5*.

### **Objetivos específicos:**

a. Construir vetores de transformação de protoplastos com fragmentos dos promotores de *OsASR1* e *OsASR5* para identificar regiões regulatórias e responsivas ao tratamento com alumínio.

b. Realizar ensaio de transativação com as proteínas ASR1 e ASR5 e com fragmentos dos promotores de *OsASR1* e *OsASR5* que contêm o *cis*-elemento de ligação de ASR5 (GCCCA) para verificar se ASR1 e ASR5 são capazes de regular a própria transcrição.

c. Construir vetores de transformação de levedura com fragmentos do promotor do gene *OsASR5* para identificação de fatores de transcrição que regulam expressão do gene utilizando o sistema de mono-híbrido em levedura.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

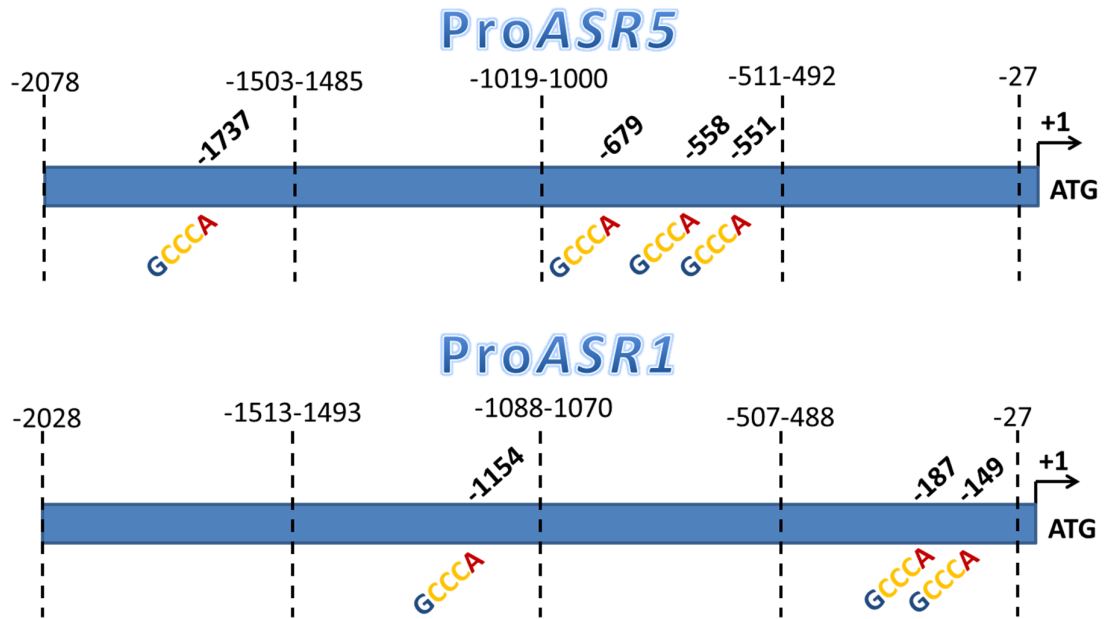
#### 3.1. Obtenção de vetores de transformação de protoplastos

Os produtos de amplificação por PCR da região promotora dos genes *OsASR1* (LOC\_ Os02g33820) e *OsASR5* (LOC\_Os11g06720) (fragmentos de 500, 1.000, 1.500 e 2.000 pb; **Figura 1**), utilizando oligonucleotídeos, contendo sítios para enzimas de restrição (*Bam*HI e *Pst*I), e DNA genômico de arroz, foram clonados em vetor de entrada pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). Essa clonagem foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada fragmento da região promotora. A construção obtida foi digerida por enzimas de restrição e os fragmentos da digestão ligados ao vetor de destino pGusXX (Pasquali *et al.* 1994), fusionando as regiões promotoras ao gene repórter *GUS* (gene da  $\beta$ -D-glicuronidase). Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento.

#### 3.2. Obtenção de vetores de transformação para mono-híbrido

A região promotora de *OsASR5* (fragmentos de 500 pb) foi amplificada com oligonucleotídeos contendo sítios para enzimas de restrição (*Sac*I, *Spe*I e *Eco*RI) e clonada em vetor de entrada pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). A clonagem foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os fragmentos (1-500pb, 500-1000pb, 1000-1500pb, 1500-2000pb). As construções obtidas sofreram digestão por enzimas de restrição e os fragmentos resultantes foram ligados ao vetor de destino pHIS2.1 (Clontech), fusionando as regiões promotoras ao gene repórter *HIS3* (gene de biossíntese da histidina). Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento.





**Figura 1.** Região promotora dos genes *OsASR1* e *OsASR5*. Números acima da linha tracejada: posições de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados na clonagem dos fragmentos; Números em negrito: posições de *cis*-elementos GATC; **GATC**: sequência consenso de ligação do fator de transcrição ASR5.

### 3.3. Transformação de protoplastos de arroz

O isolamento de protoplastos de plântulas de arroz (*Oryza sativa* subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare) crescidas em meio MS (Murashige e Skoog) foi realizado de acordo com Chen *et al.* 2006, e a transformação foi realizada pelo método de polietilenoglicol (PEG 4000), descrito por Tao *et al.* 2002. Os protoplastos foram transformados com o plasmídeo pGusXX contendo os fragmentos da região promotora dos genes *OsASR1* e *OsASR5*, assim como com o plasmídeo pGusSH contendo o promotor CaMV35S (*Cauliflower Mosaic Virus*) fusionado a *GUS* (controle positivo) e o plasmídeo pGusXX vazio (controle negativo). Todas as transformações contêm o plasmídeo de superexpressão da enzima Renilla Luciferase (pR.Luc) para normalização do ensaio. Também foi utilizado um controle de transformação com o vetor pART7\_HAGFP contendo o gene da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). Após a transformação, esses protoplastos foram incubados no escuro por 16h a 28 °C para permitir a expressão transiente do gene repórter *GUS*. Em seguida, foi realizado o tratamento desses protoplastos com meio W5 (pH 4,5) contendo cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 100 µM por 4h. Essa concentração e esse tempo de tratamento foram previamente estabelecidos com testes de viabilidade celular dos protoplastos através de observação da integridade da membrana plasmática das células em microscópio óptico. O controle de cada transformação continha apenas meio W5 (pH 4,5). Esse experimento foi repetido quatro vezes para todas as construções.

### 3.4. Transformação de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

O isolamento de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) foi realizado pelo método da fita adesiva segundo Wu *et al.* 2009. O método de polietilenoglicol (PEG 4000) também foi utilizado para a transformação. Os plasmídeos (pGusXXproAsr1\_500pb e pGusXXproAsr5\_1000pb) contendo os fragmentos que possuem os *cis*-elementos de ligação da proteína ASR5 (500 pb de *ASR1* e 1000 pb de *ASR5*) foram utilizados nos ensaios de transativação. Plasmídeos (pART) contendo o gene de *OsASR1* e *OsASR5* sob o controle do promotor CaMV35S

foram usados para superexpressão das proteínas ASR1 e ASR5, respectivamente. Todas as transformações contêm o plasmídeo de superexpressão da enzima Renilla luciferase (pR.Luc) para normalização da transativação. Controles negativo (pGusXX vazio), positivo (pGusSH) e de transformação (pART7\_HAGFP) também foram utilizados no ensaio. Os protoplastos foram incubados em fotoperíodo 12h/12h por 48h a 25 °C para permitir a expressão do gene repórter *GUS*.

### **3.5. Ensaio de atividade de GUS**

Os protoplastos foram coletados por centrifugação a 13.000 rpm por 5 min e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram submetidos à extração de proteínas através de lise em tampão CCLR (25 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5, 1 mM de EDTA, 7 mM de 2-mercaptoetanol, 1% de triton X-100, 10% de glicerol) e centrifugação a 13.000 rpm por 5 min a 4 °C.

A atividade da enzima  $\beta$ -D-glicuronidase (GUS) foi analisada por método quantitativo utilizando 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicuronídeo (4-MUG; Sigma). O substrato 4-MUG é hidrolisado pela enzima GUS em ácido glicurônico e produto fluorogênico MU (metilumbeliferona), cuja atividade fluorescente é detectada por irradiação com luz ultra-violeta. A quantificação da atividade de GUS foi realizada em triplicata técnica. Foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  do extrato protéico para cada reação em 190  $\mu\text{L}$  de tampão CCLR com o substrato 4-MUG a 0,35 mg/mL. As reações foram incubadas a 37 °C e as leituras de fluorescência foram realizadas a cada hora durante 5 horas (tempos 0h - 4h) no equipamento SpectraMax M4 (comprimentos de onda de excitação a 365 nm e de emissão a 444 nm). A fluorescência medida foi normalizada pela atividade da enzima Luciferase, determinada em reação com 10  $\mu\text{L}$  do extrato protéico em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (100 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5, 0,5 M de NaCl, 0,44 mg/mL de BSA) com o substrato coelenterazina (Sigma) a 3,03 ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.6. Análise estatística

A análise estatística foi feita por teste *t* de *Student*, comparando grupos controle e tratado com AlCl<sub>3</sub>. Esse teste também foi utilizado para a comparação entre a ativação dos promotores de *OsASR1* e *OsASR5*. A correlação de *Pearson* foi calculada para testar uma tendência de aumento da atividade de GUS conforme o aumento do tamanho do promotor nas construções. O teste ANOVA de uma via foi realizado para o ensaio de transativação.

### 3.7. Mono-híbrido

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* de estirpe deficiente na produção dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina (Y187) foram transformadas pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (AcLi/PEG 3350; *Current Protocols in Molecular Biology* 2001) e choque térmico com as construções de pHIS2.1 (plasmídeo episomal) contendo os fragmentos de 500 pb da região promotora de *OsASR5*. As leveduras transformadas foram incubadas a 28 °C em meio seletivo SD (*Synthetic Dropout*) com deficiência em triptofano (aminoácido de seleção para o plasmídeo pHIS2.1).

A concentração de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) ideal para realizar a triagem de clones da biblioteca foi predeterminada em teste de auto-ativação com a levedura Y187 transformada com o vetor pHIS2.1 contendo os fragmentos do promotor de *OsASR5*. Foram testadas concentrações de 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM e 50 mM de 3-AT.

Para a realização da triagem de clones foi utilizada a biblioteca de cDNA de folhas de arroz cv Nipponbare (HybridZAP-2.1 XR – Agilent Technologies) tratada com 200 mM de NaCl e disponibilizada pelo grupo de pesquisa do Professor Nelson J. M. Saibo do Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa.

As leveduras (com o vetor pHIS2.1proAsr5\_1-500pb) foram posteriormente co-transformadas com a biblioteca e foi realizada a triagem de transformantes com capacidade de sintetizar histidina (expressar gene repórter *HIS3*) em meio seletivo SD deficiente em triptofano, histidina e leucina (aminoácido de seleção

para a biblioteca de cDNA) e com 10 mM de 3-AT. As colônias crescidas em meio seletivo SD (-Leu, -Trp, -His) foram crescidas novamente em meio de seleção e submetidas a extração de DNA plasmidial (protocolo do manual *HybridZAP-2.1 XR Library Construction Kit and HybridZAP-2.1 XR cDNA Synthesis Kit* 2010). A presença de cDNAs de clones da biblioteca de cDNA foi confirmada por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos 5'AD/3'AD.

### **3.8. Sequenciamento de cDNAs**

O DNA plasmidial extraído das colônias de levedura selecionadas foi introduzido por eletroporação em células de *Escherichia coli* que foram selecionadas em meio LB com antibiótico ampicilina. As bactérias transformantes obtidas tiveram seus plasmídeos extraídos utilizando o GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma) e os mesmos foram sequenciados pelo método de Sanger utilizando o par de oligonucleotídeos 5'AD/3'AD.

Após o sequenciamento foi realizada uma busca nos sites *Phytozome* ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *Rice Genome Annotation Project* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) para identificar as sequências dos clones encontrados. Também se utilizou as ferramentas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), ScanProsite (<http://prosite.expasy.org>) e Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>) para análises de busca de padrões de função com as sequências de aminoácidos das proteínas identificadas.

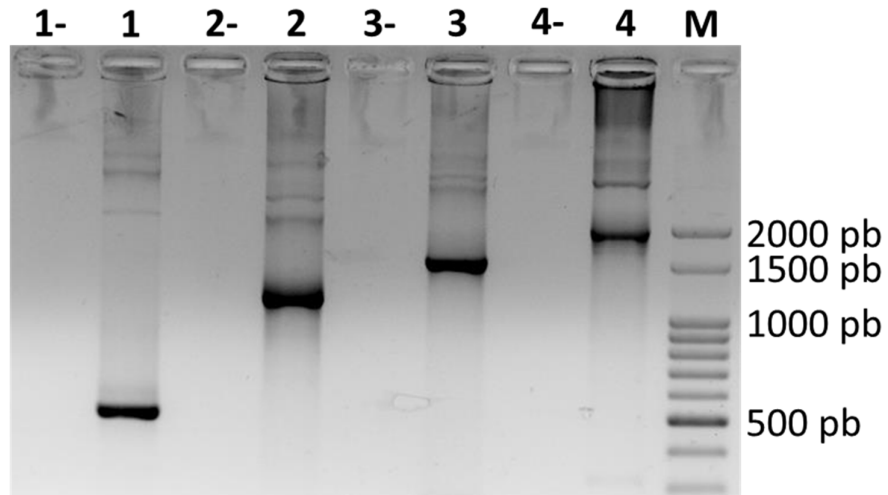
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Clonagem de fragmentos da região promotora

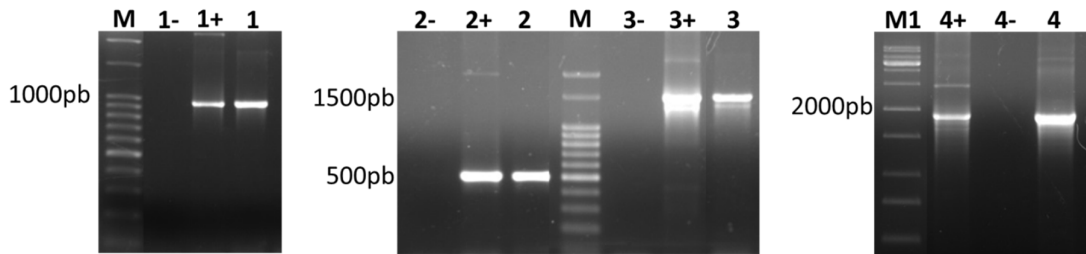
Com o objetivo de identificar as regiões promotoras responsivas ao AI, os promotores dos genes *OsASR1* e *OsASR5* foram fragmentados e clonados no vetor de entrada pGEM-T Easy (Promega, Anexo II) e posteriormente no vetor de destino pGusXX (Anexo II). Essa abordagem foi utilizada para uma melhor visualização da digestão com enzimas de restrição do vetor pGEM-T Easy (Promega) em gel de agarose. Oligonucleotídeos específicos foram projetados contendo o sítio de restrição das enzimas utilizadas e a sequência de anelamento na região promotora (Anexo I).

Os promotores de *OsASR1* e *OsASR5* foram amplificados por PCR em fragmentos de 500 pb, 1000 pb, 1500 pb e 2000 pb. Posteriormente, esses insertos foram introduzidos no vetor pGEM-T Easy (Promega) por reação de ligação, e o produto dessa reação introduzido em células competentes de *E. coli* (crescidas em meio de seleção com antibiótico ampicilina, IPTG e X-gal). Colônias brancas foram testadas por PCR com oligonucleotídeos específicos para a sequência introduzida. A clonagem dos fragmentos de *OsASR1* nesse vetor foi confirmada novamente por PCR utilizando DNA plasmidial extraído por kit de miniprep (**Figura 2**).

Os plasmídeos obtidos foram digeridos pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*II em duas reações sequenciais devido a incompatibilidade de tampões de reação para essas enzimas. Os sítios de restrição de *Bam*HI e *Pst*II foram selecionados para compor os oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*, respectivamente) devido à orientação correta de clonagem no vetor pGusXX e à ausência de sua sequência nos promotores dos genes *OsASR1* e *OsASR5*. Após a digestão, os fragmentos foram extraídos de gel de agarose e introduzidos no vetor de destino em reação catalisada pela T4 DNA ligase (Promega). A clonagem em pGusXX foi confirmada por PCR de colônia e por PCR utilizando DNA plasmidial extraído por miniprep, tanto para o promotor de *OsASR1* (**Figura 3**), quanto para o promotor de *OsASR5* (**Figura 4**).

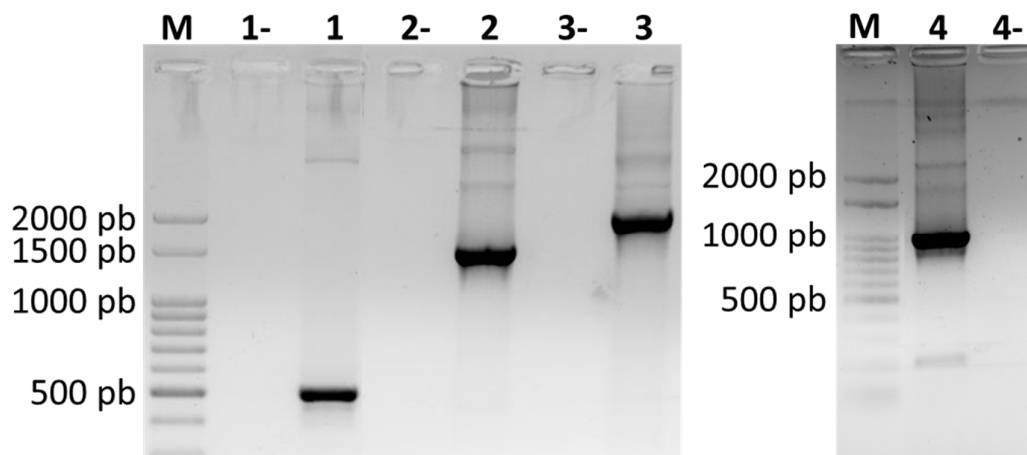


**Figura 2.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR1* no vetor de entrada pGEM-T Easy. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **1** = pGEMproAsr1\_500pb; **2** = pGEMproAsr1\_1000pb; **3** = pGEMproAsr1\_1500pb; **4** = pGEMproAsr1\_2000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações; **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig).



**Figura 3.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR1* no vetor de destino pGusXX. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **1** = pGusXXproAsr1\_1000pb; **2** = pGusXXproAsr1\_500pb; **3** = pGusXXproAsr1\_1500pb; **4** = pGusXXproAsr1\_2000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações; Canaletas **1+**, **2+**, **3+** e **4+** = controles positivos (em pGEM) das respectivas reações; **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **M1** = marcador de 1 kb (Ladder 1 kb da Ludwig).

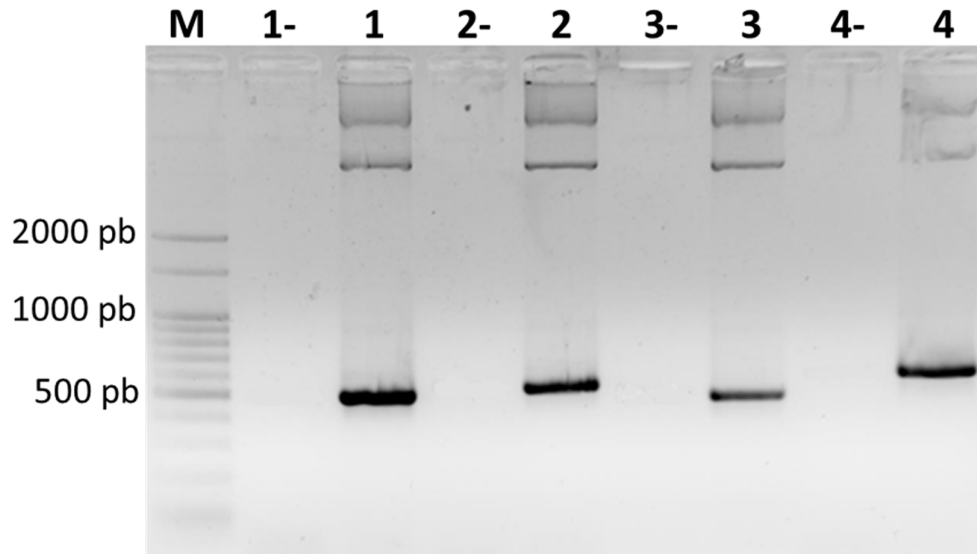




**Figura 4.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR5* no vetor de destino pGusXX. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **1** = pGusXXproAsr5\_500pb; **2** = pGusXXproAsr5\_1500pb; **3** = pGusXXproAsr5\_2000pb; **4** = pGusXXproAsr5\_1000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações.

Para a realização do ensaio de mono-híbrido, foi necessária a obtenção de vetores pHIS2.1 (Clontech, Anexo II) com fragmentos da região promotora do gene *OsASR5*. Oligonucleotídeos específicos com sítios para enzimas de restrição (Anexo I) foram desenhados para a amplificação de porções de 1-500 pb, 500-1000 pb, 1000-1500 pb e 1500-2000 pb, com pequenas sobreposições entre elas. Primeiramente, essas frações foram introduzidas no vetor de entrada pGEM e, posteriormente, inseridas no vetor de destino pHIS2.1 a montante do gene *HIS3* na orientação 5'→3' devido às sequências de restrição. A clonagem desses fragmentos foi confirmada em PCR de colônia e PCR de plasmídeo extraído por miniprep (**Figura 5**).

Todas as construções obtidas, tanto de *OsASR1* quanto de *OsASR5*, foram novamente confirmadas por sequenciamento e analisadas por alinhamentos das sequências no programa Vector NTI (versão 10.3.1, Invitrogen).

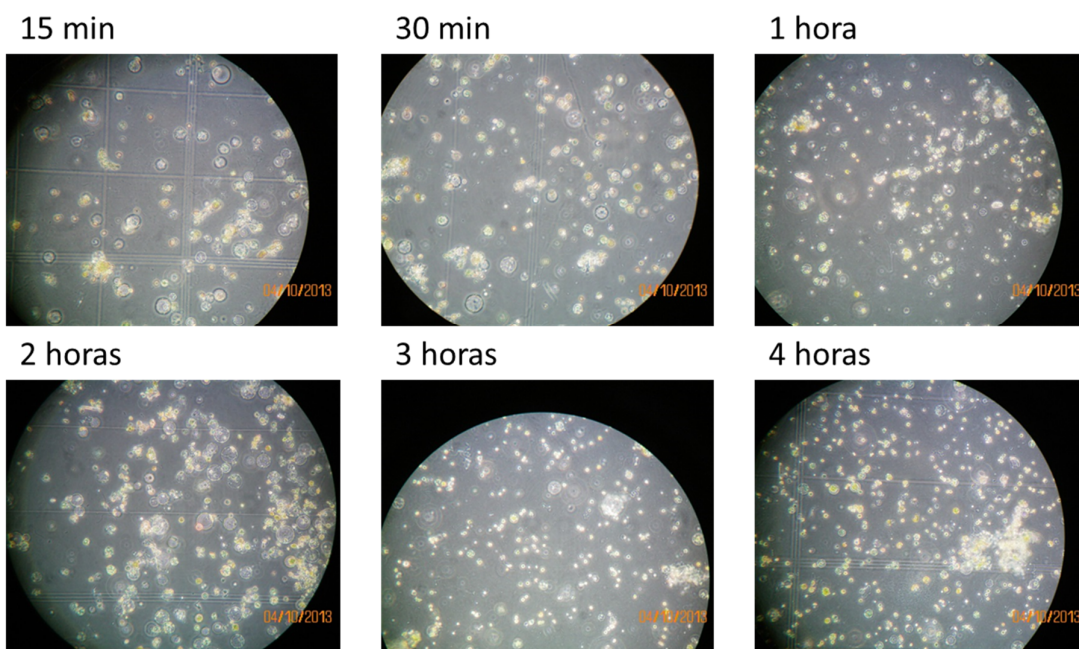


**Figura 5.** Confirmação da clonagem dos fragmentos da região promotora de *OsASR5* no vetor de destino pHIS2.1. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **1** = pHIS2.1proAsr5\_1-500pb; **2** = pHIS2.1proAsr5\_500-1000pb; **3** = pHIS2.1proAsr5\_1000-1500pb; **4** = pHIS2.1proAsr5\_1500-2000pb; Canaletas **1-**, **2-**, **3-** e **4-** = controles negativos das respectivas reações.

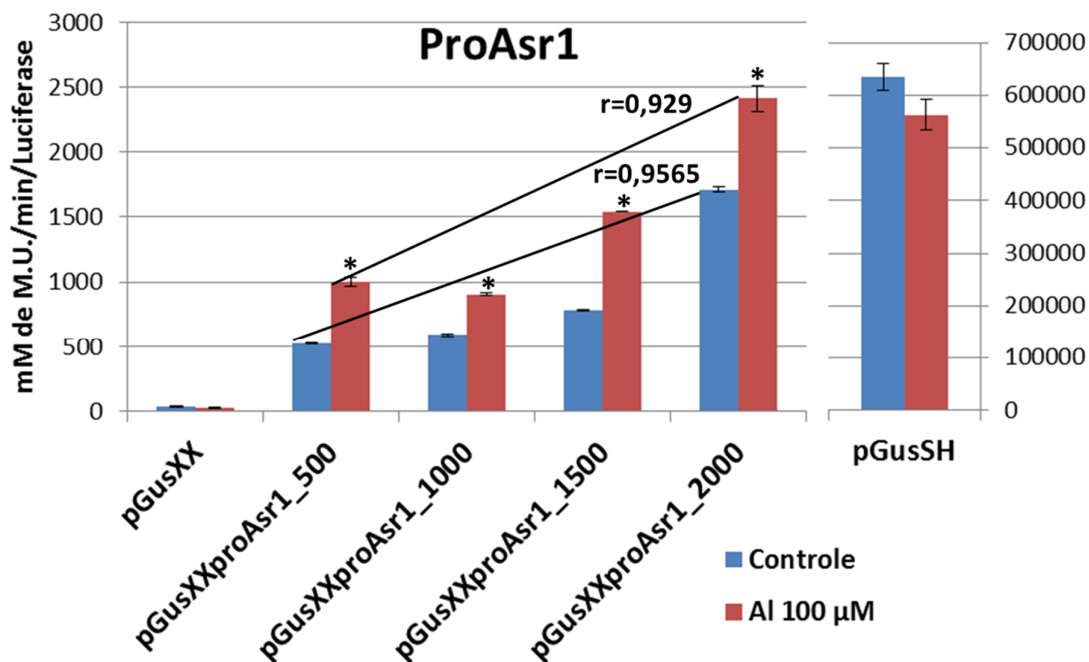
#### 4.2. Atividade de GUS em protoplastos de arroz tratados com Al

A fim de buscar regiões promotoras responsivas ao Al nos promotores de *OsASR1* e *OsASR5*, protoplastos de arroz foram transformados com plasmídeos pGusXX contendo fragmentos da região promotora desses genes de diferentes tamanhos (500 pb, 1000 pb, 1500 pb e 2000 pb) fusionados ao gene repórter *GUS* e posteriormente tratados com  $\text{AlCl}_3$  a 100  $\mu\text{M}$  por 4h. Essa concentração de Al e o tempo de tratamento foram previamente estabelecidos por observações em microscópio óptico da integridade da membrana plasmática dessas células. No teste de viabilidade celular, não se observou rompimento da membrana dos protoplastos mesmo após 4h de tratamento com  $\text{AlCl}_3$  a 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 6**). Esse tempo de tratamento também foi selecionado devido ao aumento nos níveis de transcritos dos genes *ASR* em plantas de arroz submetidas ao Al por 4h verificado por Arenhart e colaboradores (2013).

Após o tratamento, a atividade de GUS foi quantificada em extrato protéico e normalizada pela atividade da enzima Luciferase. Em todas as construções para *OsASR1*, o tratamento com Al teve maior atividade de GUS em relação ao controle (**Figura 7**). Observou-se também uma tendência de aumento da atividade com o aumento do tamanho da região promotora para o grupo controle ( $r=0,929$  e  $p=0,0225$ ) e para o grupo tratado com Al ( $r=0,9565$  e  $p=0,0108$ ). Não houve diferença significativa para os plasmídeos pGusSH e pGusXX vazio entre controle e tratamento.



**Figura 6.** Teste de viabilidade de protoplastos de arroz após diferentes tempos de tratamento com  $\text{AlCl}_3$  a  $100 \mu\text{M}$ . Após 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h e 4h de tratamento com  $\text{AlCl}_3$ , protoplastos de arroz foram observados em microscópio óptico. Fotos tiradas em aumento na lente objetiva de 40X.

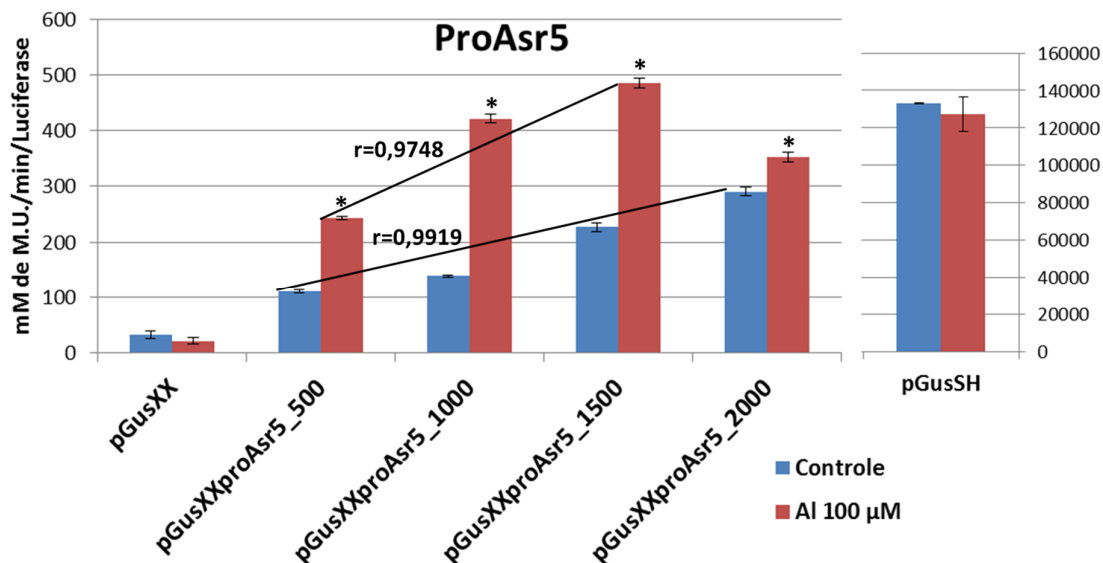


**Figura 7.** Ensaio de expressão transiente do gene *GUS* regulada pelos fragmentos do promotor de *OsASR1* em protoplastos de arroz. A atividade enzimática de *GUS* (mM de MU/min) foi determinada pelo método quantitativo de 4-MUG e normalizada em relação à atividade da *Luciferase*. Colunas azuis representam o controle e colunas vermelhas representam o tratamento com  $\text{AlCl}_3$  a 100  $\mu\text{M}$ . Barras verticais pretas representam desvio padrão entre replicatas técnicas. Asteriscos (\*) representam diferença estatisticamente significativa por teste *t* de *Student* em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Correlação de Pearson (*r*) calculada para grupos controle e tratado com Al. Esse ensaio foi repetido quatro vezes sendo mostrado um experimento representativo dos resultados. **pGusXX** = vetor pGusXX vazio; **pGusSH** = controle positivo, *GUS* fusionado ao promotor CaMV35S.

As construções de *OsASR5* também apresentaram maior atividade de GUS após o tratamento com Al em relação ao controle (**Figura 8**). Uma tendência de aumento na atividade conforme aumenta o tamanho dos fragmentos do promotor de *OsASR5* foi observada novamente para o controle ( $r=0.9919$  e  $p=0,0009$ ). Porém, para o tratamento com Al, essa tendência manteve-se apenas até o fragmento de 1500 pb ( $r=0,9748$  e  $p=0,0252$ ), havendo uma diminuição da atividade de GUS para a transformação com toda a região de 2000 pb (**Figura 8**). Esse resultado sugere uma menor participação da região entre 1500-2000 pb na ativação de GUS em resposta ao Al. Um comportamento semelhante já foi evidenciado para um gene *ASR* de batata (*ci21A*), em que um maior fragmento da região promotora teve menor atividade de GUS em resposta ao frio comparada a um fragmento menor (Schneider *et al.* 1997).

Não houve diferença entre as ativações de GUS na presença de Al nas diferentes construções de *OsASR1* e *OsASR5*, não sendo possível determinar uma região de 500 pb mais responsiva ao Al, o que pode significar a existência de múltiplos *cis*-elementos de resposta ao Al distribuídos por todas as regiões promotoras, como já foi proposto para elementos de outros promotores de genes responsivos a metais (Dong *et al.* 2010).

Quando comparada a atividade de GUS regulada pelo promotor de *OsASR1* em relação ao promotor de *OsASR5*, percebe-se que GUS possui maior atividade nas construções do promotor de *OsASR1* (pela escala dos gráficos cerca de 5 vezes mais – de 500 a 2500 mM de MU/min/Luciferase) em relação às do promotor de *OsASR5* ( $p<0,05$ ; **Figuras 7 e 8**), indicando uma maior indução do promotor de *OsASR1*.



**Figura 8.** Ensaio de expressão transiente do gene *GUS* regulada pelos fragmentos do promotor de *OsASR5* em protoplastos de arroz. A atividade enzimática de *GUS* (mM de MU/min) foi determinada pelo método quantitativo de 4-MUG e normalizada em relação à atividade da *Luciferase*. Colunas azuis representam o controle e colunas vermelhas representam o tratamento com  $\text{AlCl}_3$  a 100  $\mu\text{M}$ . Barras verticais pretas representam desvio padrão entre replicatas técnicas. Asteriscos (\*) representam diferença estatisticamente significativa por teste *t* de *Student* em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Correlação de Pearson (*r*) calculada para grupos controle (todos os fragmentos) e tratado com Al (sem o fragmento de 2000 pb). Esse ensaio foi repetido quatro vezes sendo mostrado um experimento representativo dos resultados. **pGusXX** = vetor pGusXX vazio; **pGusSH** = controle positivo, *GUS* fusionado ao promotor CaMV35S.

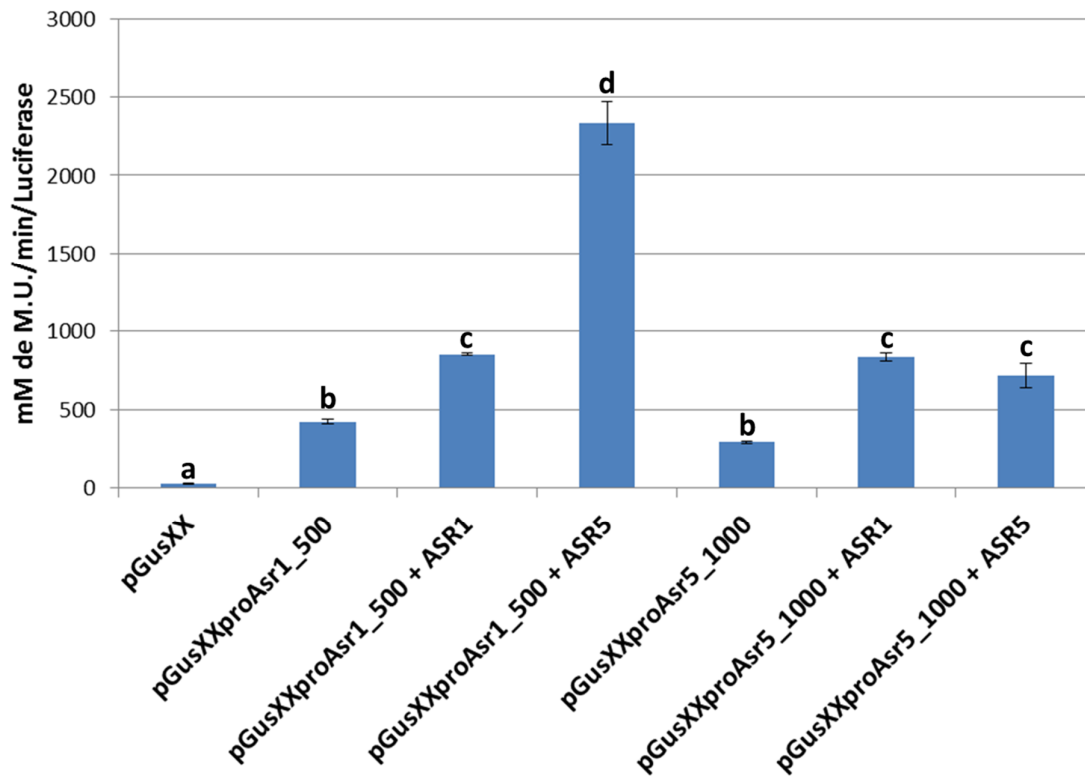


Em trabalho prévio do nosso grupo (Arenhart *et al.* 2013), foi verificado por RT-qPCR uma expressão mais elevada de *OsASR5* tanto em condições controle (sem Al) quanto após o tratamento com Al, em raízes de arroz, comparada com a expressão de *OsASR1*. Na parte aérea da planta, o gene *OsASR5* também teve maiores níveis de transcritos em relação a *OsASR1* na ausência de tratamento (Arenhart 2008). No entanto, a metodologia de análise de expressão utilizada nesse trabalho é diferente do RT-qPCR usado em Arenhart *et al.* 2013. RT-qPCR é uma metodologia de determinação dos níveis de transcritos acumulados. A quantificação de níveis de mRNA de um gene difere da determinação de atividade de uma enzima cuja transcrição é regulada pelo promotor desse gene. Existem outros níveis de regulação da expressão gênica além da transcrição, tais como controle da tradução e degradação proteolítica (Pradet-Balade *et al.* 2001), que não são avaliados nessas duas metodologias. Além disso, células de protoplastos são distintas de células da raiz ou mesmo de células de caule e folha, por não possuírem parede celular. Já foi demonstrado que *SolycASR1* liga-se a promotores de genes codificadores de proteínas que participam da síntese de parede celular em tomate (Ricardi *et al.* 2014) e também foi verificado que genes envolvidos no catabolismo de macromoléculas da parede celular foram reprimidos em plantas de arroz silenciadas para genes *ASR* (Arenhart *et al.* 2014). Assim, é possível que os genes analisados (*OsASR1* e *OsASR5*) estejam sofrendo alguma regulação de sua transcrição por causa do procedimento de remoção da parede celular. Essas células também são expostas a um alto nível de estresse durante o isolamento e a transformação, o que pode influenciar o ensaio (Hussey *et al.* 2013), alterando os níveis de expressão gênica em geral. Apesar dos resultados apresentados necessitarem avaliação com cautela em relação à comparação entre os dois promotores, é possível concluir que ambos são induzidos pelo alumínio e que possuem elementos de resposta a esse metal ao longo das regiões analisadas.

### 4.3. Ensaio de transativação em protoplastos de *A. thaliana*

Com o intuito de verificar uma possível auto regulação de *OsASR1* e *OsASR5*, bem como verificar a regulação de um gene pelo outro, protoplastos de *Arabidopsis thaliana* foram isolados e co-transformados com os plasmídeos pGusXXproAsr1\_500pb e pGusXXproAsr5\_1000pb, e plasmídeos de superexpressão das proteínas ASR1 e ASR5. Essas construções foram selecionadas para ensaio de transativação devido à presença de motivos GCCCA nessas regiões promotoras, 2 motivos em *OsASR1* e 3 motivos em *OsASR5* (**Figura 1**). Neste experimento, células de *A. thaliana* foram utilizadas uma vez que esta espécie não possui genes *ASR*, eliminando a possibilidade de transativação endógena.

A adição tanto de ASR1 quanto de ASR5 dirigiu a expressão de GUS quando utilizado a região promotora de 500 pb de *OsASR1* (**Figura 9**). A proteína ASR5 ainda proporcionou uma maior ativação do promotor de *OsASR1* comparada a ASR1 (**Figura 9**), sugerindo uma maior atividade de ASR5 como fator de transcrição. A expressão de GUS também foi ativada utilizando a construção com o promotor de *OsASR5* (fragmento de 1000 pb) quando adicionado ASR1 e ASR5, porém, ASR5 ativou a expressão de GUS em menor escala no promotor de *OsASR5* em relação ao de *OsASR1* (**Figura 9**). Essa diferença poderia ser explicada pela diferença na posição dos *cis*-elementos nas regiões promotoras, já que os dois elementos GCCCA do promotor de *OsASR1* localizam-se mais próximos do sítio de início da transcrição (**Figura 1**).



**Figura 9.** Ensaio de transativação em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. A atividade enzimática de GUS (mM de MU/min) foi determinada pelo método quantitativo de 4-MUG e normalizada em relação à atividade da Luciferase. Barras verticais pretas representam desvio padrão entre replicatas técnicas. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa por ANOVA de uma via ( $p < 0,01$ ). Esse ensaio foi repetido duas vezes sendo mostrado um experimento representativo dos resultados. **pGusXX** = vetor pGusXX vazio; **pGusXXproAsr1\_500** = fragmento de 500 pb do promotor de *OsASR1* fusionado ao gene *GUS*; **pGusXXproAsr5\_1000** = fragmento de 1000 pb do promotor de *OsASR5* fusionado ao gene *GUS*; **ASR1** = gene *OsASR1* fusionado ao promotor CaMV35S para superexpressão da proteína ASR1; **ASR5** = gene *OsASR5* fusionado ao promotor CaMV35S para superexpressão da proteína ASR5.

Esses resultados indicam uma possível capacidade de auto-regulação positiva direta da transcrição dos genes *OsASR1* e *OsASR5*, que são ativados por suas próprias proteínas. A auto-regulação é um mecanismo que evoluiu de maneira a refinar e manter níveis de fatores de transcrição. Além disso, é uma estratégia transcricional empregada desde bacteriófagos até humanos para controlar a expressão gênica (Kulmburg *et al.* 1992; Soncini *et al.* 1995; Timchenko *et al.* 1995; Schwechheimer *et al.* 2000; Crews & Pearson 2009). Já foi proposto que a ocorrência de auto-regulação correlaciona-se com a importância fisiológica do fator de transcrição (Crews & Pearson 2009). Dessa forma, FTs que controlam a transcrição de um grande número de genes, como os fatores ASR, necessitam ser auto-regulados, já que os seus níveis de expressão devem ser precisamente controlados (Crews & Pearson 2009). A auto-regulação positiva direta também foi evidenciada em arroz para o gene *OSH1*, cuja proteína se liga ao promotor de cinco membros dessa família gênica (Tsuda *et al.* 2011). Além disso, o promotor de *OsASR1* foi encontrado no ensaio de ChIP-seq utilizando ASR5 de arroz (Arenhart *et al.* 2014). Nesse experimento, a proteína ASR5 foi capaz de se ligar aos motivos GCCCA encontrados no promotor de *OsASR1*, o que sugere uma regulação da expressão de *OsASR1* por ASR5.

Embora não exista um experimento de ChIP-seq para ASR1 de arroz publicado, comprovando sua atividade como fator de transcrição e demonstrando os seus alvos de regulação, recentemente foi verificado que essa proteína possui localização subcelular igual a de ASR5, sendo encontrada no núcleo e citoplasma (Arenhart RA, dados não publicados). A capacidade de ligação ao DNA de ASR1 de arroz também foi analisada em ensaios de *pull-down* (Arenhart RA, dados não publicados). ASR1 consegue ligar-se à região promotora de *OsSTAR1* (um gene altamente induzido em resposta ao Al) *in vitro*, porém sua ligação é desfeita na presença de ASR5, e mesmo adicionando-se maiores quantidades de ASR1, a proteína ASR5 ainda se liga preferencialmente ao promotor de *OsSTAR1*. Isso demonstra uma maior intensidade de ligação de ASR5 com o DNA, sendo essa proteína um fator de transcrição possivelmente de maior afinidade pelo DNA que ASR1, o que corrobora com os dados do ensaio de transativação, em que há maior ativação do promotor de *OsASR1* com ASR5 do que com ASR1 (**Figura 9**).

#### 4.4. Mono-híbrido

Após a obtenção das construções em pHIS2.1 com a região promotora de *OsASR5*, foi testada a auto-ativação na levedura Y187. Essa estirpe foi transformada apenas com o plasmídeo pHIS2.1 contendo fragmentos de 500 pb do promotor de *OsASR5*. Posteriormente, as leveduras foram crescidas em meio seletivo SD – TH (sem triptofano e histidina) com concentrações crescentes de 3-AT. Este reagente é um inibidor competitivo da atividade da enzima HIS3, responsável pela biossíntese de histidina (*BD Matchmaker Library Construction & Screening Kits User Manual* 2003). Assim, leveduras que não estejam expressando o gene HIS3 (que está sob controle de fragmentos do promotor de *OsASR5*) em grande quantidade não conseguem sobreviver em um meio acrescido de 3-AT.

Observou-se o crescimento de colônias até a concentração de 5 mM de 3-AT para as construções de pHIS2.1proAsr5\_1-500pb e pHIS2.1proAsr5\_1000-1500pb, tendo inibição do crescimento a 10 mM de 3-AT (**Figura 10**). A construção de pHIS2.1proAsr5\_500-1000pb apresentou crescimento de levedura em meio com concentrações elevadas de 3-AT, até 40 mM (**Figura 10**), e infelizmente não pode ser utilizada para a triagem de clones His-positivos, pois uma concentração de no máximo 20 mM é recomendada para essa metodologia, podendo variar entre diferentes estirpes de levedura (*BD Matchmaker Library Construction & Screening Kits User Manual* 2003). Já para a construção pHIS2.1proAsr5\_1500-2000pb, as colônias de leveduras tiveram seu crescimento inibido em concentração mínima de 5 mM de 3-AT (**Figura 10**). A partir desses resultados e dos resultados de atividade de GUS em protoplastos de arroz, decidiu-se utilizar a construção de pHIS2.1proAsr5\_1-500pb para o ensaio de mono-híbrido devido à baixa concentração de 3-AT necessária para a triagem (10 mM) e pela maior atividade de GUS em protoplastos submetidos ao tratamento com Al em relação ao controle (**Figura 8**). As construções pHIS2.1proAsr5\_1000-1500pb e pHIS2.1proAsr5\_1500-2000pb também poderiam ser usadas na triagem, porém, é mais provável encontrar um maior número de fatores de transcrição nos primeiros 1000 pb do promotor, portanto, optou-se pelos primeiros 500 pb da região promotora.

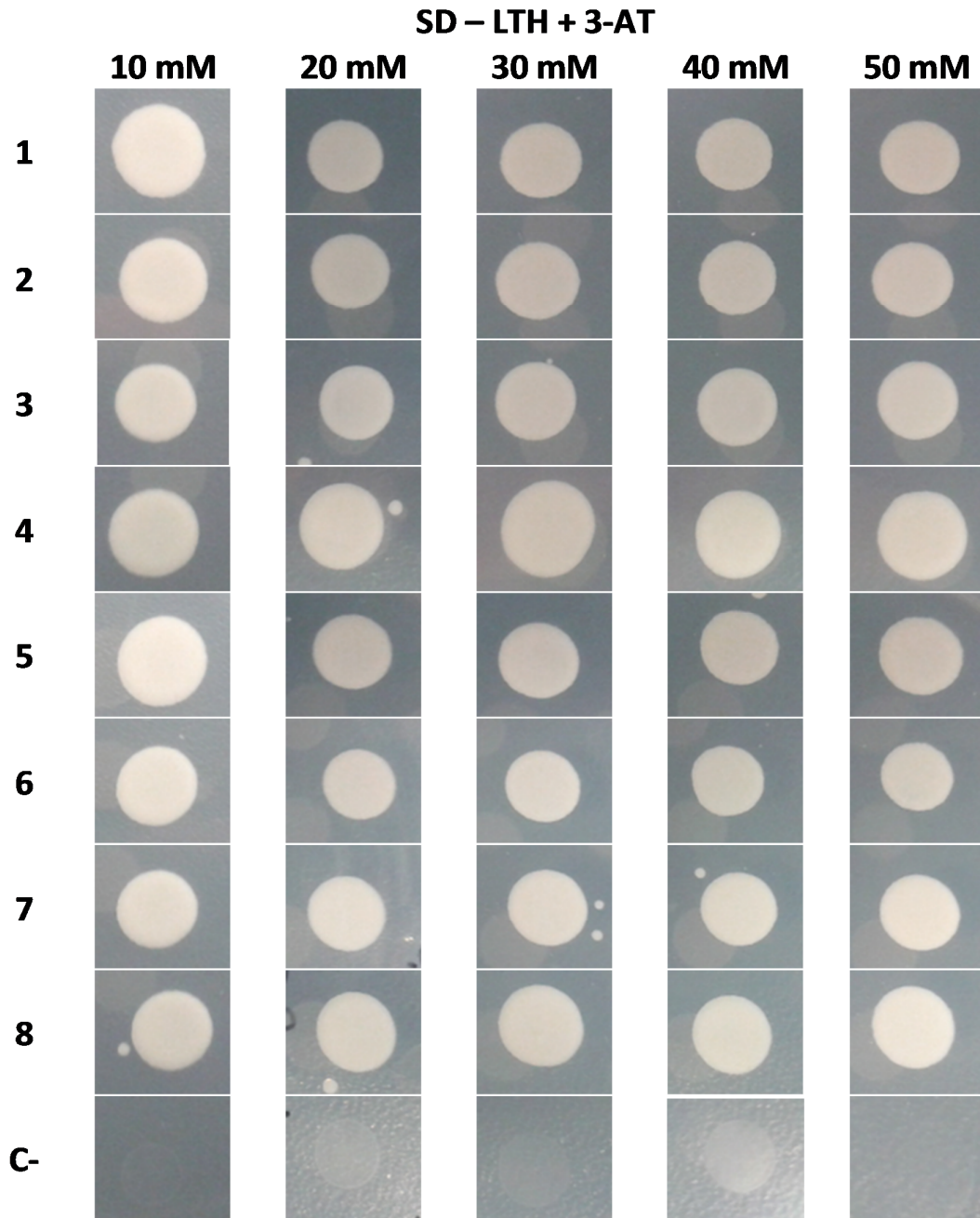
Construções pHIS2.1	Concentrações de 3-AT						
	0 mM	5 mM	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM
Asr5_1-500							
Asr5_500-1000							
Asr5_1000-1500							
Asr5_1500-2000							

**Figura 10.** Teste de auto-ativação da transcrição do gene repórter com consequente biossíntese de histidina na levedura Y187. Quatro colônias de cada transformação foram crescidas em meio seletivo SD – TH (sem triptofano e histidina) com 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) em concentrações crescentes (0 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM). Fotos tiradas após 7 dias de incubação a 28 °C.

A triagem de clones positivos para a interação DNA-proteína foi realizada por transformação sequencial da levedura Y187 com a biblioteca de cDNA (de plantas de arroz tratadas com NaCl a 200 mM). A levedura foi, então, crescida em meios SD – LT (para cálculo de eficiência da transformação) e SD – LTH + 10 mM de 3-AT. Mais de 850.000 clones foram testados, resultando em oito interações His-positivas. Esses oito clones tiveram sua intensidade de interação testada novamente por crescimento em meio SD – LTH com maiores concentrações de 3-AT. Todos eles cresceram em concentração elevada de 3-AT, a 50 mM (**Figura 11**). Com esse resultado, portanto, não se conseguiu descartar nenhum clone como falso positivo, dando prosseguimento às análises moleculares com esses oito possíveis candidatos de interação.

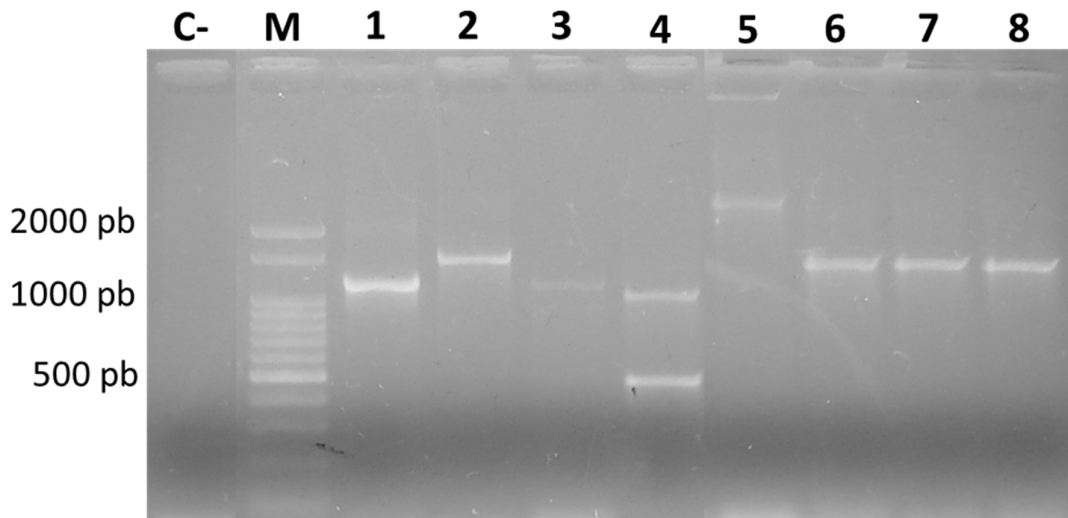
Os plasmídeos extraídos da levedura foram submetidos a uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos para o sítio de clonagem do plasmídeo pAD-GAL4-2.1 (par 5'AD/3'AD). Essa reação confirmou a presença de diferentes clones de cDNAs (**Figura 12**), tendo duas bandas no clone 4 (A e B) e bandas de igual tamanho nos clones 6, 7 e 8.

O DNA plasmidial de cada clone foi utilizado na transformação de *E. coli* para seleção com ampicilina do vetor da biblioteca (pAD-GAL4-2.1). O plasmídeo foi, então, extraído da bactéria e enviado para sequenciamento, com exceção do clone 4 que teve suas duas bandas extraídas do gel e depois sequenciadas. Todos os clones His-positivos tiveram, nas sequências de seus cDNAs, a presença de uma cauda poli-A, indicando que a região 3' UTR também foi clonada no vetor. Nem todos os clones encontravam-se na mesma fase de leitura que o domínio de ativação de GAL4. Porém, leveduras permitem mudanças na fase de leitura durante a tradução, podendo uma ORF grande na fase de leitura errada corresponder à proteína expressa (*BD Matchmaker Library Construction & Screening Kits User Manual* 2003). Para confirmar a interação entre proteína e DNA, é necessário clonar o cDNA inteiro desses clones no plasmídeo pAD-GAL4-2.1 em fase de leitura com o domínio de ativação de GAL4 e transformar as leveduras novamente com esse plasmídeo e o vetor pHIS2.1proAsr5\_1-500pb.



**Figura 11.** Teste da intensidade de interação dos clones His-positivos com o promotor de *OsASR5*. (1 – 8) Clones crescidos em meio seletivo SD – LTH (sem leucina, triptofano e histidina) com concentrações crescentes de 3-AT (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM e 50 mM). **C-** = controle negativo não transformado com a biblioteca. Fotos tiradas após 3 dias de incubação a 28 °C.





**Figura 12.** Confirmação da presença de plasmídeo da biblioteca de cDNA nos clones His-positivos da levedura Y187. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, utilizando os oligonucleotídeos 5'AD/3'AD. **C-** = controle negativo da reação; **M** = marcador de 100 pb (Ladder 100 pb da Ludwig); **1** = clone 1; **2** = clone 2; **3** = clone 3; **4** = clones 4A (banda de 1000 pb) e 4B (banda de 500 pb); **5** = clone 5; **6** = clone 6; **7** = clone 7; **8** = clone 8.

Através do ensaio de mono-híbrido, foram identificadas sete proteínas listadas na **Tabela 1**. Dessas sete, apenas uma está anotada como fator de transcrição (BTF3 – clone 3). A classificação das outras inclui: uma proteína com repetição WD (clone 1), uma proteína ligadora de selênio (clone 4A), uma actina (clone 4B), uma enzima conjugadora de ubiquitina (clone 5) e duas anotadas como proteínas expressas (clone 2 e clones 6, 7 e 8).

O fator de transcrição BTF3 (clone 3) é um fator extremamente importante devido ao seu papel em resposta aos estresses bióticos e abióticos (Li *et al.* 2009; Li *et al.* 2012a; Karan & Subudhi 2012) e em mecanismos fisiológicos e de desenvolvimento (Wang *et al.* 2012; Li *et al.* 2012b; Wang *et al.* 2014). Essa proteína também é conhecida como a subunidade  $\beta$  de NAC (*Nascent polypeptide-Associated Complex*), um complexo envolvido com a translocação de polipeptídeos nascentes (George *et al.* 1998; Fünfschilling & Rospert 1999) e com a regulação transcricional (Rospert *et al.* 2002). No entanto, BTF3 não parece ser um fator específico da regulação do gene *OsASR5*, participando da regulação da transcrição, algumas vezes como repressor (Hu & Ronne 1994), de outros genes responsáveis por respostas ao estresse (Huh *et al.* 2012). Além disso, o gene de BTF3 (LOC\_Os03g01910) foi reprimido em plantas de arroz silenciadas para os genes *OsASR1* e *OsASR5* (Arenhart *et al.* 2014), podendo esse gene também ser indiretamente regulado por ASR1 ou ASR5.

**Tabela 1.** Clones da biblioteca de cDNA identificados por sequenciamento.

<b>Clone</b>	<b>CDS clonada</b>	<b>CDS total</b>	<b>Lócus (LOC)</b>	<b>Nome da proteína</b>
<b>1</b>	689 pb	1005 pb	Os01g49290	Proteína com repetição WD
<b>2</b>	766 pb	1392 pb	Os01g14820	Proteína expressa
<b>3</b>	528 pb	531 pb	Os03g01910	Fator de transcrição BTF3
<b>4A</b>	601 pb	1449 pb	Os01g68770	Proteína ligante de selênio
<b>4B</b>	187 pb	612 pb	Os01g64630	Actina
<b>5</b>	459 pb	459 pb	Os05g08960	Enzima E2 conjugadora de ubiquitina
<b>6</b>				
<b>7</b>	685 pb	1740 pb	Os12g41810	Proteína expressa
<b>8</b>				

CDS – *Coding DNA Sequence*; pb – pares de base; WD – triptofano-aspartato; BTF – *Basal Transcription Factor*.

O gene Os01g49290 (clone 1) codifica uma proteína com seis repetições do domínio WD (composto pelos aminoácidos triptofano e aspartato). Esse domínio já foi encontrado em muitas proteínas implicadas em diversas funções biológicas como transdução de sinal, regulação transcricional, tráfico de vesículas, apoptose, controle do ciclo celular, entre outras (Smith *et al.* 1999; Li & Roberts 2001). Um grande número de proteínas TAFs (componentes do TFIID) possuem múltiplas repetições WD (Li & Roberts 2001), e essa proteína com repetição WD identificada por mono-híbrido foi classificada pelo *Quick GO* (*Gene Ontology*, <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>) como ligante de nucleotídeos, podendo constituir um fator de transcrição ou alguma proteína associada a um FT. O gene Os01g49290 possui níveis de expressão reduzidos em plantas de arroz silenciadas para os genes *OsASR1* e *OsASR5* (Arenhart *et al.* 2014), sendo possivelmente regulado indiretamente por ASRs. Esse gene (Os01g49290) também tem sua expressão modulada por tratamento com Al, sendo reprimido em resposta a esse metal em plantas de arroz não transformadas (Arenhart *et al.* 2014). É possível que essa proteína com repetição WD não atue como um ativador da transcrição de *OsASR5*, mas como um inibidor da sua expressão, e em resposta ao Al ele é reprimido fazendo com que *OsASR5* aumente seus níveis de transcritos.

O clone 4A foi classificado como uma proteína ligante de selênio de função exata ainda desconhecida, embora já tenha sido implicada no transporte de proteínas intra-Golgi (Porat *et al.* 2000) e no controle do estado redox de proteínas (Flemetakis *et al.* 2002). Esse gene (LOC\_Os01g68770) também responde ao Al em plantas de arroz, tendo seus níveis de transcritos aumentados com esse tratamento (Arenhart *et al.* 2014), podendo, portanto, ser um regulador da transcrição de *OsASR5* na resposta ao metal. Entretanto, essa interação DNA-proteína deve ser confirmada por co-transformação em levedura com o cDNA inteiro do clone 4A, e na ausência do clone 4B, que poderia ser o responsável pela interação e transcrição do gene de histidina.

O clone 4B codifica uma actina, uma proteína multifuncional com um papel na modulação da expressão gênica. A actina já foi encontrada no núcleo (Pederson & Aebi 2003) associada aos três tipos de RNA polimerase (Smith *et al.*

1979; Fomproix & Percipalle 2004; Hu *et al.* 2004), possivelmente funcionando como um fator de transcrição (Grummt 2006) ou regulando a atividade dos FTs (Miralles *et al.* 2003; Vartiainen *et al.* 2007; Vartiainen 2008). Essa proteína é capaz de atuar como um iniciador da transcrição quando associada a um tipo de miosina nuclear, interagindo com a RNA polimerase e outras enzimas envolvidas no processo de transcrição (Grummt 2006). Dessa forma, a actina poderia ser considerada um fator geral necessário à transcrição de diversos genes, mas não um fator específico para a expressão de *OsASR5*. Além disso, esse gene (LOC\_Os01g64630) não tem seus níveis de transcritos alterados por Al ou pelo silenciamento de genes *ASR* (Arenhart *et al.* 2014).

O gene Os05g08960 (clone 5), codificador de uma enzima E2 conjugadora de ubiquitina, também foi identificado como um possível candidato de interação. Enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) participam do processo de ubiquitinação seletiva de proteínas, junto com enzimas E1 e E3, direcionando-as para degradação no proteossoma (Jentsch 1992; Hershko & Ciechanover 1998). Contudo, outras funções já foram propostas para essas enzimas, como organização da cromatina (Cipressa & Cenci 2013) e regulação da transcrição (Rothofsky & Lin 1997; Lee *et al.* 2001; Chung *et al.* 2013). Verificou-se que a proteína identificada no mono-híbrido possui um domínio WD, encontrado em diversos componentes de fatores de transcrição gerais (as TAFs, Li & Roberts 2001), porém, ainda não se tem conhecimento se o gene Os05g08960 poderia funcionar como um fator de regulação transcricional.

Os cDNAs do clone 2 (LOC\_Os01g14820) e dos clones 6, 7 e 8 (LOC\_Os12g41810) codificam duas proteínas expressas em arroz de função desconhecida. Análises de busca de padrões de função nas ferramentas SMART, ScanProsite e Pfam não encontraram nenhum domínio funcional presente nesses bancos de dados dentro da sequência polipeptídica do clone 2. Essa proteína expressa pode ser um fator de transcrição ainda desconhecido, porém, a interação DNA-proteína precisa ser confirmada através de nova transformação de levedura com o cDNA inteiro do clone. Já para a proteína dos clones 6, 7 e 8, a busca de padrões de função com SMART resultou em 4 regiões *coiled-coil*. Esse domínio é característico de interações proteína-proteína (Woolfson *et al.* 2012) e é

responsável pelo reconhecimento específico de moléculas (Burkhard *et al.* 2001). Também possui um papel estrutural e de oligomerização em diversos processos celulares, incluindo transporte intracelular, síntese de ATP, sinalização transmembrana, citoesqueleto e estrutura celular, fusão de membranas, formação da matriz extracelular e transcrição (Adamson *et al.* 1993; Lupas 1996; Burkhard *et al.* 2001; Lupas & Gruber 2005; Woolfson *et al.* 2012). Essas regiões *coiled-coil* já foram encontradas em fatores de transcrição com motivos de zíper de leucina, como as proteínas da família bZIP, o fator GCN4 de levedura (Lupas 1996; Burkhard *et al.* 2001; Oshaben *et al.* 2012). Outros fatores de transcrição também utilizam o domínio *coiled-coil* em conjunto com os motivos bHLH (Vinson & Garcia 1992; Lupas & Gruber 2005) e dedos de zinco (Reddy *et al.* 1992). Assim, o gene Os12g41810 apresenta-se como um forte candidato de interação DNA-proteína, sendo um possível FT regulador da expressão de OsASR5 que, até então, não tinha sido identificado.

Alguns dos genes identificados (nos clones 1, 2, 4A, 6, 7 e 8), cuja função não é totalmente conhecida, parecem ser interessantes possibilidades de reguladores da transcrição de OsASR5, porém alguns desses clones ainda podem ser falsos-positivos, devendo sua interação ser confirmada.

A análise de interações DNA-proteína pelo método de mono-híbrido traz algumas desvantagens, por ser uma técnica baseada em uma biblioteca de cDNA que utiliza um sistema heterólogo de expressão. Existe a possibilidade de falsos-positivos assim como de falsos-negativos exemplificada em Vidal & Legrain (1999). Geralmente, uma alta especificidade é desejada, pois um grande número de falsos-positivos pode ocultar interações biológicas relevantes. Falsos-positivos podem acontecer devido a eventos de mutação que provocam um aumento da taxa de transcrição, assim como por causa de interações inespecíficas da proteína de fusão. No entanto, aumentar a especificidade normalmente leva a uma redução da sensibilidade e, conseqüentemente, um maior número de falsos-negativos. A não detecção de uma determinada interação pode ocorrer por diversas razões, tais como: a estabilidade ou o dobramento da proteína de fusão no sistema de levedura, que pode afetar suas propriedades de ativação transcricional; a falta de modificações pós-traducionais que podem ser essenciais

para a interação; uma possível toxicidade da proteína de fusão, que afeta a viabilidade das células transformadas; a necessidade da presença de co-reguladores para ativar a expressão gênica; a ausência ou baixa representação do gene na biblioteca, já que a mesma é construída refletindo o nível de transcrição dos cDNAs que a constituem (Vidal & Legrain 1999; Hussey *et al.* 2013). As proteínas que regulam a transcrição de um determinado gene provavelmente serão produzidas em pequenas quantidades, tendo sua concentração na célula finamente controlada e uma consequente baixa representação na biblioteca, o que torna difícil sua identificação por mono-híbrido. Para a identificação de um maior número de interações, recomenda-se testar até um milhão de clones por construção (*Current Protocols in Molecular Biology Online* 2003). O pequeno número de genes identificados no mono-híbrido pode ser explicado pelo menor número de clones testados durante o processo de triagem (cerca de 850.000).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, observou-se a ativação de GUS dirigida pelos fragmentos das regiões promotoras de *OsASR1* e *OsASR5* em resposta ao AI em células de protoplastos de arroz. A transativação de algumas dessas regiões promotoras (500 pb para *OsASR1* e 1000 pb para *OsASR5*) também foi observada, verificando a ativação de GUS dirigida por essas sequências na presença das proteínas ASR1 e ASR5. Além disso, outras sete proteínas possivelmente envolvidas na transcrição de *OsASR5* foram identificados pela metodologia de mono-híbrido em levedura.

A confirmação da interação DNA-proteína dos clones identificados ainda precisa ser realizada através da co-transformação da levedura Y187 com o plasmídeo pHis2.1proAsr5\_1-500pb e com o plasmídeo da biblioteca contendo o cDNA inteiro dos clones em fase de leitura com o domínio de ativação de GAL4. Outros genes repórteres também podem ser empregados para confirmar a interação, como o *LacZ* em ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Além disso, outros métodos para confirmar a interação de clones do mono-híbrido podem ser utilizados, como EMSA (*Electrophoretic Mobility-Shift Assay*), que verifica a ligação de uma proteína a uma sequência de DNA, assim como pode mapear o local de ligação na sequência. No entanto, o cDNA do clone precisa ser transcrito e traduzido *in vitro* para a realização desse ensaio. Até a própria transativação pode ser usada para comprovar uma interação, já que a proteína provavelmente estará na sua conformação correta e com as modificações pós-traducionais apropriadas. Entretanto, a interação só será evidenciada se o FT for um ativador da transcrição e não um repressor.

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se utilizar em mono-híbrido outras construções do promotor de *OsASR5*, inclusive fragmentos menores da região de 500-1000 pb, que teve um crescimento da levedura em elevadas concentrações de 3-AT, e até mesmo construções do promotor de *OsASR1*. Para tentar identificar fatores envolvidos com a resposta ao AI, também se planeja construir uma biblioteca de cDNAs de plantas de arroz tratadas com AI, um estresse abiótico que possibilitaria maior expressão de fatores de transcrição



reguladores dos genes *ASR* em resposta ao metal, e realizar a triagem de cDNAs nessa biblioteca com no mínimo um milhão de clones testados por construção.

A ligação entre as proteínas ASR1/ASR5 e suas regiões promotoras ainda poderia ser confirmada por ensaio EMSA, utilizando todo o fragmento no experimento de transativação ou apenas uma pequena região com os motivos GCCCA. Existem evidências de que ASR1 e ASR5 podem regular sua própria transcrição separadamente, contudo não se sabe se esses fatores podem atuar conjuntamente nessa regulação e na regulação da expressão de outros genes. Com essa questão a ser esclarecida, deseja-se testar a transativação das regiões promotoras (tanto dos genes *ASR* como do gene *STAR1*, um gene sabidamente regulado por esses fatores) com ambas as proteínas ASR1 e ASR5, para verificar se elas poderiam atuar sinergicamente na regulação da expressão gênica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson JG, Zhou NE e Hodges RS (1993) Structure, function and application of the coiled-coil protein folding motif. *Current Opinion in Biotechnology* 4:428–437.

Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA e Bar-Zvi D (1995) Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science* 110:205–213.

Arenhart RA (2008) Análise funcional dos genes ASR – *Abscisic acid, Stress and Ripening* – de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta ao estresse por alumínio. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, pp. 1–94.

Arenhart RA, Lima JC, Pedron M, Carvalho FEL, da Silveira JA, Rosa SB, Caverzan A, Andrade CMB, Schünemann M, Margis R e Margis-Pinheiro M (2013) Involvement of ASR genes in aluminum tolerance mechanisms in rice. *Plant, Cell and Environment* 36:52–67.

Arenhart RA, Bai Y, de Oliveira LFV, Bucker-Neto L, Schunemann M, Maraschin FS, Mariath J, Silverio A, Sachetto-Martins G, Margis R, Wang ZY e Margis-Pinheiro M (2014) New insights into Aluminum tolerance in rice: the ASR5 protein binds the *STAR1* promoter and other Aluminum-responsive genes. *Molecular Plant* 7(4):709–721.

Bai S, Willard B, Chapin LJ, Kinter MT, Francis D M, Stead AD e Jones ML (2010) Proteomic analysis of pollination-induced corolla senescence in petunia. *Journal of Experimental Botany* 61(4):1089–1109.

Barceló J e Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48:75–92.

Basu U, Good A e Taylor G (2001) Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminum induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum. *Plant, Cell and Environment* 24:1269–1278.

BD Matchmaker Library Construction & Screening Kits User Manual (2003) Protocolo #PT3529-1, Versão #PR32047, BD Biosciences Clontech, pp. 1–55.

Blancaflor EB, Jones DL e Gilroy S (1998) Alterations in the Cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology* 118:159–172.

Bossche RV, Demedts B, Vanderhaeghen R e Goossens A (2013) Transient Expression Assays in Tobacco Protoplasts. *Jasmonate Signaling: Methods and Protocols* (eds. A Goossens e L Pauwels) *Methods in Molecular Biology* 1011, pp. 227–239.

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443–448.

Bray EA, Bailey-Serres J e Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds. W Gruissem, BB Buchanan, RL Jones) *American Society of Plant Physiologists*, pp. 1158–1249.

Burkhard P, Stetefeld J e Strelkov SV (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *TRENDS in Cell Biology* 11(2):82–88.

Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S e Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15:2165–2180.

Cakmak I e Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83:463–468.

Canel C, Bailey-Serres JN e Roose ML (1995) Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiology* 108:1323–1324.

Chang S, Puryear JD, Dias MADL, Funkhouser EA, Newton RJ e Cairney J (1996) Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum* 97:139–148.

Chen SB, Tao LZ, Zeng LR, Vega-Sanchez ME, Umemura K e Wang GL (2006) A highly efficient transient protoplast system for analyzing defense gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology* 7:417–427.

Chung E, Cho CW, So HA, Kang JS, Chung YS e Lee JH (2013) Overexpression of *VrUBC1*, a Mung Bean E2 ubiquitin-conjugating enzyme, enhances osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* 8(6):e66056.

Cipressa F e Cenci G (2013) Effete, an E2 ubiquitin-conjugating enzyme with multiple roles in *Drosophila* development and chromatin organization. *Fly* 7(4):256–262.

Crapper DR, Krishnan SS e Dalton AJ (1973) Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180:511–513.

Crews ST e Pearson JC (2009) Transcriptional autoregulation in development. *Curr. Biol.* 19(6):R241–R246.

Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.) Yeast One-Hybrid Screening for DNA-Protein Interactions (2001) 12.12.1-12.12.22.

Current Protocols in Molecular Biology Online (John Wiley & Sons, Inc.) Yeast One-Hybrid Screening for DNA-Protein Interactions (2003)  
<http://www.geguchadze.com/PDF/protocols/CPonline/Doc/17824-17824.html>  
(acessado dia 6 de fevereiro de 2015).

Dai JR, Liu B, Feng DR, Liu HY, He YM, Qi KB, Wang HB e Wang JF (2011) *MpAsr* encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 30:1219–1230.

Davis AS, Davey MR, Clothier RC e Cocking EC (1992) Quantification and comparison of chloramphenicol acetyltransferase activity in transformed plant protoplasts using high-performance liquid chromatography- and radioisotope-based assays. *Analytical Biochemistry* 201:87–93.

Dóczi R, Kondrak M, Kovacs G, Beczner F e Banfalvi Z (2005) Conservation of the drought-inducible *DS2* genes and divergences from their *ASR* paralogues in *solanaceous* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:269–276.

Dong CJ, Wang Y, Yu SS e Liu JY (2010) Characterization of a novel rice metallothionein gene promoter: its tissue specificity and heavy metal responsiveness. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:914–924.

Driscoll CT (1985) Aluminum in acidic surface waters: Chemistry, transport, and effects. *Environmental Health Perspectives* 63:93–104.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil – Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz (2005), <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm> (acessado em 5 de fevereiro de 2015).

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Importância econômica e social do arroz (2012), <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe7457q102wx5eo07qw4xeynhsp7i.html> (acessado em 5 de fevereiro de 2015).

Eticha D, Stass A e Horst WJ (2005) Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany* 56:1351–1357.

Famoso AN, Clark RT, Shaff JE, Craft E, McCouch SR e Kochian LV (2010) Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiology* 153:1678–1691.

Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung CW e Wright MH (2011) Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and QTL mapping. *PLOS Genet.* 7:e1002221.

Fageria NK, Baligar VC e Writh RJ (1988) Aluminum toxicity in crop plants. *Journal of Plant Nutrition* 3:303–319.

Figueiredo DD, Barros PM, Cordeiro AM, Serra TS, Lourenço T, Chander S, Oliveira MM e Saibo NJM (2012) Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene *OsDREB1B*. *Journal of Experimental Botany* 63:3643–3656.

Finkelstein RR e Gibson S (2001) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* 5:26–32.

Flemetakis E, Agalou A, Kavroulakis N, Dimou M, Martsikovskaya A, Slater A, Spaink HP, Roussis A e Katinakis P (2002) *Lotus japonicus* gene *Ljsbp* is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian Selenium-binding proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(4):313–322.

Fomproix N e Percipalle P (2004) An actin–myosin complex on actively transcribing genes. *Experimental Cell Research* 294:140–148.

Food and Agriculture Organization (FAO) – FAOSTAT (2012) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (acessado em 27 de março de 2015).

Foy CD (1988) Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19:959–987.

Frankel N, Carrari F, Hasson E e Iusem ND (2006) Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene* 378:74–83.

Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem ND, Fernie AR e Carrari F (2007) *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Mol. Biol.* 63:719–730.

Fünfschilling U e Rospert S (1999) Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* 10(10):3289–3299.

George R, Beddoe T, Landl K e Lithgow T (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *PNAS* 95(5):2296–2301.

Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z e Bar-Zvi D (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant Physiol.* 143(2):617–628.

Grummt I (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development* 16:191–196.

Henry IM, Carpentier SC, Pampurova S, Hoylandt AV, Panis B, Swennen R e Remy S (2011) Structure and regulation of the *Asr* gene family in banana. *Planta* 234:785–798.

Hershko A e Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Ann. Rev. Biochem.* 67:425–479.

Hoekenga OA, Vision TJ, Shaff JE, Monforte AJ, Lee GP, Howell SH e Kochian LV (2003) Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiology* 132:936–948.

- Hong SH, Kim IJ, Yang DC e Chung WI (2002) Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *Journal of Experimental Botany* 53:2271–2272.
- Hsu YF, Yu SC, Yang CY, Wang CS (2011) Lily ASR protein-conferred cold and freezing resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 49:937–945.
- Hu GZ e Ronne H (1994) Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 22(14):2740–2743.
- Hu P, Wu S e Hernandez N (2004) A role for  $\beta$ -actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 18:3010–3015.
- Hu W, Huang C, Deng X, Zhou S, Chen L, Li Y, Wang C, Ma Z, Yuan Q e Wang Y (2013) *TaASR1*, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant, Cell and Environment* 36(8):1449–1464.
- Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y e Ma JF (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21:655–667.
- Huang JW, Shaff JE, Grunes DL e Kochian LV (1992) Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* 98:230–237.
- Huh SU, Kim KJ e Paek KH (2012) *Capsicum annuum* basic transcription factor 3 (*CaBtf3*) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon *Tobacco mosaic virus* infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417(2):910–917.
- Hussey SG, Mizrahi E, Creux NM e Myburg AA (2013) Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Frontiers in Plant Science* 29(4):325 doi: 10.3389/fpls.2013.00325.
- HybridZAP-2.1 XR Library Construction Kit and HybriZAP-2.1 XR cDNA Synthesis Kit (2010) Agilent Technologies, Inc. pp. 1–87.
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Indicadores IBGE – Estatística da Produção Agrícola (2014), <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/> (acessado em 5 de fevereiro de 2015).
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD e Scolnik PA (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiology* 102:1353–1354.

- Jefferson RA, Kavanagh TA e Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6:3901–3907.
- Jentsch S (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Ann. Rev. Genet.* 26:179–207.
- Jones DL e Kochian LV (1997) Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters* 400:51–57.
- Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV e Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ.* 29:1309–1318.
- Joo J, Lee YH, Kim YK, Nahm BH e Song SI (2013) Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities. *Molecules and Cells* 35:421–435.
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik P e Bar-Zvi D (2004b) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal* 381:373–378.
- Kalifa Y, Pearlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA e Bar-Zvi D (2004a) Overexpression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* 27:1459–1468.
- Karan R e Subudhi PK (2012) Overexpression of a nascent polypeptide associated complex gene (*SabNAC*) of *Spartina alterniflora* improves tolerance to salinity and drought in transgenic *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424(4):747–752.
- Kawano T, Kadono T, Fumoto K, Lapeyrie F, Kuse M, Isobe M, Furuichi T e Muto S (2004) Aluminum as a specific inhibitor of plant *TPC1* Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324:40–45.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D e Bonhert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13:889–905.
- Khan MSH, Tawaraya K, Sekimoto H, Koyama H, Kobayashi Y, Murayama T, Chuba M, Kambayashi M, Shiono Y, Uemura M, Ishikawa S e Wagatsuma T (2009) Relative abundance of D5-sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with aluminum tolerance of rice. *Physiologia Plantarum* 135:73–83.
- Kidd P, Llugany M, Poschenrieder C, Gunse B e Barceló J (2001) The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 52:1339–1352.

- Kim IS, Kim YS e Yoon HS (2012) Rice ASR1 protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells* 33:285–293.
- Kochian LV, Piñeros MA e Hoekenga OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274:175–195.
- Kochian LV, Piñeros MA, Liu J e Magalhaes JV (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop Aluminum resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:23.1–23.28.
- Konrad Z e Bar-Zvi D (2008) Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta* 227:1213–1219.
- Kulmburg P, Sequeval D, Lenouvel F, Mathieu M e Felenbok B (1992) Identification of the promoter region involved in the autoregulation of the transcriptional activator ALCR in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology* 12(5):1932–1939.
- Larsen PB, Geisler MJ, Jones CA, Williams KM e Cancel JD (2005) *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* 41:353–63.
- Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B e Zhu JK (2001) The *Arabidopsis HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning. *Genes & Development* 15:912–924.
- Li D e Roberts R (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:2085–2097.
- Li GX, Wu MS e He CY (2009) Gene expression response of transcription factor *OsBTF3* in rice to bacterial and fungal infection and signal molecule treatment revealed by quantitative real-time PCR analysis. *Acta Phytopathologia Sinica* 39(3):272–277.
- Li GX, Wu MS e He CY (2012a) Resistance to high salt and cold stress of transgenic rice seedlings with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3*. *Chinese Journal of Rice Science* 26(1):5–8.
- Li GX, Chen HM, Wu MS, e He CY (2012b) Functions of *OsBTF3* gene in regulation of photosynthesis, growth and development in rice. *Acta Agronomica Sinica* 38(5):904–908.
- Lupas A (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *TRENDS in Biochemical Sciences* 21:375–382.



Lupas AN e Gruber M (2005) The structure of  $\alpha$ -helical coiled coils. *Advances in Protein Chemistry* 70:37–78.

Ma JF (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology* 264:225–253.

Ma JF, Shen R, Zhao Z, Wissuwa M, Takeuchi Y, Ebitani T e Yano M (2002) Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait Loci for Al tolerance. *Plant & Cell Physiology* 43:652–659.

Ma JF, Shen RF, Nagao S e Tanimoto E (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology* 45:583–589.

Magalhaes JV, Liu J, Guimarães CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN e Kochian LV (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39:1156-1161.

Mahajan S e Tuteja N (2006) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139–158.

Maskin L, Gudesblat GE, Moreno JE, Carrari FO, Frankel N, Sambade A, Rossi MM e Iusem ND (2001) Differential expression of the members of *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Science* 161:739–746.

Maskin L, Maldonado S e Iusem ND (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Molecular Biology Reports* 35:501–505.

Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI e Treisman R (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113:329–342.

Moore G, Devos KM, Wang Z e Gale MD (1995) Grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 5:737–739.

Morita A, Horie H, Fujii Y, Takatsu S, Watanabe N, Yagi A e Yokota H (2004) Chemical forms of aluminum in xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Phytochemistry* 65:2775–2780.

Morita A, Yanagisawa O, Takatsu S, Maeda S e Hiradate S (2008) Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Phytochemistry* 69:147–153.

Nagata T, Hayatsu M e Kosuge N (1992) Identification of aluminum forms in tea leaves by  $^{27}\text{Al}$  NMR. *Phytochemistry* 31:1215–1218.

Nguyen BD, Brar DS, Bui BC, Nguyen TV, Pham LN e Nguyen HT (2003) Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:583–93.

Oshaben KM, Salari R, McCaslin DR, Chong LT e Horne WS (2012) The native GCN4 leucine-zipper domain does not uniquely specify a dimeric oligomerization state. *Biochemistry* 51(47):9581–9591.

Ow DW, de Wet JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV e Deluca M (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234:856–859.

Padmanabhan V, Dias D e Newton RJ (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology* 35:801–807.

Pasquali G, Ouwerkerk PBF e Memelink J (1994) Versatile transformation vectors to assay the promoter activity of DNA elements in plants. *Gene* 149:373–374.

Pederson T e Aebi U (2003) Actin in the nucleus: what form and what for? *Journal of Structural Biology* 140:3–9.

Peng S, Huang J, Sheehy JE, Laza RC, Visperas RM, Zhong X, Centeno GS, Khush GS e Cassman KG (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *PNAS* 101:9971–9975.

Philippe R, Courtois B, McNally KL, Mournet P, El-Malki R, Le Paslier MC, Fabre D, Billot C, Brunel D e Glaszmann JC (2010) Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* 121:769–787.

Piñeros MA, Shaff JE, Manslank HS, Alves VM e Kochian LV (2005) Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiology* 137:231–241.

Porat A, Sagiv Y e Elazar Z (2000) A 56-kDa Selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. *The Journal of Biological Chemistry* 275:14457–14465.

Poschenrieder C, Gunse B, Corrales I e Barceló J (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment* 400:356–368.

Pradet-Balade B, Boulmé F, Beug H, Müllner EW e Garcia-Sanz JA (2001) Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *TRENDS in Biochemical Sciences* 26(4):225–229.

Qi X, Zhang Y e Chai T (2007) Characterization of a novel plant promoter specifically induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring Heavy metal Responsiveness. *Plant Physiology* 143:50–59.

Reddy BA, Etkin LD e Freemont PS (1992) A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. *TRENDS in Biochemical Sciences* 17:344–345.

Ricardi MM, Guaimas FF, Gonzalez RM, Burrieza HP, Lopez-Fernandez MP, Jares-Erijman EA, Estevez JM e Iusem ND (2012) Nuclear import and

dimerization of tomato ASR1, a water stress-inducible protein exclusive to plants. *PLoS One* 7(8):e41008.

Ricardi MM, González RM, Zhong S, Domínguez PG, Duffy T, Turjanski PG, Salter JDS, Alleva K, Carrari F, Giovannoni JJ, Estévez JM e Iusem ND (2014) Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC Plant Biology* 14:29 doi: 10.1186/1471-2229-14-29.

Riccardi F, Gazeau D, De Vienne D e Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology* 117:1253–1263.

Rice Genome Annotation Project. Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen F, Malek RL, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J e Buell CR (2007) The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Research* 35:883–887.

Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Konrad Z, Karpasas MM, Goldgur Y e Bar-Zvi D (2006) Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic stress regulated plant specific protein. *Biochimie*. 88:621–628.

Rospert S, Dubaquié Y e Gautschi M (2002) Nascent-polypeptide-associated complex. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:1632–1639.

Rothofsky ML e Lin SL (1997) CROC-1 encodes a protein which mediates transcriptional activation from the human FOS promoter. *Gene* 195(2):141–149.

Ryan PR, Liu Q, Sperling P, Dong B, Franke S e Delhaize E (2007) A higher plant  $\Delta 8$  sphingolipid desaturase with a preference for (z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. *Plant Physiology* 144:1968–1977.

Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen MT, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloi M e Atanassova R (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Letters* 582:3281–3287.

Schneider A, Salamini F, Gebhardt C (1997) Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. *Plant Physiol.* 133:335–345.

Schwechheimer C, Corke FMK, Smith CH e Bevan M (2000) Transactivation of a target gene through feedforward loop activation in plants. *Funct. Integr. Genomics* 1:35–43.

Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H e Galbraith DW (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8(5):777–784.

Shen G, Pang Y, Wu W, Deng Z, Liu X, Lin J, Zhao L, Sun X e Tang K (2005) Molecular cloning, characterization and expression of a novel *Asr* gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:836–843.

Shimamoto K e Kyojuka J (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology* 53:399–419.

Silhavy D, Hutvagner G, Barta E e Banfalvi Z (1995) Isolation and characterization of a water-stress inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology* 27:587–595.

Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D e Matsumoto H (2000) Aluminum-induced 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology* 124:991–1005.

Sivaguru M, Yamamoto Y, Rengel Z, Ahn SJ e Matsumoto H (2005) Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytologist* 165:99–109.

Smith WH (1990) Air Pollution and Forests. *Interaction Between Air Contaminants and Forest Ecosystems*, Ed. 2. Springer, New York.

Smith SS, Kelly KH e Jockusch BM (1979) Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 86:161–166.

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K e Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *TRENDS in Biochemical Sciences* 24:181–185.

Soncini FC, Vescovi EG e Groisman EA (1995) Transcriptional Autoregulation of the *Salmonella typhimurium* *phoPQ* Operon. *Journal of Bacteriology* 177(15):4364–4371.

Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, Sugiyama T e Sakakibara H (2002) Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant and Cell Physiology* 43:350–354.

Tahara K, Hashida K, Otsuka Y, Ohara S, Kojima K e Shinohara K (2014) Identification of a hydrolysable tannin, oenothetin B, as an aluminum-detoxifying ligand in a highly aluminum-resistant tree, *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Physiol.* 164:683–93.

Tao LZ, Cheung AY e Wu HM (2002) Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* 14:2745–2760.

Tabaldi LA, Cargnelutti D, Gonçalves JF, Pereira LB, Castro GY, Maldaner J, Rauber R, Rossato LV, Bisognin DA, Schetinger MRC e Nicoloso FT (2009) Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere* 76:1402–1409.

Teeri TH, Lehv slaiho H, Franck M, Uotila J, Heino P, Palva ET, Van Montagu M, Herrera-Estrella L (1989) Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* 8:343–350.

Timchenko N, Wilson DR, Taylor LR, Abdelsayed S, WILDE M, Sawadogo M e Darlington JG (1995) Autoregulation of the human C/EBP $\alpha$  gene by stimulation of

- upstream stimulatory factor binding. *Molecular and Cellular Biology* 15(3):1192–1202.
- Tsuda K, Ito Y, Sato Y e Kurata N (2011) Positive autoregulation of a *KNOX* gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice. *The Plant Cell* 23:4368–4381.
- Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schunmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM e Wang MB (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of australian rice cultivars jarrah and amaroo using modified promoters and selectable markers. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:201–210.
- Vaidyanathan R, Kuruvila S e Thomas G (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science* 140:25–36.
- van Berkel J, Salamini F e Gebhardt C (1994) Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiology* 104:445–452.
- van Breemen N (1985) Acidification and decline of Central European forests. *Nature* 315:16–23.
- Vartiainen MK (2008) Nuclear actin dynamics – From form to function. *FEBS Letters* 582:2033–2040.
- Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B e Treisman R (2007) Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316:1749–1752.
- Vidal M e Legrain P (1999) Yeast forward and reverse ‘n’-hybrid systems. *Nucleic Acids Research* 27(4):919–929.
- Vinson CR e Garcia KC (1992) Molecular model for DNA recognition by the family of basic-helix-loop-helix-zipper proteins. *New Biol.* 4:396–403.
- von Uexkull HR e Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171:1–15.
- Wagatsuma T, Ishikawa S, Obata H, Tawaraya K e Katohda S (1995) Plasma-membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminum toxicity in roots source. *Plant Soil* 171:105–112.
- Wang CS, Liao YE, Huang JC, Wu TD, Su CC e Lin CH (1998) Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant and Cell Physiology* 39:1307–1314.
- Wang H, Miyazaki S, Kawai K, Deyholos M, Galbraith DW e Bonhert HJ (2003a) Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology* 52:873–891.

- Wang HJ, Hsu CM, Guang YJ e Wang CS (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiology of Plants* 123:314–320.
- Wang JT, Gould JH, Padmanabhan V e Newton RJ (2003b) Analysis and localization of the water-deficit stress-induced gene (*lp3*). *Journal of Plant Growth Regulation* 21:469–478.
- Wang W, Xu M, Wang Y e Jamil M (2014) Basal Transcription Factor 3 plays an important role in seed germination and seedling growth of rice. *BioMed Research International* 2014:465739 doi: 10.1155/2014/465739.
- Wang Y, Zhang X, Lu S, Wang M, Wang L, Wang W, Cao F, Chen H, Wang J, Zhang J e Tu J (2012) Inhibition of a basal transcription factor 3-like gene *Osj10gBTF3* in rice results in significant plant miniaturization and typical pollen abortion. *Plant and Cell Physiology* 53(12):2073–2089.
- Wolt JD (1994) Soil Solution Chemistry: Applications to Environmental Science and Agriculture. Ed. 1. John Wiley & Sons, New York.
- Woolfson D, Bartlett GJ, Bruning M e Thomson AR (2012) New currency for old rope: from coiled-coil assemblies to  $\alpha$ -helical barrels. *Current Opinion in Structural Biology* 22:432–441.
- Wu FH, Shen SC, Lee LY, Lee SH, Chan MT e Lin CS (2009) Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* 5:16 doi: 10.1186/1746-4811-5-16.
- Xia J, Yamaji N, Kasai T e Ma JF (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *PNAS* 107:18381–18385.
- Xia J, Yamaji N, Che J, Shen RF e Ma JF (2014) Differential expression of *Nrat1* is responsible for Al-tolerance QTL on chromosome 2 in rice. *J. Exp. Bot.* 65:4297–4304.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y e Matsumoto H (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* 125:199–208.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S e Matsumoto H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* 128:63–72.
- Yang CY, Chen YC, Jauh GY e Wang CS (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139:836–846.
- Yang Q, Wang Y, Zhang J, Shi W, Qian C e Peng X (2007) Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics* 7:737–749.

Yang JL, Li YY, Zhang YJ, Zhang SS, Wu YR, Wu P e Zheng SJ (2008) Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146:602–611.

Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C e Li GX (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155:1885–1892.

Yokel RA (2000) The toxicology of aluminum in the brain: A review. *Neurotoxicology* 21:813–828.

Zhang L, Hu W, Wang Y, Feng R, Zhang Y, Liu J, Jia C, Miao H, Zhang J, Xu B e Jin Z (2014) The *MaASR* gene as a crucial component in multiple drought stress response pathways in *Arabidopsis*. *Funct. Integr. Genomics* doi: 10.1007/s10142-014-0415-y.

## ANEXOS

### ANEXO I – Sequências de oligonucleotídeos utilizados

**Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados na obtenção de vetores de transformação de protoplastos (pGusXX).

Oligonucleotídeo	F/R	Sequência*
500ASR5_BamHI	F	5'- GGATCCagatggccatttccttca -3'
500ASR5_PstI	R	5'- CTGCAGaagctagtgtatgacaattagg -3'
1000ASR5_BamHI	F	5'- GGATCCatggtttcaaagggctgta -3'
1000ASR5_PstI	R	5'- CTGCAGaagctagtgtatgacaattagg -3'
1500ASR5_BamHI	F	5'- GGATCCcccatgcaggttatcttc -3'
1500ASR5_PstI	R	5'- CTGCAGaagctagtgtatgacaattagg -3'
2000ASR5_BamHI	F	5'- GGATCCcatacttgcaatccttctt -3'
2000ASR5_PstI	R	5'- CTGCAGaagctagtgtatgacaattagg -3'
500ASR1_BamHI	F	5'- GGATCCtctgaataatcatgccagt -3'
500ASR1_PstI	R	5'- CTGCAGtagcttccttcagacagagtt -3'
1000ASR1_BamHI	F	5'- GGATCCaggcactcgaatttgcta -3'
1000ASR1_PstI_R	R	5'- CTGCAGtagcttccttcagacagagtt -3'
1500ASR1_BamHI	F	5'- GGATCCtactccctccgtcccaaat -3'
1500ASR1_PstI	R	5'- CTGCAGtagcttccttcagacagagtt -3'
2000ASR1_BamHI	F	5'- GGATCCatcaataaagggaaga -3'
2000ASR1_PstI	R	5'- CTGCAGtagcttccttcagacagagtt -3'

\*Sequência dos sítios de restrição representada em letras maiúsculas e sequência de anelamento do oligonucleotídeo em letras minúsculas.



**Tabela 2.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados na obtenção de vetores de transformação de levedura (pHIS2.1).

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>F/R</b>	<b>Sequência*</b>
<b>1-500ASR5_SacI</b>	F	5'- GAGCTCagatggccatttccttca -3'
<b>1-500ASR5_SpeI</b>	R	5'- ACTAGTaagctagtgatgacaattagg -3'
<b>500-1000ASR5_SacI</b>	F	5'- GAGCTCatggtttcaaagggctgta -3'
<b>500-1000ASR5_SpeI</b>	R	5'- ACTAGTatggccatctgcattatt -3'
<b>1000-1500ASR5_SacI</b>	F	5'- GAGCTCcccatgcaggttatcttc -3'
<b>1000-1500ASR5_SpeI</b>	R	5'- ACTAGTaaccatggattgaaaactt -3'
<b>1500-2000ASR5_EcoRI</b>	F	5'- GAATTCcatacttgcaatatccttctt -3'
<b>1500-2000ASR5_SacI</b>	R	5'- GAGCTCctgcatggggttagatagttt -3'

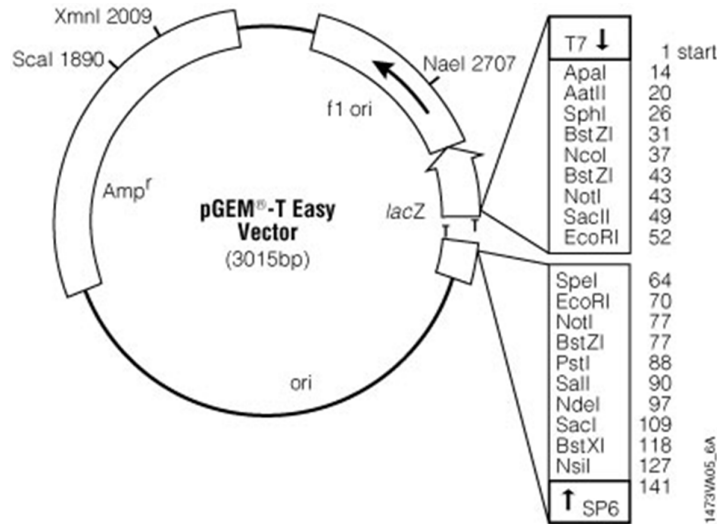
\*Sequência dos sítios de restrição representada em letras maiúsculas e sequência de anelamento do oligonucleotídeo em letras minúsculas.

**Tabela 3.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento de cDNAs da biblioteca (HybridZAP-2.1 XR).

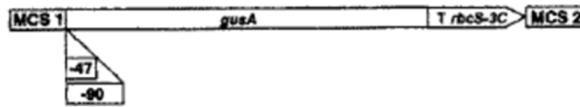
<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>F/R</b>	<b>Sequência</b>
<b>5'AD</b>	F	5'- AGGGATGTTTAATACCACTAC -3'
<b>3'AD</b>	R	5'- GCACAGTTGAAGTGAACCTTGC -3'

## ANEXO II – Mapas de vetores utilizados

### pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega)



### pGusXX e pGusSH (Pasquali et al. 1994)



#### GusSH

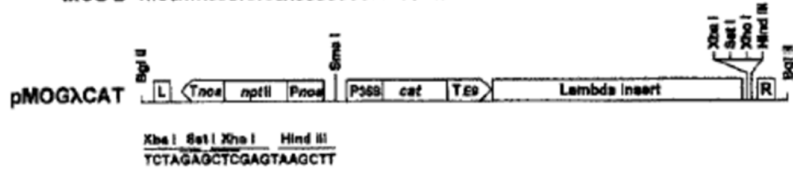
MCS 1 Set I Sec II Eag I Xba I Spe I Bam HI Sma I Pst I Sal I Neo I  
GAGCTCGACCGCGGTGGCGCCGCTCTAGAAGTGTGGATCCCGCGGCTGCAGGTCGACCATGG

MCS 2 Cla I' Hind III Cla I' Xho I Kpn I  
ATCGATACCGTCATCAAGCTTATCGATACCGTCTCGAGGGGGGCGCCGTTACC

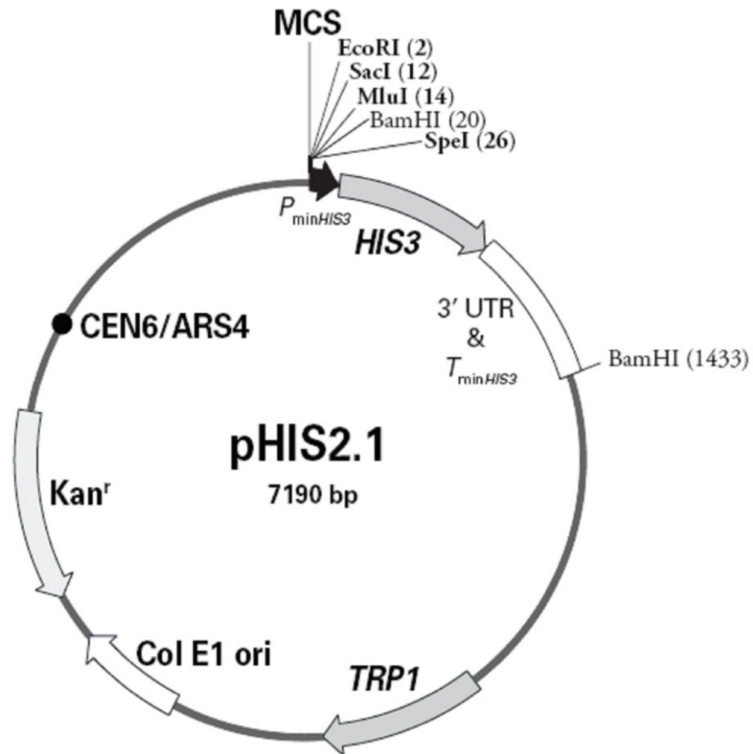
#### GusXX

MCS 1 Set I Sec II Eag I Xba I Spe I Bam HI Sma I Pst I Eco RI Eco RV'  
GAGCTCCACCGCGGTGGCGCCGCTCTAGAAGTGTGGATCCCGCGGCTGCAGGAATTCGATATC  
Hind III Cla I' Sal I Nco I  
AAGCTTATCGATACCGTCGACCATGG

MCS 2 Cla I' Xho I Kpn I  
ATCGATACCGTCTCGAGGGGGGCGCCGTTACC



### pHIS2.1 (Clontech)



### pAD-GAL4-2.1 (Agilent Technologies)

