

# Caracterização funcional da proteína ASR5 de arroz em *Arabidopsis thaliana* e suas interações em estresses abióticos

Kaira Thalia da Rosa Nunes; Márcia Pinheiro Margis

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Introdução

Um fator limitante para o crescimento das plantas é a constante ocorrência de condições ambientais rigorosas e estressantes. Estresses ambientais como seca, contaminação por metais pesados, excesso de sal no solo, variações de temperatura e iluminação, assim como ataques de patógenos e herbívoros, trazem grandes problemas para a o desenvolvimento da agricultura em todo o mundo. O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais consumidos no planeta, e devido a isso, a otimização de seu cultivo torna-se um importante alvo de pesquisas na atualidade.

Os genes que codificam as proteínas ASR (do inglês, *Abscisic acid, Stress and Ripening*) são fatores de transcrição regulados ao longo do desenvolvimento das plantas, bem como durante a exposição a variados estresses de natureza abiótica. Sabe-se atualmente que o arroz é a planta cultivada de maior tolerância ao alumínio (Al) e que esta característica é intrinsecamente relacionada à ação das proteínas do tipo ASR. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o silenciamento dos genes que compõem a família ASR de arroz acarreta em forte inibição do desenvolvimento da raiz sob altas concentrações de alumínio (Arenhart *et al.*, 2013). Além disso, esse trabalho também evidenciou que a redução da expressão de uma isoforma específica desta família gênica, intitulada OsASR5, afeta plantas de arroz aumentando sua sensibilidade não apenas ao alumínio como também a diferentes estresses abióticos. Assim, especula-se que a superexpressão de OsASR5 possa conferir tolerância ao alumínio e a outros estresses em arroz e em diferentes espécies vegetais, hipótese que permanece por ser avaliada.

Dados prévios do nosso grupo também sugerem possível interação de OsASR5 com OsART1 (outro fator de transcrição envolvido nas respostas a alumínio) (Arenhart *et al.*, 2014), mas em ensaio de *Yeast Two-Hybrid*, OsASR5 não foi capaz de formar dímeros com OsART1 na presença e ausência de Al. Para validar as hipóteses até então apresentadas, o objetivo do presente trabalho é caracterizar molecularmente a interação entre OsASR5 e outros fatores envolvidos na modulação da resposta ao estresse por alumínio.

## Materiais e métodos

Sete linhagens independentes da planta modelo *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene de arroz OsASR5 foram obtidas, o RNA de plântulas de 15 dias foi extraído e foi realizado RT-qPCR. A expressão de um gene de resposta ao alumínio de *A. thaliana* (*AtALMT1*) foi quantificada em plântulas transgênicas e não-transformadas. Para o ensaio de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) entre OsASR5 com OsART1, os genes de interesse foram clonados em vetores que permitem a expressão desses genes em fusão com parte da proteína de fluorescência YFP em posições amino (N) ou carbóxi (C)-terminal. Na ocorrência da interação entre as proteínas de interesse, a proteína YFP é reconstituída e a fluorescência é detectada. Para isso, seis combinações de orientações distintas de YFP e os genes de interesse foram construídas. Os plasmídeos resultantes foram multiplicados em cultura líquida de *Escherichia coli* e após extraídos para servirem de material para a transformação de protoplastos de *A. thaliana*. Os protoplastos transformados foram observados por microscopia confocal (excitação: 513 nm; emissão: 527 nm).

## Resultados e discussão

Análises preliminares mostraram que em condições de cultivo normais ocorrem alterações na expressão de genes de resposta ao alumínio em plantas de *A. thaliana* transformadas com OsASR5. Três, das sete linhagens avaliadas, mostraram redução estatística na expressão do gene *AtALMT1*, mas novas análises serão conduzidas para dar maior consistência aos resultados.

Para testar a hipótese da interação entre OsASR5 e OsART1 foi realizado o ensaio de BiFC. Das seis combinações construídas, apenas duas foram capazes de reconstituir YFP (Figura 1). Nesse ensaio, foi possível verificar que os fatores interagem fisicamente *in vivo* (Figura 2). Este resultado permitiu darmos um novo passo no entendimento das vias de sinalização envolvidas na resposta ao alumínio e possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias visando a obtenção de plantas mais tolerantes a este metal.

## Perspectivas

Após dar continuidade à análise da influência de OsASR5 na expressão de genes de resposta ao estresse abiótico por alumínio para obter resultados mais consistentes, pretendemos avaliar também o papel de OsASR5 no estabelecimento do fenótipo de plantas de *A. thaliana* superexpressando o fator de transcrição quando expostas ao estresse por alumínio.



Figura 1. Modelo esquemático das construções de OsASR5 e OsART1 utilizadas para o ensaio de BiFC, designadas 1 e 2, respectivamente, para os demais resultados.

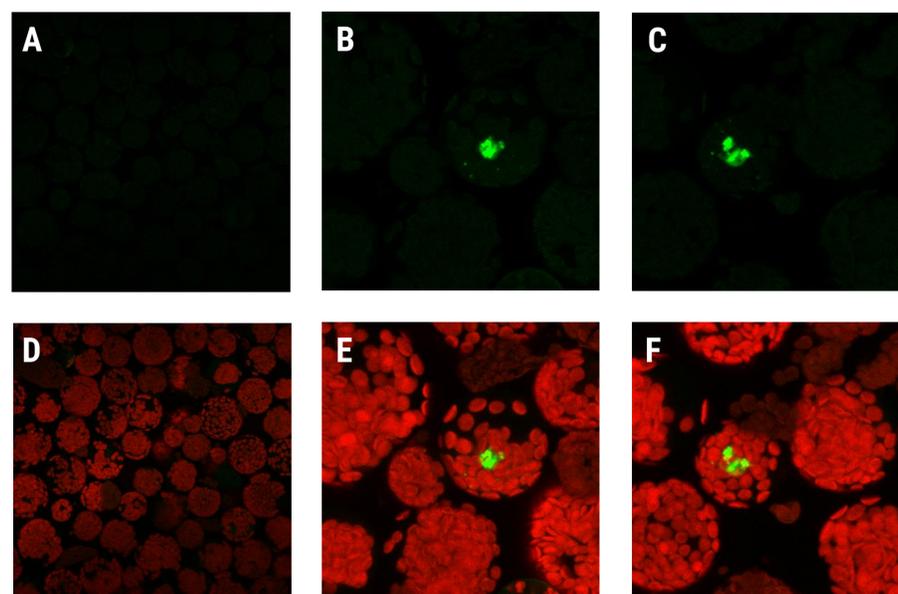


Figura 2. Interação *in vivo* entre OsASR5 e OsART1. Superior: fluorescência de YFP. Inferior: sobreposição da fluorescência de YFP com a autofluorescência da clorofila. A e D, controle (não transformado). B e E, interação na orientação 1. C e F, interação na orientação 2. Imagens obtidas por microscopia confocal.

### Referências:

ARENHART, R. A. et al. New insights into aluminum tolerance in rice: the ASR5 protein binds the STAR1 promoter and other aluminum-responsive genes. *Mol Plant*, v. 7, n. 4, p. 709-21, Apr 2014. ISSN 1752-9867.

ARENHART, R. A. et al. Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. *Plant Cell Environ*, v. 36, n. 1, p. 52-67, Jan 2013. ISSN 1365-3040.

### Agradecimentos: