

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Análise dos promotores dos genes *ASR (ABA, Stress, Ripening)* de
arroz (*Oryza sativa* L.)**

Mariana Schünemann

Orientadora: Profa. Dra. Márcia M. A. N. Pinheiro Margis
Co-orientador: Dr. Rafael Augusto Arenhart

Porto Alegre
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Análise dos promotores dos genes *ASR (ABA, Stress, Ripening)* de
arroz (*Oryza sativa* L.)**

Mariana Schünemann

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de atuação: Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Márcia M. A. N. Pinheiro
Margis
Co-orientador: Dr. Rafael Augusto Arenhart

Porto Alegre
2012

Agradecimentos

Aos meus pais e minha irmã por me apoiarem durante toda a minha graduação e sempre acharem o máximo o meu trabalho, mesmo não entendendo direito o que faço.

À Profa. Dra. Márcia Margis por todos os conselhos, orientação, atenção, esforço e dedicação durante todos os meus quase 3 anos de estágio.

Ao Rafael Augusto Arenhart e à Andréia Caverzan por toda a ajuda, sabedoria, paciência e todos os ensinamentos.

À Patrícia Renck Nunes, à Priscilla Ambrosi e ao Wagner de Paula Nunes por me darem energia, equilíbrio, entusiasmo, por amadurecerem comigo e me ajudarem a ser uma pessoa melhor.

Aos meus colegas de laboratório pelas conversas, piadas, discussões, críticas e por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido e animado.

A todos que contribuíram de alguma forma e, mesmo sem saber, para a realização deste trabalho e para a minha formação.

Índice

Lista de Abreviaturas	5
Resumo	6
Introdução	7
Arroz (<i>Oryza sativa</i>) como modelo de estudo	7
Genes <i>ASR</i> (<i>ABA</i> , <i>Stress</i> , <i>Ripening</i>)	8
Artigo Científico	11
Resumo	12
Introdução	13
Materiais e Métodos	15
Resultados	18
Discussão	20
Referências	25
Tabelas	32
Legendas das Figuras	32
Figuras	34
Conclusões e Perspectivas	40
Bibliografia.....	41
Anexos.....	43

Lista de Abreviaturas

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4-MUG – 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo
ABA – ácido abscísico
Al³⁺ – íon trivalente alumínio
ANA – ácido naftalenoacético
ASR – do inglês, *Abscisic acid, Stress, Ripening*
BAP – 6-benzilaminopurina
°C – graus Celsius
Ca²⁺ – íon bivalente cálcio
CBR – células da borda da raiz
DNA – ácido desoxirribonucléico
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ERO – espécie(s) reativa(s) de oxigênio
ESTs – do inglês, *Expressed Sequence Tags*
GA – giberelina
GFP – do inglês, *Green Fluorescent Protein*
GUS – β -glicuronidase
h – hora(s)
kb – quilobase(s)
L – litro(s)
M – molar
Mb – megabase(s)
mg – miligrama(s)
mL – mililitro(s)
mM – milimolar
mmHg – milímetros de mercúrio (unidade de pressão)
mRNA – RNA mensageiro
MS – meio de Murashige e Skoog (meio de cultura universal para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais)
NB – do inglês, *Nutrient Broth*
Os – *Oryza sativa*, arroz
OsASR – *Abscisic acid, Stress, Ripening* de *Oryza sativa*
pH – potencial hidrogeniônico
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – RNA de interferência
RT-qPCR – reação em cadeia da DNA-polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa, do inglês *Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction*
 μ M – micromolar
X-gluc – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicuronídeo

Resumo

Os genes *ASR* (*ABA*, *Stress*, *Ripening*) de arroz (*Oryza sativa*) constituem uma família gênica de 6 membros (*OsASR1* - *OsASR6*). Em várias espécies, a expressão desses genes é induzida por diversos estresses abióticos (como seca, salinidade, frio, lesão mecânica e toxidez por alumínio), demonstrando um provável envolvimento dos mesmos nos mecanismos de tolerância a esses estresses, que chegam a reduzir a produtividade da colheita de grãos em até 50%. Portanto, faz-se necessário um estudo da função desses genes para uma melhor compreensão dos mecanismos de tolerância, sendo o arroz um excelente modelo de estudo entre as monocotiledôneas. Neste trabalho, realizaram-se análises *in silico* das regiões promotoras dos genes *OsASR*, encontrando-se diversos *cis*-elementos responsivos a estresses ambientais. O padrão de expressão tecidual *in vivo* de *OsASR5* ao longo do desenvolvimento das plantas foi também estudado em arroz transgênico expressando o gene repórter da β -glicuronidase (GUS) regulado pelo promotor de *OsASR5*. Detectou-se atividade de GUS em tecidos que sofreram dano mecânico, em espiguetas (nos tricomas da epiderme, anteras e estigmas), na coifa da raiz (principalmente em células que se desprendem da sua borda), no cilindro central da raiz (no floema), algumas partes do córtex, mas não na epiderme da raiz. Esses resultados sugerem uma participação dos genes *OsASR* em respostas a vários estresses, especialmente o gene *OsASR5* na toxidez por alumínio, na lesão mecânica por ferimento e até mesmo no estresse por seca.

Palavras-chave: família gênica *ASR*, estresses ambientais, promotor, *cis*-elementos, β -glicuronidase, *Oryza sativa*, alumínio.

Introdução

Arroz (*Oryza sativa*) como modelo de estudo

O arroz (*Oryza sativa*) é considerado a planta modelo de estudo para as monocotiledôneas, sendo um organismo diploide com 12 pares de cromossomos e genoma de 390 Mb, o menor entre os cereais, com base em uma anotação apurada do genoma de *Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare (*Rice Genome Annotation Project*, 2007). Dentre as várias características que fazem do arroz um modelo para estudos fisiológicos, genéticos e evolutivos entre as plantas (Shimamoto & Kyojuka, 2002), incluem-se seu genoma totalmente sequenciado, que possui sintenia com o genoma de outros cereais como milho e trigo (Moore *et al.* 1995), a disponibilidade de etiquetas de genes expressos ou ESTs (do inglês, *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* (Hiei *et al.* 1994).

Dentre as gramíneas cultivadas, 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 590 milhões de toneladas. Esse cereal é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, tendo um ótimo balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína necessária à dieta humana (EMBRAPA, 2005).

O Brasil apresenta uma produção anual de cerca de 11,5 milhões de toneladas (11.589.424 toneladas de arroz em casca – estimativa do IBGE para safra de 2012), sendo o Rio Grande do Sul responsável por 65% dessa produção (IBGE, 2012). Entretanto, 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 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), o que acarreta prejuízos consideráveis à economia e à sociedade brasileira. O alumínio (Al) inclusive é um grande problema para a produção agrícola, pois constitui aproximadamente 7 % da crosta terrestre (Wolt 1994) e apresenta toxicidade em condições ácidas, que são

encontradas em cerca de metade das terras cultiváveis do mundo (Fageria *et al.* 1988; von Uexkull & Mutert 1995).

Considerando, então, a importância social e econômica do arroz e os efeitos extremamente danosos dos estresses ambientais sobre a agricultura, faz-se necessário o estudo de genes envolvidos em respostas vegetais a esses estresses para um melhor entendimento dos mecanismos de tolerância.

Genes *ASR* (*ABA*, *Stress*, *Ripening*)

Os genes *ASR* (do inglês, *Abscisic acid*, *Stress*, *Ripening*) foram primeiramente identificados em tomate (*Lycopersicon esculentum*, Iusem *et al.* 1993) e, em seguida, descritos 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) e *Gingko biloba* (Shen *et al.* 2005), sendo encontrados em diversas espécies vegetais, estando, no entanto, ausentes em *Arabidopsis thaliana* (Frankel *et al.* 2006). Em arroz, análises *in silico* revelaram 6 cópias do gene *ASR* (*OsASR1* – *OsASR6*), distribuídas em diferentes cromossomos, sendo todas confirmadas por ESTs (Frankel *et al.* 2006), constituindo uma família gênica.

Em plantas, a expressão dos genes *ASR* é induzida por ácido abscísico (Amitai-Zeigerson *et al.* 1995; Vaidyanathan *et al.* 1999; Finkelstein & Gibson 2001), em flores (Dóczi *et al.* 2005), durante a polinização (Wang *et al.* 1998) e durante o amadurecimento de frutos (Rossi *et al.* 1996; Maskin *et al.* 2001; Hong *et al.* 2002; Cakir *et al.* 2003; Dóczi *et al.* 2005). Seus níveis de transcritos também são rapidamente aumentados por estresses como salinidade, seca, frio e lesão mecânica em várias espécies (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 H. *et al.* 2003; Henry *et al.* 2011). No entanto seus padrões de expressão variam entre diferentes tecidos e fases de desenvolvimento (Padmanabhan *et al.* 1997).

Utilizando uma abordagem proteômica, 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.* 2012), utilizando RT-qPCR (PCR quantitativa), foi relatado um aumento nos níveis de transcritos dos genes *ASR* em raízes de arroz em resposta ao Al. O arroz é um dos cereais mais tolerantes ao Al (Foy 1988; Famoso *et al.* 2010), no entanto, existe variabilidade genotípica entre suas cultivares, sendo interessante ressaltar que a indução na expressão ocorreu em cultivar de arroz considerada tolerante ao Al (cultivar Nipponbare), mas não em cultivar sensível ao Al (cultivar Taim), sugerindo um papel dos genes *ASR* no mecanismo de resistência ao Al. Nesse mesmo trabalho (Arenhart *et al.* 2012), foi observada uma maior sensibilidade ao Al e à seca em plantas de arroz transgênicas silenciadas por RNA de interferência (RNAi) para o gene *OsASR5*.

A superexpressão de genes *ASR* tem demonstrado potencial para aumentar a tolerância de plantas aos estresses abióticos. O gene *ASR1* de tomate quando superexpresso em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) aumentou a tolerância destas plantas à salinidade (Kalifa *et al.* 2004a). A superexpressão do ortólogo de *ASR* de lírio (*LLA23*) em plantas de *Arabidopsis thaliana* também melhorou a tolerância da planta à seca e à salinidade (Yang *et al.* 2005).

As proteínas ASR de diversas espécies vegetais são localizadas no núcleo onde podem se ligar a sequências de DNA e regulam promotores específicos (Rossi *et al.* 1996; Cakir *et al.* 2003; Wang J.T. *et al.* 2003; Kalifa *et al.* 2004b; Wang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005; Arenhart *et al.* 2012). Esses estudos sugerem que essas proteínas sejam fatores de transcrição cujos prováveis alvos sejam transportadores de hexose e genes responsivos ao ácido abscísico (ABA).

Sabe-se que o ácido abscísico e açúcares agem de uma maneira conjunta durante o desenvolvimento das plantas, tendo efeitos similares e antagônicos em diversos processos (Finkelstein & Gibson 2001). ABA é um hormônio vegetal envolvido na regulação do amadurecimento do fruto e em condições de déficit de água (Rossi *et al.* 1996). Ele atua em sementes impedindo a germinação precoce de embriões e em estômatos provocando seu fechamento em condições de seca, reduzindo a perda de água (Yang *et al.* 2005; Mahajan & Tuteja 2006). Além da resposta à seca, o hormônio

também responde a outros estresses ambientais como salinidade e frio (Leung & Giraudat 1998; Finkelstein *et al.* 2002), enquanto açúcares estão envolvidos na modulação da integração de sinais endógenos e ambientais que determinam o crescimento e desenvolvimento de plantas (Finkelstein & Gibson 2001; Saumonneau *et al.* 2012).

Considerando o envolvimento dos genes *ASR* em diversos tipos de estresses ambientais torna-se importante o estudo da função desses genes para um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência desencadeados durante a resposta dos genes *ASR*. Pesquisar o padrão de expressão de um gene é fundamental para a compreensão da sua função, podendo esse estudo ser realizado de diferentes maneiras em nível de mRNA (por exemplo via RT-qPCR), em nível de proteína (por exemplo por gel de eletroforese bidimensional) ou em nível de promotor, entre outras formas. O estudo do promotor pode ser realizado por análises *in silico* de seus *cis*-elementos, que são motivos de DNA nos quais se ligam fatores de transcrição específicos que irão regular a expressão do gene. Também se pode analisar o padrão de expressão em plantas transformadas com genes repórteres como *GFP* (*Green Fluorescent Protein*), luciferase, GUS (β -glicuronidase) sob o controle do promotor de interesse, em diferentes tecidos, em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes condições.

Neste trabalho foram realizadas análises *in silico* dos promotores dos genes *ASR* para a identificação de *cis*-elementos nas suas sequências de DNA que regulam a transcrição e estão potencialmente envolvidos na resposta a estresses. O promotor do gene *OsASR5* também foi estudado através de análises *in vivo* com plantas transgênicas de arroz da cultivar Nipponbare transformadas com um vetor contendo o gene repórter GUS em fusão transcricional com esse promotor, para identificar os diferentes tecidos e fases de desenvolvimento da planta em que o promotor é ativado, assim como sua resposta ao tratamento com Al.

Artigo Científico

O presente trabalho será apresentado nas normas da revista *Plant, Cell and Environment* conforme se encontram no seguinte site:
http://www.blackwellpublishing.com/pdf/PCE_Author_Guidelines.pdf.

Título: Análise dos promotores da família gênica *ASR* de arroz

Autores: Mariana Schünemann¹, Rafael Augusto Arenhart¹, Adriano Silvério², Jorge Mariath², Márcia Margis-Pinheiro^{1*}

Instituições:

¹ Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Genética do Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

² Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

*Autor correspondente:

Dra. Márcia Margis-Pinheiro

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Departamento de Genética do Instituto de Biociências, prédio 43312, sala 207, CEP: 91591-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 (51) 3308-9814; e-mail: marcia.margis@ufrgs.br

Resumo

A toxidez por alumínio (Al) inibe o crescimento de raízes e, conseqüentemente, a absorção de água e nutrientes, reduzindo o crescimento das plantas e a produtividade de grãos. Isso representa um grande problema na produção agrícola, já que solos ácidos ocorrem em praticamente metade das terras cultiváveis no mundo. No entanto, algumas espécies de plantas possuem mecanismos de desintoxicação de Al, como exclusão externa e tolerância interna. O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais tolerantes ao Al, sendo um ótimo modelo para estudo de mecanismos de resistência. Em várias espécies, os genes *ASR* (*ABA*, *Stress*, *Ripening*) são induzidos por diversos estresses, como seca, salinidade, frio, lesão mecânica e toxidez por Al, estando provavelmente envolvidos nos mecanismos de tolerância a esses estresses. Para uma melhor compreensão de sua função e de sua participação em mecanismos de tolerância ao Al, estudou-se o padrão de expressão tecidual de *OsASR5* em plantas de arroz transformadas com o gene repórter da β -glicuronidase (GUS) regulado pelo promotor desse gene. Detectou-se atividade de GUS em tecidos que sofreram dano mecânico, em espiguetas (nos tricomas da epiderme, anteras e estigmas), na coifa da raiz (principalmente em células que se desprendem da sua borda), no cilindro central da raiz (no floema), algumas partes do córtex, mas não na epiderme da raiz. Também foram identificados através de análises *in silico* vários *cis*-elementos responsivos a estresses nos promotores da família gênica *ASR* de arroz. Esses resultados sugerem uma participação dos genes *OsASR* em respostas a vários estresses, especialmente o gene *OsASR5* na toxidez por Al, na lesão mecânica por ferimento e até mesmo no estresse por seca.

Palavras-chave: família gênica *ASR*, estresses ambientais, promotor, *cis*-elementos, β -glicuronidase, *Oryza sativa*, alumínio.

Introdução

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 Al^{3+} , que é tóxico para todas as células vivas mesmo em baixas concentrações (Crapper *et al.* 1973; Driscoll 1985; Yokel 2000). Embora o mecanismo exato de toxidez por Al ainda não seja bem conhecido, 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 (Ma *et al.* 2004), bloqueia canais de Ca^{2+} na membrana plasmática de células da raiz em trigo (*Triticum aestivum*, Huang *et al.* 1992) e causa peroxidação de lipídeos de membrana (Cakmak & Horst 1991; Wagatsuma *et al.* 1995). O íon Al^{3+} também afeta rotas de sinalização (via inositol-trifosfato), interferindo na homeostase do Ca^{2+} , na integridade da bicamada lipídica e em componentes do citoesqueleto (Jones & Kochian 1997; Blancaflor *et al.* 1998). Além disso, o Al bloqueia o transporte simplástico, induzindo deposição de calose em plasmodesmas em raízes de trigo (Sivaguru *et al.* 2000) e afeta funções mitocondriais, provocando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em raízes de ervilha (*Pisum sativum*, Yamamoto *et al.* 2002).

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, então, 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 a sobrevivência das plantas em ambientes ácidos com alta toxicidade por Al, esses organismos desenvolveram estratégias tanto externas quanto internas para desintoxicar esse metal (Kochian *et al.* 2005; Ma 2007). Os mecanismos externos de desintoxicação consistem na exclusão do Al^{3+} por secreção de ácidos orgânicos (citrato,

malato e oxalato) ou outros ligantes (fosfato inorgânico e compostos fenólicos) que formam complexos com o Al e impedem sua entrada nas células da raiz, ou ainda por mudança no pH da rizosfera (Kidd *et al.* 2001; Hoekenga *et al.* 2003; Pineros *et al.* 2005; Ma 2007) que altera a concentração da forma tóxica Al³⁺ do alumínio. Já os mecanismos internos incluem tolerância interna por quelação de Al³⁺ com ácidos orgânicos e ligantes fenólicos (Nagata *et al.* 1992; Morita *et al.* 2004; Morita *et al.* 2008), por eliminação de espécies reativas de oxigênio (Basu *et al.* 2001), por 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).

Em geral, culturas de cereais são consideradas excelentes modelos de estudo para mecanismos de tolerância ao Al, sendo o arroz uma das espécies mais tolerantes entre os cereais (Foy 1988; Famoso *et al.* 2010), embora variações genótípicas entre cultivares possam ocorrer (Ma *et al.* 2002; Arenhart *et al.* 2012). No entanto, tanto os mecanismos fisiológicos quanto os genes responsáveis pela tolerância ao Al são pouco conhecidos.

Recentemente, verificou-se que os genes *ASR* (*Abscisic acid, Stress, Ripening*) de arroz têm sua expressão aumentada em resposta ao Al, principalmente o gene *OsASR5* (Arenhart *et al.* 2012), além de outros estresses como seca, salinidade, frio e lesão mecânica em diversas espécies (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 H. *et al.* 2003; Henry *et al.* 2011). Esses genes também são induzidos por ácido abscísico (Amitai-Zeigerson *et al.* 1995; Vaidyanathan *et al.* 1999) e durante o amadurecimento de frutos (Maskin *et al.* 2001). As proteínas ASR de diversas espécies vegetais são localizadas no núcleo onde podem se ligar a sequências de DNA e regulam promotores específicos (Rossi *et al.* 1996; Cakir *et al.* 2003; Wang J.T. *et al.* 2003; Kalifa *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005; Arenhart *et al.* 2012), sugerindo que essas proteínas sejam fatores de transcrição. Seu silenciamento em arroz confere maior sensibilidade ao Al e à seca (Arenhart *et al.* 2012), enquanto sua superexpressão em *Arabidopsis* confere maior tolerância à seca e à salinidade (Yang *et al.* 2005). Essas pesquisas demonstram um

grande envolvimento dos genes *ASR* em respostas a estresses, devendo sua função ser mais bem estudada para um melhor conhecimento dos mecanismos de tolerância.

Neste artigo realizaram-se análises *in silico* das regiões promotoras da família gênica *ASR* de arroz, buscando *cis*-elementos de DNA reguladores da transcrição envolvidos na resposta a estresses como seca, frio, concentrações tóxicas de metais, etc. Também se estudou o padrão de expressão tecidual *in vivo* do promotor de *OsASR5* em diferentes estágios de crescimento e sob tratamento com Al utilizando plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa*).

Materiais e Métodos

Análises *in silico*

Foi realizada uma busca por *cis*-elementos nos promotores dos 6 membros da família gênica *ASR*, utilizando as ferramentas PlantPAN (*Plant Promoter Analysis Navigator* - <http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw>), PlantCARE (*Plant Cis-acting Regulatory Element* - <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) e PLACE (*Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* - <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) com sequências de tamanho de cerca de 2kb a montante do códon de início ATG de cada um dos 6 genes (*OsASR1* - LOC_Os02g33820; *OsASR2* - LOC_Os01g73250; *OsASR3* - LOC_Os01g72900; *OsASR4* - LOC_Os01g72910; *OsASR5* - LOC_Os11g06720; *OsASR6* - LOC_Os04g34600). As sequências foram obtidas do *Rice Genome Annotation Project* (<http://rice.plantbiology.msu.edu>).

Também foi feito um alinhamento das regiões promotoras (2 kb) no ClustalW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html) com todas as seis sequências juntas e aos pares (*OsASR1* e *OsASR2*, *OsASR1* e *OsASR3*, *OsASR1* e *OsASR4*, e assim por diante).

Material vegetal e condições de crescimento

O material vegetal utilizado para transformação consistiu de calos embriogênicos induzidos em meio N₆D a partir de sementes maduras de arroz da subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare. Os calos foram crescidos em meio de proliferação NB à temperatura de 28 °C no escuro. As plântulas cresceram a 28 °C e

fotoperíodo de 12 h, em meio MS (Murashige e Skoog) pelos primeiros 20 dias e depois foram transferidas para potes com vermiculita. Então, as plantas foram passadas para vasos com solo e crescidas em fitotron com fotoperíodo de 12 h, umidade de 70 % a 90 % e temperatura de 28 °C.

Geração de plantas transgênicas

A sequência promotora do gene *OsASR5* com aproximadamente 2 kb foi amplificada utilizando-se DNA genômico de arroz com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: 5'-CACCGGACATACTTGCAATATCCTTCTT-3' e 5'-AGCTAGAAGCTAGTGATGACAATTAGG-3'. Os quatro nucleotídeos CACC são incluídos no primer para a clonagem da sequência promotora no vetor de entrada Gateway pENTR (Invitrogen) e posterior recombinação com o vetor de destino pHGWFS7. A construção pHGWFS7_AS5, com o promotor de *OsASR5* fusionado à montante do gene de β-glicuronidase (GUS), obtida previamente foi utilizada para a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de calos embriogênicos de arroz como descrito por Upadhyaya *et al.* (2000). *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pHGWFS7_AS5 foi incubada com calos embriogênicos de arroz em meio NB líquido com acetoseringona (19,62 mg/L) durante 30 minutos. Os calos foram co-cultivados com *A. tumefaciens*, por 3 dias a 28 °C no escuro, em meio NBA (NB com acetoseringona a 19,62 mg/L). Após esse período, os calos de arroz foram lavados com água destilada estéril contendo o antibiótico timentina (150 mg/L). Os eventos de transformação foram selecionados e proliferados em meio HTC (NB com os antibióticos higromicina a 50 mg/L, timentina 150 mg/L e cefotaxima a 200 mg/L). Então, os calos foram passados para meio de pré-regeneração (NB com os hormônios ABA a 5 mg/L, BAP a 2 mg/L e ANA a 1 mg/L) e crescidos a 28 °C no escuro por 12 dias, para depois serem colocados em meio de regeneração (NB com os hormônios BAP a 3 mg/L e ANA a 0,5 mg/L) e crescidos a 28 °C em fotoperíodo de 12 h por um mês. As plântulas regeneradas foram passadas para meio MS com higromicina a 50 mg/L.

Tratamento com Alumínio

O tratamento com alumínio (AlCl₃ a 450 μM) foi realizado por 8 horas durante o fotoperíodo claro e em solução nutritiva hidropônica (Yoshida *et al.* 1976) após uma

semana de aclimação das plantas (T0) nessa mesma solução. Esse meio nutritivo, tanto o controle como o tratado, teve seu pH ajustado para uma condição ácida (pH 4,5) para que a forma tóxica do alumínio (Al^{3+}) estivesse predominantemente presente.

Ensaio histoquímico de atividade de GUS

Todas as análises foram realizadas com plantas T0. Os tecidos vegetais foram imersos em solução de tampão (pH 7,0) de 100 mM de $NaPO_4$, 1 mg/mL de substrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicuronídeo), 1 mM de $FeSO_4$, 10 mM de Na_2EDTA e 0,1 % de Triton X-100, por 17-24h a 37 °C para marcação de atividade de GUS de acordo com o método de Jefferson *et al.* (1987). A marcação foi avaliada em calos, raízes, caules, folhas e panículas durante o desenvolvimento. Plantas de arroz de 7, 14, 30 e 45 dias tiveram seus tecidos analisados. Apenas na detecção de atividade de GUS em panículas foram utilizadas plantas de maior idade (8 meses). Com exceção desse último teste com plantas de 8 meses de idade, as análises foram realizadas em pelo menos três linhagens diferentes e em plantas não-transformadas utilizadas como controle.

Seções histológicas

Após o ensaio de atividade de GUS, os tecidos vegetais foram fixados com tampão fosfato de sódio a 0,1 M (pH 7,2) com glutaraldeído a 1 % e formaldeído a 4 % (McDowell & Trump 1976) a temperatura ambiente e sob pressão negativa de 600 mmHg, em estufa a vácuo, por 24 h. Então, foi feita lavagem do material em tampão fosfato de sódio a 0,1 M (pH 7,2) e desidratação em diluições seriadas crescentes de etanol, e depois etanol absoluto. Para inclusão dos tecidos em resina plástica, eles foram primeiramente pré-infiltrados com solução 1:1 de hidroxietilmetacrilato e etanol absoluto por 24 h, sendo posteriormente infiltrados com esta resina (Gerrits & Smid 1983), que foi polimerizada em blocos através de aquecimento. As seções histológicas foram cortadas em micrótomo rotativo, equipado com navalha de vidro, tendo os cortes a espessura de 10 μ m para melhor visualização do sedimento azul formado pela β -glicuronidase (em cortes mais finos a marcação de GUS é muito fraca para observação). O material foi suspenso em água e aderido em lâminas de vidro

para ser observado em microscópio óptico (Leica Microsystems DMR) em campo claro, sem necessidade de corar os tecidos. Fotomicrografias foram obtidas com câmera fotográfica acoplada ao microscópio.

Resultados

Análises in silico

O alinhamento das seis sequências de promotores juntas demonstrou uma grande diferença entre os genes *ASR* (identidade de apenas 2,3 %). Houve alguma semelhança na comparação entre os pares, sendo as maiores entre *OsASR3* e *OsASR4* (46,91 %), *OsASR5* e *OsASR6* (43,84 %) e *OsASR2* e *OsASR5* (43,98 %).

Foram encontrados vários *cis*-elementos de DNA espacialmente distribuídos por toda a região promotora de todos os genes da família *ASR* em arroz (Tabela 1). A análise *in silico* permitiu uma comparação entre os promotores em relação ao tipo e ao número de cópias das sequências consenso. Embora haja uma grande diferença entre os promotores *OsASR* identificada em alinhamento de todas as sequências juntas, os genes tem uma grande quantidade de *cis*-elementos em comum (Tabela 1).

Muitos dos elementos estão envolvidos na regulação da transcrição por açúcar (ACGTABOX, AMYBOX, CGACGOSAMY3, GAREAT, MYBGAHV, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A, TATCCAOSAMY e TATCCAYMOTIFOSRAMY3D – todos envolvidos em repressão por açúcar; e WBOXHVIS01, WBOXATNPR1, WBOXNTERF3 e WRKY710S – todos envolvidos em indução por açúcar). Além disso, vários *cis*-elementos participam da regulação da transcrição por controle hormonal (ABRE, EBOXBNNAPPA/MYCSENSUSAT, MYCATERD1, MYCATRD22, GARE-motif, GAREAT, MYB1AT, MYBGAHV e RYREPEATBNNAPA), em resposta à luz (GT1CONSENSUS), ao frio e à seca (DRECRTCOREAT e LTRECOREATCOR15). Também foi identificado um *cis*-elemento responsivo ao metal cobre (CURECORECR) em elevado número de cópias em todos os promotores (Tabela 1). Elementos responsivos a ABA e luz também se encontram em maior número de cópias dentro dos promotores.

Padrão de expressão tecidual do promotor de *OsASR5* em arroz

Padrão de expressão durante desenvolvimento

Atividade da β -glicuronidase (GUS) foi detectada em calos de arroz (Figura 1) em ambas as fases de proliferação e regeneração em mais de 20 linhagens diferentes obtidas após a transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

A expressão do gene GUS também foi observada em raízes em plantas T0 de várias idades diferentes (Figura 2 e 3). A atividade de GUS está presente no ápice da raiz, na coifa e em células que estão se despreendendo de sua ponta (Figura 2A-C). A expressão também foi encontrada no cilindro central da raiz, onde se localiza o sistema vascular, e no córtex em algumas regiões, especialmente na zona de ramificação da raiz (Figura 3). Não foi detectada atividade de GUS em raízes de plantas não-transformadas (Figura 2D).

A expressão gênica foi ausente em folhas e caules de plantas em diversos estágios de crescimento. Porém, foi observada marcação de GUS nesses tecidos em regiões com lesão mecânica (Figura 4). A marcação não foi encontrada em nenhuma região de folhas de plantas não-transformadas que sofreram dano mecânico (Figura 4C).

Também se detectou atividade de GUS em órgãos florais de plantas T0 de arroz com 8 meses de idade (Figura 5). Na superfície de espiguetas, visualizou-se expressão em tricomas de epiderme da pálea e da lema (Figura 5A e 5C) e nas nervuras vasculares (Figura 5B). A marcação também está presente em anteras (Figura 5D) e em estigmas (Figura 5E), principalmente no tecido vascular. No entanto, não foi observada marcação em sementes de arroz.

Com a realização de cortes histológicos do material vegetal, confirmou-se a atividade de GUS restrita às células da ponta da coifa que estão se soltando da raiz (Figura 6A). Também se observou marcação em primórdios de raízes laterais na região do ápice (Figura 6D). Em seções longitudinais e transversais da raiz pôde-se detectar expressão em células de várias camadas do córtex (como endoderme e exoderme) e células do tecido vascular, mas não nas células da epiderme da raiz (Figura 6B e 6C).

Expressão tecidual em tratamento com Al

Após 8 h de tratamento com 450 μ M de $AlCl_3$, raízes de plantas transgênicas apresentaram atividade de GUS levemente aumentada em relação às plantas controle nas respectivas linhagens (Figura 7). A marcação localizou-se no ápice, no cilindro

central e no córtex da raiz em diferentes idades testadas (7 dias, 45 dias e 8 meses) das plantas de arroz. A expressão do gene era ausente em caules e folhas de plantas tratadas ou não com Al, sendo apenas encontrada em regiões que haviam sido danificadas.

Discussão

Diversos *cis*-elementos envolvidos em respostas à seca, ao frio, à luz, à lesão mecânica, ao ácido abscísico, à giberelina e a metais pesados como o cobre, estão presentes nas regiões promotoras dos genes *ASR*, demonstrando uma participação desses genes em diversas respostas a estresses ambientais. Também foram identificadas várias sequências consenso que participam da regulação da transcrição por resposta a açúcares. Esses resultados não foram surpreendentes, já que muitos genes de plantas possuem co-regulação por ácido abscísico e por açúcares (Rolland *et al.* 2002; Carrari *et al.* 2004), inclusive um gene *ASR* de uva (Saumonneau *et al.* 2012) com diversos *cis*-elementos responsivos a açúcar e ao ABA. Além disso, sabe-se que o ácido abscísico e açúcares agem de forma conjunta durante o desenvolvimento das plantas, tendo efeitos similares e antagonistas em diversos processos (Finkelstein & Gibson 2001). Portanto, pode-se dizer que os genes *ASR* de arroz tem um envolvimento na resposta a sinais metabólicos e hormonais, reforçando sua participação na integração de sinais ambientais (como os estresses abióticos) que determinam o crescimento e o desenvolvimento da planta.

Apenas motivos relacionados à resposta ao cobre, e não ao Al, foram encontrados nos promotores. Uma explicação para isso seria que possivelmente os *cis*-elementos responsivos ao Al ainda não tiveram sua sequência identificada, já que motivos responsivos a metais são pouco caracterizados (Qi *et al.* 2007). Além disso, pode ser necessária uma combinação de diferentes *cis*-elementos para uma resposta a diferentes metais (Dong *et al.* 2010). Também não deve ser descartada a possibilidade de que faltem outras sequências regulatórias relevantes para resposta a metais nas regiões promotoras analisadas (de 2 kb), podendo estas estarem mais a montante na sequência gênica.

O padrão de expressão tecidual *in vivo* do promotor de *OsASR5* no ápice de raízes (Figura 2 e 6A) também já foi relatado em gene ortólogo de *ASR* em pinheiro

(Wang J.T. *et al.* 2003) e indica um envolvimento desse gene em respostas a estresses como a toxidez por Al. O ápice da raiz é o principal local de toxicidade por Al em plantas (Ryan *et al.* 1993; Huang *et al.* 2009; Khan *et al.* 2009) e sabe-se que a coifa é responsável pela proteção do meristema apical da raiz e é capaz de detectar mudanças ambientais no solo, como luz, gravidade, pressão, umidade e nutrientes (Iijima *et al.* 2003; Arnaud *et al.* 2010). Uma maior tolerância ao Al também já foi relatada em cultivares de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) que apresentavam uma coifa expandida (Horst 1980). Em ervilha (*Pisum sativum*), células externas da lateral da coifa expressam genes que codificam uma pectina metilesterase (Wen *et al.* 1999) e acredita-se que o aumento da fração esterificada de pectinas seja um mecanismo de tolerância ao Al. Essa metil-esterificação aumenta o crescimento celular da raiz em *Arabidopsis thaliana* (Derbyshire *et al.* 2007) e cultivares de milho e trigo tolerantes a Al apresentam maior grau de metil-esterificação de pectinas e menor ligação de Al na parede celular (Eticha *et al.* 2005; Yang *et al.* 2008). A atividade da enzima pectina metilesterase também é aumentada na coifa em plantas de girassol (*Helianthus annuus*) e milho durante o processo de separação das células superficiais que se soltam da coifa (Driouich *et al.* 2006), onde a expressão de *OsASR5* também foi encontrada. As células que desprenderam da coifa (chamadas células da borda da raiz – CBR), embora não tenham mais conexão com a raiz, ainda são viáveis e participam da interface entre solo e raiz (Driouich *et al.* 2006). Essas células estão envolvidas na proteção da raiz contra estresses bióticos e abióticos, inclusive auxiliando na detecção de toxicidade por Al (Miyasaka & Hawes 2001). Além disso, já foi relatado um aumento da produção de mucilagem (secreção rica em polissacarídeos) pelas CBR, após tratamento com Al, em cultivares tolerantes ao Al de feijão (*Phaseolus vulgaris*, Miyasaka & Hawes 2001) e de trigo (Puthota *et al.* 1991) em comparação com cultivares sensíveis ao Al. Miyasaka & Hawes (2001) também correlacionam a maior produção de mucilagem e a conseqüente maior viabilidade das CBR com uma maior tolerância ao Al. Assim, existe a possibilidade de a mucilagem proteger tanto as células da raiz quanto as CBR pela exclusão de Al através da ligação desse metal a mucilagem, já que o Al forma complexos estáveis com mucopolissacarídeos (Barceló & Poschenrieder 2002). O gene *OsASR5* poderia estar participando do processo de

separação das CBR, regulando transcrição de genes como pectina metilesterase e enzimas de degradação da parede celular, e/ou da produção de mucilagem por essas células.

O produto da β -glicuronidase foi localizado nas células de camadas do córtex da raiz (Figuras 3 e 6). As camadas celulares endoderme e exoderme da região cortical radicular possuem estrias de Caspary (parte da parede primária impregnada por suberina) que formam uma barreira seletiva, impedindo o transporte apoplástico de solutos, devendo as substâncias absorvidas pela raiz passar pelo simplasto das células dessas camadas (Souza 2003; Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerrero 2006). Essas camadas, portanto, servem como um impedimento da passagem de substâncias tóxicas como metais, impossibilitando sua entrada no sistema vascular da raiz. Dessa forma, elas também podem estar dificultando a absorção de Al em plantas de arroz, auxiliando na sua detoxificação externa.

A expressão do gene GUS foi encontrada no tecido vascular em raízes (no cilindro central – Figuras 3 e 6) e em órgãos florais (espiguetas, anteras e estigmas – Figura 5). Em outras espécies, genes ortólogos de *ASR* também apresentam expressão em tecido vascular, como no floema de uva (Saumonneau *et al.* 2012), de tomate, especialmente em células companheiras (Rossi *et al.* 1998; Maskin *et al.* 2008), e em raízes e órgãos florais de pinheiro (Wang J.T. *et al.* 2003).

A atividade de GUS detectada em lesões mecânicas por ferimento em folhas e caules (Figura 4) sugere a participação de *OsASR5* nesse tipo de estresse. Outra possibilidade para explicar a localização do produto da β -glicuronidase nessas regiões seria uma melhor penetração da solução de substrato dessa enzima nos tecidos danificados. No entanto, Henry *et al.* (2011) verificou indução de outros genes *ASR* em banana após ferimento de meristemas apicais caulinares. A expressão em tecidos meristemáticos (como calos de arroz), encontrada no presente trabalho (Figura 1), também é relatada em outro estudo com gene ortólogo de *ASR* (Wang J.T. *et al.* 2003).

A marcação azul de GUS foi observada nos tricomas em plantas de arroz transformadas (Figura 5). O promotor de um gene ortólogo de *ASR* em pinheiro fusionado ao gene GUS também é ativado em tricomas (Wang J.T. *et al.* 2003). A expressão em tricomas de um gene de uma metalotioneína responsivo a metais

pesados (*OsMT-1-4b*) já foi identificada em arroz em outro trabalho (Dong *et al.* 2010). Tricomas podem estar envolvidos em mecanismos de proteção contra o excesso de metais pesados, devido à acumulação de níquel (Kramer *et al.* 1997) e cádmio (Domínguez-Solís *et al.* 2004), à secreção de zinco (Sarret *et al.* 2006) e à detecção de chumbo (Azmat *et al.* 2009) verificada nesses órgãos. Assim, pode-se especular sobre um possível envolvimento de tricomas no mecanismo de tolerância ao Al, já que esse metal pode ser transportado até as folhas (Haridasan *et al.* 1986; Michalas *et al.* 1992). Também não pode ser descartada a possibilidade do gene *OsASR5* participar do mecanismo de resistência à seca em tricomas, devido à indução do gene durante essa condição (Arenhart *et al.* 2012) e ao envolvimento dessas estruturas na proteção contra esse tipo de estresse (Loe *et al.* 2007; Huttunen *et al.* 2010; Azmat *et al.* 2009).

Com relação à expressão de *OsASR5* após tratamento com Al, nota-se uma sutil diferença entre plantas tratadas e plantas controle, comparando-se as respectivas linhagens (Figuras 7A com 7D, 7B com 7E e 7C com 7F). Deve-se comparar a mesma linhagem nesse experimento, pois podem existir grandes diferenças nos níveis de expressão de GUS em diferentes clones/linhagens (Rossi *et al.* 1998), devido ao local de inserção do transgene no genoma (Meyer 1995). Além disso, o método de Jefferson *et al.* (1987) que utiliza X-gluc como substrato da enzima β -glicuronidase não é uma técnica quantitativa para verificar a expressão de GUS, sendo mais apropriado o ensaio fluorimétrico de atividade de GUS, que utiliza o composto 4-MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo) como substrato. Portanto, não se pode afirmar com certeza que o tratamento com Al realmente induziu a expressão da enzima regulada pela região promotora de *OsASR5*.

Podem-se especular diferentes tipos de mecanismos de tolerância ao Al, com base nos resultados do padrão de expressão tecidual *in vivo* de *OsASR5*, como exclusão de Al por mucilagem produzida por células da coifa, barreira a metais formada pelas camadas do córtex da raiz e excreção de Al por tricomas. Em arroz, os mecanismos de tolerância ao Al não são bem entendidos, porém já foram propostas a secreção de citrato por raízes (Yokosho *et al.* 2011), a modificação da parede celular (Yang *et al.* 2008) e da membrana plasmática (Khan *et al.* 2009) e o sequestro de Al em vacúolos (Xia *et al.* 2010; Huang *et al.* 2012). Pode-se dizer, então, que há uma combinação de

fatores que estariam envolvidos, não podendo a tolerância ser totalmente explicada por apenas um mecanismo.

Nossos resultados mostram a presença de diversos *cis*-elementos responsivos a estresses nos promotores dos genes *OsASR* e a expressão de *OsASR5* em raízes, sistema vascular, tricomas e tecidos danificados, o que sugere a participação desse gene na toxidez por Al, na lesão mecânica por ferimento e até mesmo no estresse por seca. No entanto, análises ainda necessitam ser realizadas para determinar sua possível função como fator de transcrição em arroz, quais genes as proteínas *OsASR* estariam regulando, e se eles estão envolvidos em mecanismos de tolerância a esses estresses.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao *International Center for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB) e à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro.

Referências

- Amitai-Zeigerson H., Scolnik P.A. & 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.
- Appezato-da-Glória B. & Carmello-Guerrero S.M. (2006) Anatomia Vegetal. Ed. 2. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Arenhart R.A., Lima J.C., Pedron M., Carvalho F.E.L., da Silveira J.A., Rosa S.B., Caverzan A., Andrade C.M.B., Schünemann M., Margis R. & Margis-Pinheiro M. (2012) Involvement of ASR genes in aluminum tolerance mechanisms in rice. *Plant, Cell and Environment* DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02553.x.
- Arnaud C., Bonnot C., Desnos T. & Nussaume L. (2010) The root cap at the forefront. *Comptes Rendus Biologies* 333, 335–343.
- Azmat R., Haider S., Nasreen H., Aziz F. & Riaz M. (2009) A viable alternative mechanism in adapting the plants to heavy metal environment. *Pakistan Journal of Botany* 41, 2729-2738.
- Barceló J. & 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. & 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.
- Blancaflor E.B., Jones D.L. & 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.
- Cakir B., Agasse A., Gaillard C., Saumonneau A., Delrot S. & Atanassova R. (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15, 2165–2180.
- Cakmak I. & Horst W.J. (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.
- Carrari F., Fernie A.R. & Iusem N.D. (2004) Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends in Plant Science* 9, 57-59.
- Crapper D.R., Krishnan S.S. & Dalton A.J. (1973) Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180, 511–513.

- Derbyshire P., McCann M.C. & Roberts K. (2007) Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BioMed Central Plant Biology* 7:31, DOI: 10.1186/1471-2229-7-31.
- Domínguez-Solís J. R., López-Martín M.C., Ager F.J., Ynsa M.D., Romero L.C. & Gotor C. (2004) Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* 2, 469–476.
- Dong C.J., Wang Y., Yu S.S. & Liu J.Y. (2010) Characterization of a novel rice metallothionein gene promoter: its tissue specificity and heavy metal responsiveness. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 914–924.
- Driouich A., Durand C. & Vitré-Gibouin M. (2006) Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* 12, 14-19.
- Driscoll C.T. (1985) Aluminum in acidic surface waters: Chemistry, transport, and effects. *Environmental Health Perspectives* 63, 93–104.
- Eticha D., Stass A. & Horst W.J. (2005) Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany* 56, 1351–1357.
- Famoso A.N., Clark R.T., Shaff J.E., Craft E., McCouch S.R. & Kochian L.V. (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.
- Fageria N.K., Baligar V.C. & Writh R.J. (1988) Aluminum toxicity in crop plants. *Journal of Plant Nutrition* 3, 303-319.
- Finkelstein R.R. & Gibson S. (2001) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* 5, 26-32.
- Foy C.D. (1988) Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19, 959–987.
- Gerrits P.O. & Smid L. (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132, 81-85.
- Haridasan M., Paviani T.I. & Schiavini I. (1986) Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Plant Soil* 94, 435–437.
- Henry I.M., Carpentier S.C., Pampurova S., Hoylandt A.V., Panis B., Swennen R. & Remy S. (2011) Structure and regulation of the *Asr* gene family in banana. *Planta* 234, 785-798.
- Hoekenga O.A., Vision T.J., Shaff J.E., Monforte A.J., Lee G.P., Howell S.H. & Kochian L.V. (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.

Horst W.J. (1980) Genotype differences in aluminium and manganese-tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*) and soybean (*Glycine max*)-development of screening procedures. Tese de habilitação, Universidade de Hohenheim.

Huang J.W., Grunes D.L. & Kochian L.V. (1992) Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta* 188, 414–421.

Huang C.F., Yamaji N., Nishimura M., Tajima S. & Ma J.F. (2009) A rice mutant sensitive to Al toxicity is defective in the specification of root outer cell layers. *Plant and Cell Physiology* 50, 976–985.

Huang C.F., Yamaji N., Chen Z. & Ma J.F. (2012) A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *The Plant Journal* 69, 857-867.

Huttunen P., Kärkkäinen K., Loe G., Rautio P. & Agren J. (2010) Leaf trichome production and responses to defoliation and drought in *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae). *Annales Botanici Fennici* 47, 199-207.

Iijima M., Barlow P.W. & Bengough A.G. (2003) Root cap structure and cell production rates of maize (*Zea mays*) roots in compacted sand. *New Phytologist* 160, 127-134.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (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.

Jones D.L. & Kochian L.V. (1997) Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 400, 51–57.

Kalifa Y., Gilad A., Konrad Z., Zaccari M., Scolnik P. & Bar-Zvi D. (2004) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal* 381, 373–378.

Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D. & Bonhert H.J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13, 889–905.

Khan M.S.H., Tawarayama K., Sekimoto H., Koyama H., Kobayashi Y., Murayama T., Chuba M., Kambayashi M., Shiono Y., Uemura M., Ishikawa S. & 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. & 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.
- Kochian L.V., Pineros M.A. & Hoekenga O.A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274, 175–195.
- Krämer U., Grime G.W., Smith J.A.C., Hawes C.R. & Baker A.J. (1997) Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 130, 346–350.
- Loe G., Toräng P., Gaudeul M. & Agren J. (2007) Trichome production and spatiotemporal variation in herbivory in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Oikos* 116, 134–142.
- Ma J.F., Shen R., Zhao Z., Wissuwa M., Takeuchi Y., Ebitani T. & Yano M. (2002) Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant and Cell Physiology* 43, 652–659.
- Ma J.F., Shen R.F., Nagao S. & Tanimoto E. (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology* 45, 583–589.
- Ma J.F. (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology* 264, 225–253.
- McDowell E.M. & Trump B. (1976) Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100, 405–414.
- Maskin L., Gudesblat G.E., Moreno J.E., Carrari F.O., Frankel N., Sambade A., Rossi M.M. & Iusem N.D. (2001) Differential expression of the members of *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Science* 161, 739–746.
- Maskin L., Maldonado S. & Iusem N.D. (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Molecular Biology Reports* 35, 501–505.
- Meyer P. (1995) Understanding and controlling transgene expression. *Trends in Biotechnology* 13, 332–337.
- Michalas F., Glavac V. & Parlar H. (1992) The detection of aluminium complexes in forest soil solutions and beech xylem saps. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 343, 308–312.
- Miyasaka S.C. & Hawes M.C. (2001) Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiology* 125, 1978–1987.
- Morita A., Horie H., Fujii Y., Takatsu S., Watanabe N., Yagi A. & 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. & 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. & Kosuge N. (1992) Identification of aluminum forms in tea leaves by ²⁷Al NMR. *Phytochemistry* 31, 1215–1218.
- Padmanabhan V., Dias D. & Newton R.J. (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology* 35, 801–807.
- Pineros M.A., Shaff J.E., Manslank H.S., Alves V.M. & Kochian L.V. (2005) Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiology* 137, 231–241.
- Poschenrieder C., Gunse B., Corrales I. & Barceló J. (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment* 400, 356–368.
- Puthota V., Cruz-Ortega R., Jonson J. & Ownby J. (1991) An ultrastructural study of the inhibition of mucilage secretion in the wheat root cap by aluminum. In *Plant–Soil Interactions at Low pH* (eds R.J. Wright, V.C. Baligar & R.P. Murrmann), pp. 779–789. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Qi X., Zhang Y. & 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.
- Riccardi F., Gazeau D., De Vienne D. & Zivy M. (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology* 117, 1253–1263.
- Rolland F., Moore B. & Sheen J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14(Suppl.), S185–S205.
- Rossi M., Lijavetzky D., Bernacchi D., Hopp H.E. & Iusem N. (1996) *Asr* genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato. *Molecular and General Genetics* 252, 489–492.
- Rossi M., Carrari F., Cabrera-Ponce J.L., Vázquez-Rovere C., Herrera-Estrella L., Gudesblat G. & Iusem N.D. (1998) Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Molecular and General Genetics* 258, 1–8.
- Ryan P.R., Dito J.M. & Kochian L.V. (1993) Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* 44, 437–446.

- Ryan P.R., Liu Q., Sperling P., Dong B., Franke S. & 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.
- Sarret G., Harada E., Choi Y.E., Isaure M.P., Geoffroy N., Fakra S., Marcus M.A., Birschwilks M., Clemens S. & Manceau A. (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiology* 141, 1021–1034.
- Saumonneau A., Laloi M., Lallemand M., Rabot A. & Atanassova R. (2012) Dissection of the transcriptional regulation of grape *ASR* and response to glucose and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 63, 1495-1510.
- Silhavy D., Hutvagner G., Barta 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. & Matsumoto H. (2000) Aluminum-induced 1 \rightarrow 3- β -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology* 124, 991–1005.
- Smith W.H. (1990) Air Pollution and Forests. Em *Interaction Between Air Contaminants and Forest Ecosystems*, Ed. 2. Springer, New York.
- Souza L.A. (2003) Morfologia e Anatomia Vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula. Editora Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- Sugiharto B., Ermawati N., Mori H., Aoki K., Yonekura-Sakakibara K., Yamaya T., Sugiyama T. & 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.
- Upadhyaya N.M., Surin B., Ramm K., Gaudron J., Schunmann P.H.D., Taylor W., Waterhouse P.M. & Wang M.B. (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. & 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. & 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.

- von Uexkull H.R. & 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. & 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 H., Miyazaki S., Kawai K., Deyholos M., Galbraith D.W. & Bonhert H.J. (2003) Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology* 52, 873–891.
- Wang J.T., Gould J.H., Padmanabhan V. & Newton R.J. (2003) Analysis and localization of the water-deficit stress-induced gene (*Ip3*). *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 469-478.
- Wen F., Zhu Y. & Hawes M.C. (1999) Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11, 1129–1140.
- Wolt J.D. (1994) Soil Solution Chemistry: Applications to Environmental Science and Agriculture. Ed. 1. John Wiley & Sons, New York.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S. & 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 C.Y., Chen Y.C., Jauh G.Y. & Wang C.S. (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139, 836–846.
- Yang J.L., Li Y.Y., Zhang Y.J., Zhang S.S., Wu Y.R., Wu P. & Zheng S.J. (2008) Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146, 602–611.
- Yokel R.A. (2000) The toxicology of aluminum in the brain: A review. *Neurotoxicology* 21, 813–828.
- Yokosho K., Yamaji N. & Ma J.F. (2011) An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *The Plant Journal* 68, 1061–1069.
- Yoshida S., Forno D.A., Cock J.A. & Gomez K.A. (1976) Laboratory Manual for Plant Physiological Studies of Rice. Ed. 3. International Rice Research Institute, Manila, Filipinas.
- Xia J., Yamaji N., Kasai T. & Ma J.F. (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18381–18385.

Tabelas

Tabela 1. *Cis*-elementos encontrados *in silico* nos promotores da família gênica *ASR* de arroz, com seu nome, sequência, tipo de resposta e número de cópias/repetições na sequência de DNA.

Nome do <i>cis</i> -elemento	Sequência	Resposta	Número de Cópias/Repetições					
			p <i>ASR1</i>	p <i>ASR2</i>	p <i>ASR3</i>	p <i>ASR4</i>	p <i>ASR5</i>	p <i>ASR6</i>
ABRE	ACGTG	ABA	3	1	10	12	8	7
ACGTABOX	TACGTA	Repressão por açúcar	2	2	14	10	0	0
AMYBOX	TA(A/T)C(A/C)RA	Repressão por açúcar	4	2	1	1	2	0
CGACGOSAMY3	CGACG	Repressão por açúcar	1	1	4	6	0	1
CURECORECR	GTAC	Cobre	22	16	30	30	8	16
DRECRTCOREAT	RCCGAC	ABA, seca, frio	1	2	2	2	2	3
EBOXBNNAPPA/ MYCCONSENSUSAT	CANNTG	Luz, ABA	12	24	10	12	20	14
GARE-motif	TAAC(G/A)(T/G)A	GA	0	1	2	3	1	1
GAREAT	TAACAAR	GA, repressão por açúcar	1	1	1	0	1	0
GT1CONSENSUS	GRWAAW	Luz	16	15	13	22	16	13
LTRECOREATCOR15	CCGAC	ABA, seca, frio	2	2	2	3	2	3
MYB1AT	WAACCA	ABA, seca	2	2	1	3	3	0
MYBGAHV	TAACAAA	GA, repressão por açúcar	1	1	0	0	1	0
MYCATERD1	CATGTG	ABA, seca	1	1	1	2	2	2
MYCATRD22	CACATG	ABA, seca	1	1	1	2	2	2
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	GA, repressão por açúcar	1	2	2	0	0	1
RYREPEATBNNAPA	CATGCA	ABA	3	0	4	9	1	5
TATCCAOSAMY	TATCCA	GA, repressão por açúcar	4	2	3	2	2	1
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAY	Repressão por açúcar	3	0	1	1	2	0
WBOXATNPR1	TTGAC	Defesa, indução por açúcar	6	5	3	3	1	1
WBOXHVIS01	TGACT	Indução por açúcar	6	5	1	1	1	5
WBOXNTERF3	TGACY	Ferimento, indução por açúcar	10	6	2	2	2	7
WRKY71OS	TGAC	Repressor de GA, indução por açúcar	16	16	7	6	5	13

Abreviaturas: ABA – ácido abscísico; GA – giberelina.

Legendas das Figuras

Figura 1. Atividade de GUS representando a expressão de *OsASR5* em calos embriogênicos de arroz. (A, B, C, D, E e F) Linhagens transgênicas 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. (G) Calo não-transformado.

Figura 2. Atividade de GUS em ápices de raízes de plantas de arroz. Ápices de raízes de plantas transgênicas de 7 dias (A), 14 dias (B) e 30 dias (C) de idade evidenciando marcação de GUS em células da coifa e células da borda da raiz (CBR) se desprendendo da mesma. Fotos em aumento microscópico de 400X. (D) Raízes de planta não-transformada. Foto em aumento de 200X.

Figura 3. Atividade de GUS no cilindro central e córtex de raízes de plantas de arroz transgênicas. Raízes de plantas transgênicas de 30 dias (A e C) e 45 dias (B e D) de idade evidenciando marcação no cilindro central (sistema vascular) na zona pilifera da raiz (A e B) e no córtex na zona de ramificação da raiz (C e D). Fotos em aumento microscópico de 100X.

Figura 4. Atividade de GUS em tecidos lesionados. (A) Lesão em folha de planta de 14 dias de idade. Foto em aumento microscópico de 400X. (B) Caules seccionados de planta de 45 dias de idade. (C) Folhas de plantas não-transformada (à esquerda) e transgênica (à direita) de 4 meses de idade. Setas apontam lesões.

Figura 5. Atividade de GUS em espiguetas, tricomas da pálea e lema, anteras e estigmas. Espiguetas de planta transgênica de 8 meses de idade mostrando marcação de GUS em tricomas (A) e nas nervuras vasculares (B) da pálea e lema. (C) Tricomas em maior aumento (400X). (D) Antera evidenciando marcação no tecido vascular. Foto em aumento de 400X. (E) Estigma com marcação de atividade de GUS no tecido vascular. Foto em aumento de 200X.

Figura 6. Atividade de GUS em cortes histológicos de raízes. (A) Seção longitudinal do ápice da raiz evidenciando células marcadas na coifa. (B) Seção longitudinal da raiz mostrando marcação de GUS no tecido vascular e no córtex. (C) Seção transversal da raiz na zona de ramificação evidenciando marcação de GUS em células do tecido vascular e de camadas do córtex; marcação ausente na epiderme. (D) Seção longitudinal da raiz na zona de ramificação mostrando uma raiz lateral em formação já com marcação de GUS no seu ápice.

Figura 7. Atividade de GUS em raízes de plantas submetidas a tratamento com Al. Raízes de plantas transgênicas (de 3 linhagens diferentes) de 45 dias de idade submetidas a cultivo em hidroponia contendo 450 μM de AlCl_3 (D, E e F) ou com apenas solução nutritiva (A, B e C – controle). Linhagens 1 (A e D), 2 (B e E) e 3 (C e F).

Figuras

Figura 1:

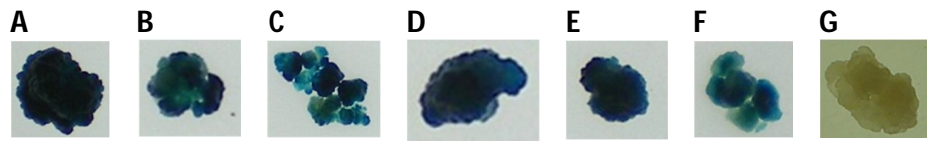


Figura 2:

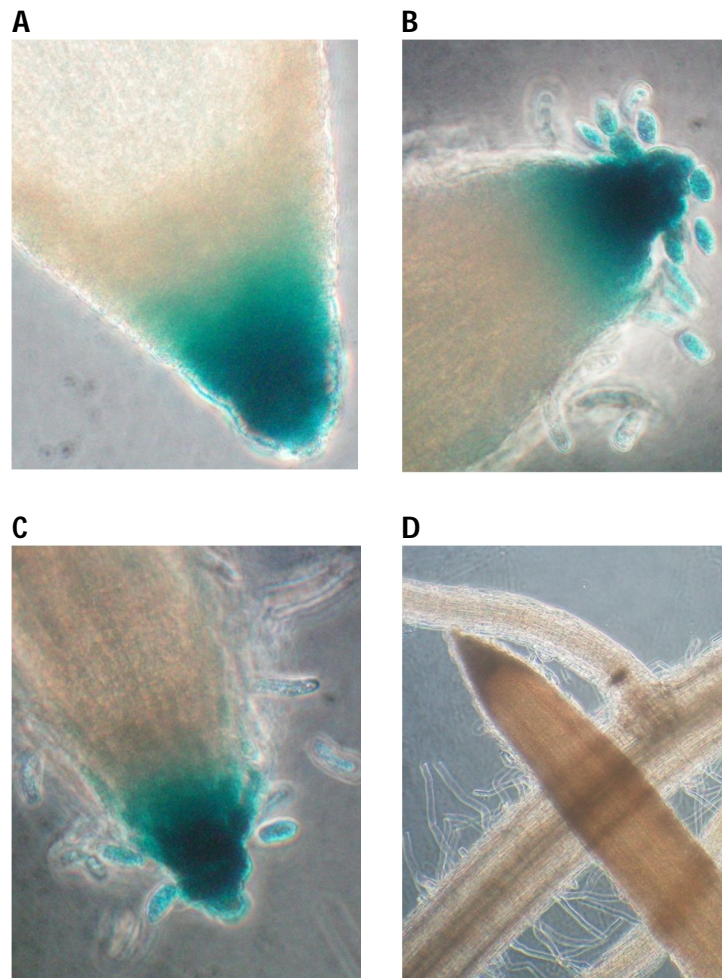


Figura 3:

A



B



C

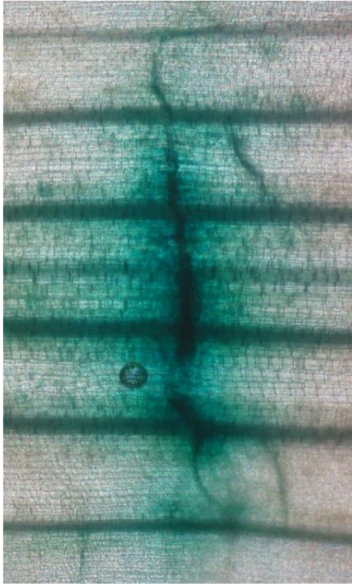


D

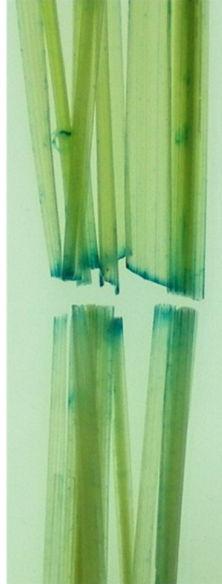


Figura 4:

A



B



C



Figura 5:

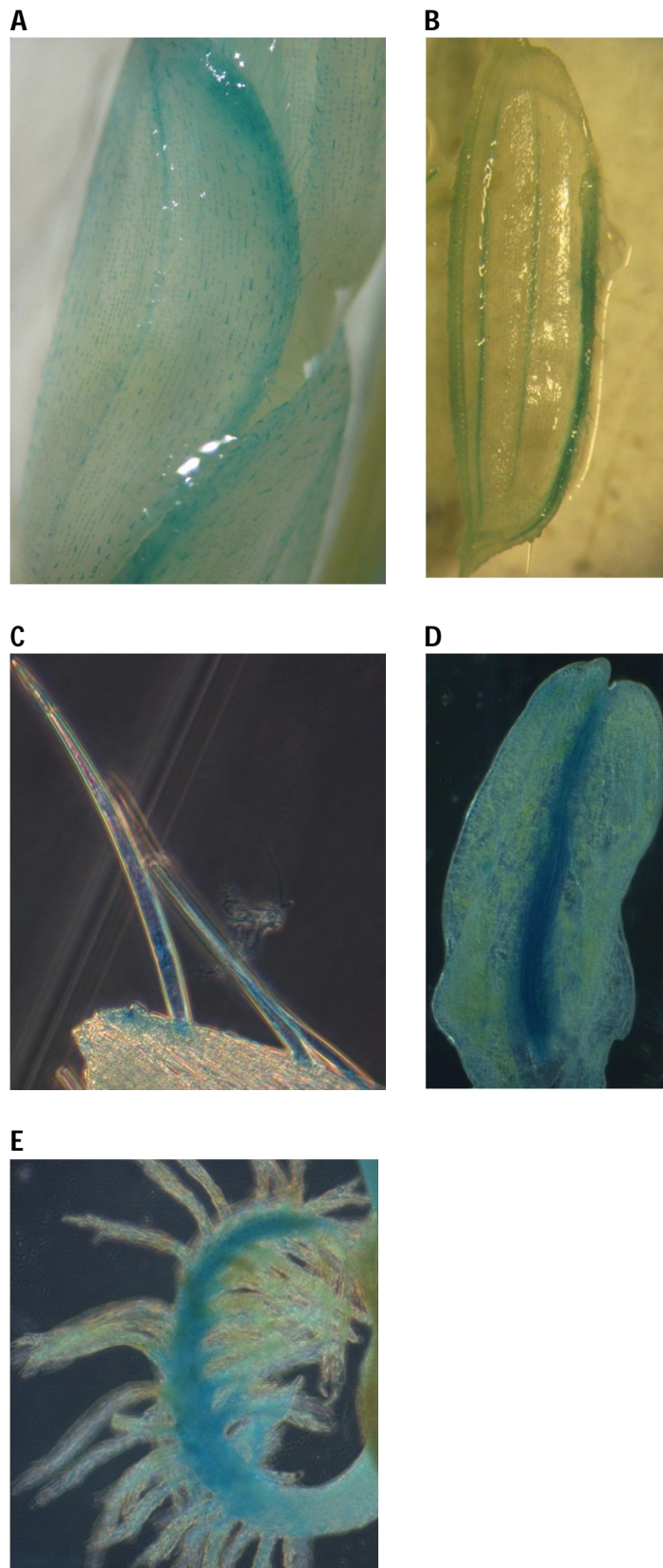


Figura 6:

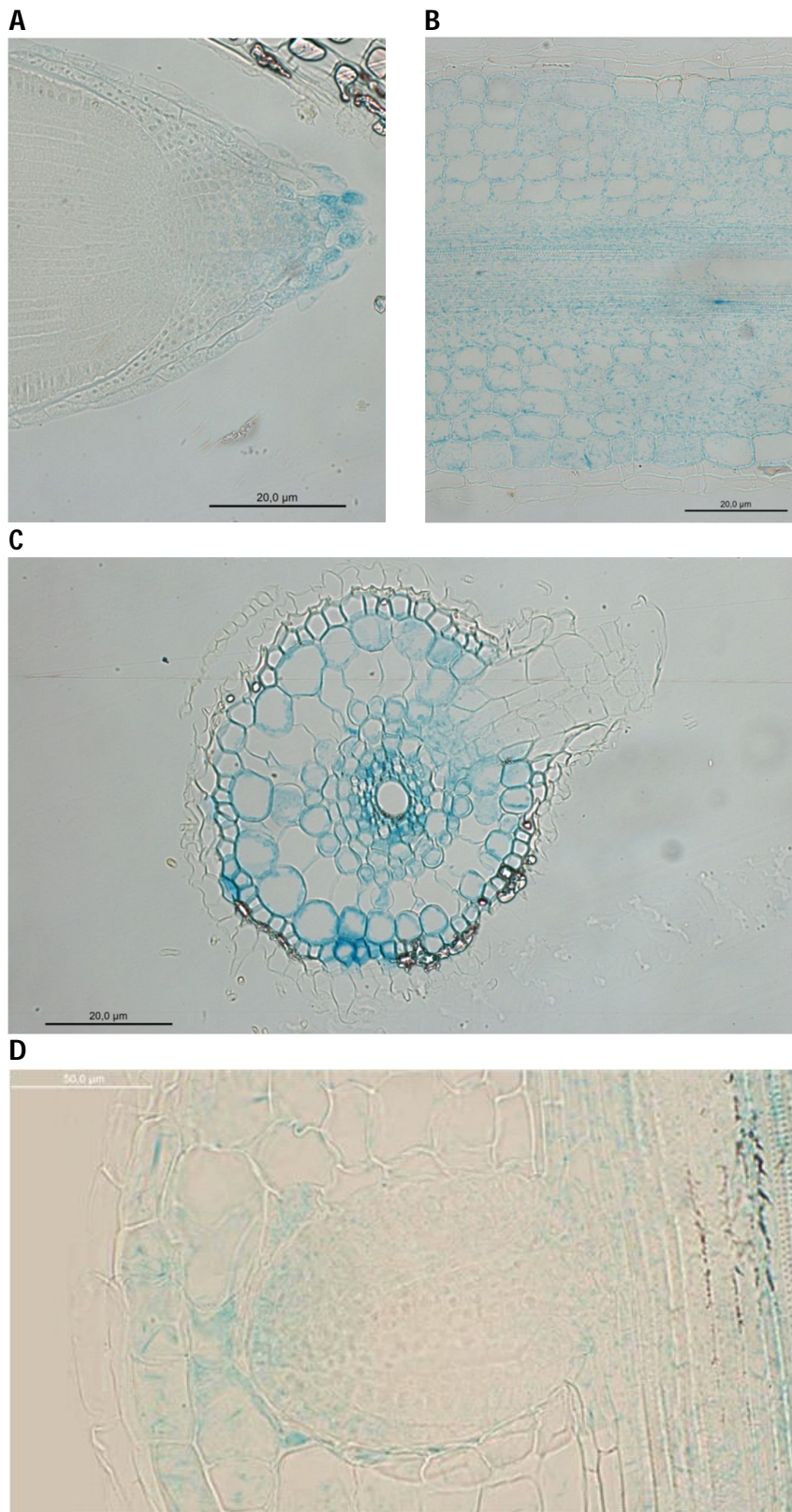


Figura 7:

A



B



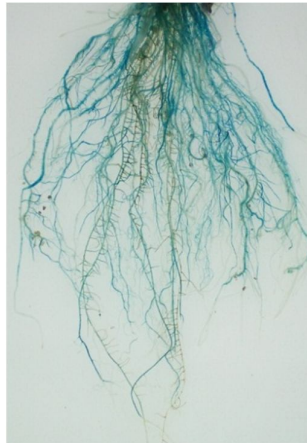
C



D



E



F



Conclusões e Perspectivas

Os genes *ASR* de arroz possuem diversos *cis*-elementos em suas regiões promotoras que são responsivos a situações de estresse reforçando estudos que demonstraram sua indução nessas condições (van Berkel *et al.* 1994; Amitai-Zeigerson *et al.* 1995; Padmanabhan *et al.* 1997; Vaidyanathan *et al.* 1999; Sugiharto *et al.* 2002; Henry *et al.* 2011). Os promotores também têm vários motivos de regulação da transcrição por açúcar, assim como outros promotores de genes responsivos ao ABA (Saumonneau *et al.* 2012).

A expressão de *OsASR5* foi detectada em plantas de arroz transgênicas no ápice de raízes (principalmente em células que se desprendem da coifa), em camadas do córtex radicular (endoderme e exoderme), no sistema vascular de raízes e de órgãos florais (antras e estigmas), em tricomas e em tecidos que sofreram lesão mecânica. Esses resultados sugerem um envolvimento desse gene em respostas a estresses como toxidez por Al, dano mecânico por ferimento e seca.

Como perspectivas deste trabalho pretende-se realizar ensaios com 4-MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo) para quantificação de atividade GUS e confirmação ou não de maior expressão de *OsASR5* durante diferentes tratamentos (como ABA, alumínio, NaCl, açúcares, seca, etc.). Também é possível testar a expressão de deleções da região promotora para melhor determinação dos *cis*-elementos responsivos a estresses induzidos por metais. Ainda pretendemos estudar o padrão de expressão tecidual dos outros promotores da família gênica *OsASR*, transformando calos de arroz com as construções, contendo o gene repórter da β -glicuronidase regulado pelo promotor de interesse, já obtidas em nosso laboratório. Além disso, serão realizadas seções histológicas de folhas e caules de arroz a fim de determinar se realmente não há expressão de *OsASR5* nesses tecidos quando não estão lesionados.

Bibliografia

- Boyer J.S. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218, 443–448.
- Bray E.A., Bailey-Serres J. & Weretilnyk E. (2000) Responses to abiotic stresses. Em *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds W. Gruissem, B. Buchanan & R. Jones) *American Society of Plant Physiologists*, pp. 1158–1249.
- Canel C., Bailey-Serres J.N. & Roose M.L. (1995) Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiology* 108, 1323–1324.
- Chang S., Puryear J.D., Dias M.A.D.L., Funkhouser E.A., Newton R.J. & Cairney J. (1996) Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum* 97, 139–148.
- Dóczy R., Kondrak M., Kovacs G., Beczner F. & 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.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil (Novembro de 2005) Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/index.htm> (acessado dia 4 de junho de 2012).
- Finkelstein R.R., Gampala S.S.L. & Rock C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14(Suppl.), S15-S45.
- Frankel N., Carrari F., Hasson E. & Iusem N.D. (2006) Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene* 378, 74–83.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T. & Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6, 271-282.
- Hong S.H., Kim I.J., Yang D.C. & Chung W.I. (2002) Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *Journal of Experimental Botany* 53, 2271–2272.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Indicadores IBGE – Estatística da Produção Agrícola (Abril de 2012) Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201204.pdf (acessado dia 4 de junho de 2012).
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436, 793-800.
- Iusem N.D., Bartholomew D.M., Hitz W.D. & Scolnik P.A. (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiology* 102, 1353–1354.

- Kalifa Y., Pearlson E., Gilad A., Konrad Z., Scolnik P.A. & 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.
- Kalifa Y., Gilad A., Konrad Z., Zaccari M., Scolnik P. & 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.
- Leung J. & Giraudat J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 49, 199-222.
- Mahajan S. & Tuteja N. (2006) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158.
- Moore G., Devos K.M., Wang Z. & Gale M.D. (1995) Grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 5, 737-739.
- Peng S., Huang J., Sheehy J.E., Laza R.C., Visperas R.M., Zhong X., Centeno G.S., Khush G.S. & Cassman K.G. (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9971-9975.
- Rice Genome Annotation Project. Ouyang S., Zhu W., Hamilton, J., Lin H., Campbell M., Childs, K., Thibaud-Nissen, F., Malek, R.L., Lee Y., Zheng L., Orvis J., Haas B., Wortman J. & Buell C.R. (2007) The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Research* 35, 883-887.
- Shen G., Pang Y., Wu W., Deng Z., Liu X., Lin J., Zhao L., Sun X. & 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. & Koyuzuka J. (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 399-419.
- Wang C.S., Liao Y.E., Huang J.C., Wu T.D., Su C.C. & Lin C.H. (1998) Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant and Cell Physiology* 39, 1307-1314.
- Wang H.J., Hsu C.M., Guang Y.J. & Wang C.S. (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiology of Plants* 123, 314–320.
- Yang Q., Wang Y., Zhang J., Shi W., Qian C. & 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.

Anexos

Anexo 1 – Sequências das regiões promotoras dos genes *OsASR* (códon de início ATG está em negrito)

OsASR1

Sequência TIGR: Loc_Os02g33820

TAATATAGTCAATTCGATCAAATAAAGGGCAAGAAAATTCTTGTGTACAAATCAGATTGCGTA
TACCGTGTTTTACATAGACGGTCTGTGGTTTTGCATCGTCCCGCGTTACTTCCAGCACTGA
GCGCTTCCAAATCAGCGCTCTGAATTTCTGAAGCCGCGAGTCTTCCAATTCTTCGCTATGAAG
TACTACCTCCATATTCATATTTAATGTATGACGCCGTTGACTTTTTATCCAACGTTTGACCATT
GTCTTATCAAAAAATTATGTAATTATCATTTATTTATTATGACTTGATTCTTCATTAATGTT
CTTTAAGCATGACATAAATATTTTCATATTTGCACAAAAAATTTGAATAAAACGAATGGTCAA
ACGTTGGTCGAAAAGTCAACGGCGTCATACATTAATAACGGAGGGAGTACTAGTTTGTACTA
CCTCTATCCCAGGACATAGCAATTTAGGATTGATCTACGTATCTTATACTACACCAACGAATCT
AAACATATGGTATGTAGTACTCCCTCCGTCCTCCAAAATATAACAACCTTTAGCACTTAGGATTTG
TCCAAAATATATCAACTTATCCATCATCCAACCAATCACAGCCCTCCACCATCCACTTTTCTC
ACCTACCTTCACTACTCATCCAAACACAACCCTCCACCATTCAATTTCTGCCTACTTTTTTAATAAT
CATGTTCAACTCTAAAACCTATTATATTCTGGGACGGAGGGAGTATACCTGACACGCTTTTCGAT
CTGCCTGGTCTGCATGATGATCTCTGGTTTTCAGAATTGGTACAAAGGGCTCATTAGAAAAGT
CTTGAAATTCACGTTGTCATCAACGGAAAATAGGACGGTTGGCCGCTTGCCCAAATCACACC
GTGGGGCCATGAGTTGTTGATCTAATGAACTTTTTTGAACCTTGATCCAATGAACTAGGCACT
CGAATTTGCTAGGGGTTAAGGTATAAAAAGTGGTTCGGTGAAAATATTTTACTCACGATAAAGG
TAGAACACAAGTAATTTCAAACGAAAGAAAAATCTGTAGGTTTGAACCCACAGGTACAAGTT
AAAAGGATGTGCTTGAACAACCTCATGCAGTTTTACCGTTCATTTTCTGAATCTTAATTTTTGTAT
CCTTAGCTCTGAAGAAATCAAGAAACCGAGTTC AACCTACTTTGTCTGTCCGGGCTGTCTCTAT
CCGGGCTGATAAGAACCGAGGGAGTGTGACAAAACCAACTGGCCAATCCGCGTGTGATTA
CATTTCCAAATCCTTGGTCGACGTAACAACCATTGTCCATGTCGATGCTTAGCTGATGAATCT
TGACTTTGTTTGCATGTCCTTCCACCAATTAAGGTGAAGATCTAGCAGATGAGCTGTAATAGCC
ATCACACTGCTTCATTTCTGAAAGACAATTCAAGCAGTAACAAATTAATGGCAAACCTATAACT
CCTATGTACACCATTGACTGTGTACAAACAATAACGTATTCGGTAATTTTCAAGTAACTAGGT
TTCTGAATAATCATGCCAGTTAATTAGTAGTAGTATTGATGATGCATCTTAGGTCACCAGCTGG
CACGTCCCATTCCGATAATTGCAGTGGCTGACTGGCTCTGATTAATTAATTGATGATCGATCGA
GCGCGCCATTACGCGGTGAGTGACCATGAACGAGTCTTTATCAAATTAATAAGGCCATTAGCT
AATTAACCTAATTAGATGGATATATCCATTATCCCAAACAGTATATCTCTCTCTTGTATTCTTGA
GACTTTTGGAGGTTTCATAGTTCATACCTGCAACAACAACCTGCGCGTAACACATACCACACGCC
AAGTACGCCCTCCCCCTCTAAACTGAGATTTGAGGCCCAAATAATGTTATTAGCAAGTAGCTG
ATGCTAGCCGCTCCTTGCTATAAATACATGTGCTTTGCTAGTTAGCTTTTGCACAGATCAACAC
CGGCAACCGACTAACTCTGTCTGAAGGAAGCTAAGATTATAATCAGTGAGTAGCTAGCC**ATG**

OsASR2

Sequência TIGR: LOC_Os01g73250

GAAAAATAATGAAATGCGTATCTAGCTAGAAACATTATAGTTGTCCAAAGACTTGTTTTAATTA
TCTCCATTTATCTAATTATTTGCTCCCCTATATAATTAATTTGGACATATAGCCTCGGTTCTGT
TTATTTAGTCTCTGTTGGAACATATTAATTTGATCCGTGCCTTAATTAAGGCATCATACTGTAT
TACTGTTTGCTATGCTGTGCGTTTACTTTGTTAAGCCGGGTCTTCATATATATGTTCAATTC
TTAAACATTCTGAAAATTGTCGGCATGCGTGATTATTATCATCCAGGACATGGATGAAGAAT
CTGTCGTCAGGACGCGTGTGTGGATGCTTTCCTTTAACACTGAAGATGTGAAATTCTCTTGTC
AGAGGAAGAACAAGATGAAATGCAAATGGTGTGCCATTTCTCGATAGAGAATAACTTTACC
GAGTGCGGCGAGGAAAGAAGATAAAAATGCTGATATGCTCCCAACTGGTGAATAATCGCATA
CCCTTTTTTAAAAGAGAGAAAACAACGCGCACAAGAATCTTAAGAACTACTATATATGTAT
ATCATCAACGTATGACTCTTACAATGTAGGTGAAGGATTCTTCATTGATTGGCCAATGAAGGT
GGTATAAAATGTTAGTACTAGTAGGAAACCTTTGTGTGAACATCTTTTCTTCAAATGTTG
TTTTGACTATTTCCGTTCTTTAATAGATGATGTTGTTGAATTTTGACATAATGTTTAAACAATCTA
TCTTATTATTAGTGAAATATGTAAAGTACAAGCCATGAATTTTAGAAGTATTACTAGAACTT
TCAAAATTTAGACCACCGAATATGAATCAAATTCATGTTGCAGGAGAGTAGGAAAAA
GACATGTGCTTTCATCTGTGTGTGCGGCAATATCGAACTCGTACTCGCGATCCGAATGCTA
CTTGCGCCAGGATGGTTTTGCAACAATTGCATACTAGTTATATAAGACTTATAATGTTAATATT
CTAGTTACAATATAATTACAGTATAATTATATTTTATTTGAAAGTTATAACTTAAAAA
AAAGTAACATATGTACTTTTTGATGATAAAATAATTCACAGTAAATAACATTTATATAAATATT
TGGATAAGATAAATGATCAAACATCATTTATATAATCAATGACGTTACTAAAAAAGTGGAG
AGTACGTAGCTGGGTTCTACATCTACTGATCCAATCGTGTGCATCCAAGGGGTGGTAGCGATTC
CTGCCGTGGTGGCGCCTTTAGAGCAAGTTATAGCCAACACTAACTTCAATTCATCTATAACT
AATCTAATAGCTCATTTATACAATAATTACATACTACACTATTAATATCTGGTCCCACCTGTCAT
ACACACACTGTATCTTAAAGTTTGTGCTACAGCTGGCTATAAATCTGTAGCCCGCTGCTCTTCT
CTCTCTTATTTGCTTCTTAAATATGTTTGCAGCTGGTTTATAGCCTACTATTGTACCTGCTCT
TAAGTTACATCAGGCCGGTGTCAATTAGGCAGGCAAGGCTTAGCTAGCTAGCTAACAAACT
CCCTCCGTATTTAATGTATGACGCCGTTGACTTTTCGATCAACGTTTACTATTTGTTTTATTCA
AAATTTTGTGCAAATATGAAAATATTAATATCATGCTTAAAGAACATTTGATGATGAATCTAG
TCACAATAAAAAAAGACAATTACATACATTTTTGAATAAGACGAATGGTCAAACGTTGGAT
AAAAAGTTAACGGCGTCTACATTAATATGGAGATAGTACCAAATAAGTAACTGCCAATT
ATTAACAGAGCGGCGATCATCAACAAATCGTTGTGAATTAATCCAAGCCGTCCATCTTCAACCG
TCACTGTCACTCGCCACACTATAAATAGCACCAATCCACCCACATATTAGCAAGCAAAG
CAAAGAACTTCCCTTGCACCACCCTGATCGGAGAAGTAGCTAGCTGCAGGAGAGAAACCG
ACCAACAATG

OsASR3

Sequência TIGR: LOC_Os01g72900

CTGTTGAACAACGGCGCCAGCCACTCTGGCGCCCCAAAAGGACCATTTTATAGGATAAGTTTT
TCTAGGGGTCTACTTGCGAATAAGTTTTTCAAAGGACCAAATGTGAAAAATCCAGATATT
GAGATCATATTTGGTACAATTCTAGATTCAAGATTTTTGGAAGCCAGATATTCCTAGCTTTACA
AATCCACGAATCTGGATATGTGATTATATATATTGATAATATTTGAATGAATCATGTTGTTGTT
AATTACTTTAGAACAATATAGAATTTTCAACCAATTTAATTTAACTTATAAAATCTAAATCTGG
TGTGGGTATGAGATCTAGAGCTGTGCCATACGGGATCTGAATACCCTGACAATGAGAACATA
ATATGTATTCTTATTTATTTGTACATACAACTATACTACAAGAACGAGAGCTATGCACTCA
GCGATGACAACTAACGAACAATAACAAGTATATACACATATATAGCACATACGATGACGAC

GGAGAGGTATATATCTCGATGGGCTAATAATATATACACACGAGACATCAACATGCAAGATGC
TTAAAGGTAGCAATGCACGAATGGATGGGATGGATTAGTGGTGGTGGTGGGCATGGCGGCG
GTGCTTCTTGCTTCCTTCTTCTCGTGGTGTCTCGTGGAGGGCGAATCCGGCGCTGCCGACGGC
GACGGCGGCGGCGATCCCTTCTTCATCTTGTGCGACCGCGCGTGTCCGGTCTTCTTCGCC
TGCTTCTTCTCATGCTGCAGCACACCATGCATACAGATGCGTCAGATCATTAGCAGTGCTACTA
CTAATTAATTAATTAAGATCATTAGCTAGCTAGAAGCTAATTAAGTACGTAGAATCAAGAACA
CAATGTACGTATATGTACCATGGCGTATGCTCCGGCGGCGGCGGCCGAGCTTGGCGATCT
GCTCCATGTGCTTGTGGTGTCTTCTCCTTGGCGATAGTCGCCGGCGTCTTGGGCGCCGCC
GGCTGCTGCCATCTTCTCCTCGTTCTTGTGGTGGCCGAACATCTTGTGTACGTACGTACGGGGA
AATTTAGTTAGCTAATTAACCAGGAGATCAATCGATCGATATGTAGGCAGATTGATGATGCAG
GTGTGGTCGATGAGATGAGATGAGATTTTGGCAGGGGTTAAGATGAGTATATATAGGAGCA
GGATGGCGCGTAAATTATTAATTGCAGGAATTAGCTACTCGGCCGTACGTTAATCCGTTGAAA
TGATCTTCATTTGCTTACGCGGGCAGGGCAGCCGATTGATCGACAGTGTGGATTGGTGGATT
AGTTGGTTGCTTCAGAGCGAATTATCCAAGAGGATCGAAGCTTACGAGGAAGGTGCATAAAA
AAACATACTAGTACTAATATTGCATTAGCTTCTTTTTTTTTATCTCTATTGCCTGGACTCTTCAA
GTGGATTGAAGTACGTCTGAAACATCCATCACAAAAATTGACAGGTATAACTACCTGGTTGAA
ATAGCTACTGCTGAAATTAAGGAAATCGGCGGCTCGACGCGTTAAGCATCCACAGAAAA
AAAAACTGATATTATTAATTAATACTGATGTATATATACAAGGGGGGAAACAAAATTGTCCCCT
TTCGTTAGAATGGATATGATGGATCGATGGCTGGGCTGGGAGATTAAAGCACGGCCACACG
TACGTAACGTATACGTACGTACAACGTATATCTGGGCCGGCTTCTGCTGCCTTCGTATACCCC
GGCCATACGTGTTACGTGTTGTGCGCACAAAATTTGCTTGTATCGCGTTTCGCGTCTATACGATG
ATAAGCGAGCGAGAGTCAACAGAAATGCGCGTTGCTAATTCTCGTTAATCAATCGATTGCGT
GCATGGAAAATTTCAAGTTTCAAGTTAGGAGTAATTTGCAGGCCGACATGGCCGTGTTGATC
TTGCCCGCGTTAATTAGCAAACACTATATATAAGGACAAGCATGCAGGGCCTCTCCTTCCATCC
AACCATCACACACAGTTAGCATATCAGTAGTCGTTACAGTTAGCATATCAGTGCATCATAAAC
TTGACCTTGGCTCGATCGTACAATCCATCACAATAAAGATAGTGGAATG

OsASR4

Sequência TIGR: LOC_Os01g72910

TTTGAAGAGCGTGCAGCGCAGAAAACAAGGAAGGTGAGTTGGGAAGTGAATGGAAAAAACA
CAGCTGCATGGTAGTGACGGCTTTGGTTTGGGTGCTGCATGTTTATTGGGATAATGTATGGTG
GAAACCACATGCAGCGGAAACTTGAAGCTATCGTCGGATCGAAAAATAGAGGTATGTGTAA
AAAAATTTCTCGTGATGACGTGAACGAATATTAGACGTTTATTTTTCGATCCAATGGTAGTTT
CTATGTTATTGTATATGTAGTTTGCAGTATATATTTTCTCGTTTATTTGTTGCAACGTGTGTAA
TTTTCCGAGGGCTACTAAATCATTGAGTACTGTTTTTTCGGGAGAAGATTCTACTGCCTAAA
GTTTAGCTGTTCTGCGCAATGGCATGAGCGCATACTAACTGTAACACAATCAATCACATTA
TTATTAAGAAAAATAGATAGATGATGTACATGTATCCGTCGACAAAAATACAGCCGATATGCT
AGCTAAGAGTACATGCATGGTAATAATCAAATAAATAGACACACTAGTCCAGTAAGTAGTGAT
AGGGTAGGTAGCTAATGGTATGGCCATGCTTCTTAGCTTCTTCTTCTTGTGATGCTCGTGGA
TGCGGAGGCCGACGCTGCCGGCGGCGATGGTGGCGGCGATCTCCTCCTTACCCTGTGCGAC
CGCGCATTCTCCGGTTCTTCTTTCGCTTGTGCTTCTCGTGTGACCCACACACGCATCATCAA
ATCACAAGTTAAGAACTGACATTGGGATGCATGCATCAAAGCACACCAACATGTACAATTC
ATGGATGCACTTAGGATCGATCTTTAGTTGAAAATGGTAAGTACCATGGCGTATGCTCCGGCG
GCGACGGCGCCGAGCTTGGCAAGCTGCTCCATGTGCTTGTGGTGTCTTCTCCTTTCGCGTGG

TCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTTGTCTGCTTCTTGTGGTGGTGGCCCATTTCCACTATCT
TTAGTTGTGATGGATTGTACGATCGAGCCAAGGTCAAGTTTATGATGACTGATATGCTAACT
GTGAACGACTACTGATATGCTAACTGTGTGTGATGGTTGGATGGAAGGAGAGGCCCTGCATG
CTTGTCTTATATATAGTGTGGCTAATTAACGCGGGCAAGATCGAACACGGCCATGTCGGCCT
GCAAATACTCCTAACTTGAACTTGAAATTTCCATGCACGCAATCGATTGATTAAACGAGAA
TTAGCAACGCGCATTCTGTTGACTCTCGCTCGCTTATCATCGTATAGACGCGAAACGCGATCA
AGCAAATTTTGTGCGCACAAACACGTAACACGTATGGCCGGGTATACGAAGGCAGCAGGAAG
CCGGCCAGATATACGTTGTACGTACGTATACGTTACGTACGTGTGGCCGTGCTTTAATCTCCC
AGGCCAGCCATCGATCCATCATATCCATTCTAACGAAAGGGACAATTTGTTTCCCCCTTG
TATATATACATCAGTTAATTAATAATATCAGTTTTTTTTCTGTGGATGCTTAACCGCGTCGAG
CCGCCGATTTCTTTAATTTCCAGCAGTAGCTATTTCAACCAGGTAGTTATACCTGTCAATTTT
GTGATGGATGTTTCAGACGTACTTCAATCCACTGAAGAGTCCAGGCAATAGAGATAAAAAAA
AAAGAAGCTAATGCAATATTAGTACTAGTATGTTTTTTATGCACCTTCTCGTAAGCTTCGATC
CTCTGGATAATTCGCTCTGAAGCAACCACTAATCCACCAATCCACTGTGATCGAATCGG
CTGCCCTGCCCGTAAGCAAATGAAGATCATTCAACGGATTAACGTACGGCCGAGTAGCTA
ATTCTGCAATTAATAATTTACGCGCCATCCTGCTCCTATATATACTCATCTTAACCCCTGCCAA
AATCTCATCTCATCTCATCGACCACACCTGCATCATCAATCTGCCTACATATCGATCGATTGATC
TCCTGGTTAATTAGCTAACTAAATTTCCCGTACGTACGTACACAAGATG

OsASR5

Sequência TIGR: LOC_Os11g06720 (Sequências de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da região promotora estão destacadas.)

CTTATATGTAGGACATACTTGAATATCCTTCTTGGCCGATTACACTTGAAAACCATAAAAATTC
ATTGTTAGTGATATATATTAGGAATAATCCGCAGTCCAAAACATATGAGTGAGCAAATGC
TACTTGAACCTTAGTGCCATAATTTAGAGTGAACGTAGCTCAACTAGTCATGTTTTCTTTGAT
GGAACAACCTATCCGAGTTCAAGTCTATACTTAGATATAGGTGCACATATTTACGACTAATTA
TTCTTTCAGTGGTAGACGATGAACCTGTGCGATAACGAGACGTTACAGGGACTTTGTCAATAT
CAAGATATGTCCATTTAGTCTTCTTGTGATGTGCCACAAGGGATAGGATAAGCGCGTGTGTTG
TAAGAAACACTAGTTCATTTGATAAGCTTGTATTTGCACTTTGCATCCTGATAGTCCCAAAC
ATAAGAATAGGGTGTACGCAAATGAACGGCCAAATCTGCTCATCACAAGGTGATTCATG
TGTTCCGATCCAGGGTGCGGGACATGCGCATGTTGGAGAAGATGGATATGTTTACAATAACA
AAAAAAAATCTAACCCCATGCAGGTTATCTTCATATATTCCAGTTAGTTCCATTCTTAGTCC
TACTGATACTATATGTTGTGAAGCTACACCGTTGGAATCAGCAGGGATCTTTTGTCTACTTT
GGATGGTATAGCTCCTATATAATATAGTTAGTATAGATTATATGTGTTTTCTAGTTGATTTCA
GTTGGGTGTTATCAGGAGGGAGATGCGGTTTATCCATAAACTTAGGGCCCCCTTGTGAAGCA
AAGGTTAAGAAAATAGAGGAATATGAAAACATGATTCTGATATGAATTCTACTACAAAACA
GATGATTGAAAATATAGGAAAAATATAAATGATTGTTGATTGAATCACGAAAAAATGT
AGGAATTAGATGAGAGGGATAGACTCATAGGAACTTTCCATGAGGTTAGACCTCATGTTAA
AAATCCTTCAAACTTATATGGATTAAGACATTTCTTATTAGAAAGTTTTCAATCCATGGTTTCA
AAGGGCTGTATAGAAAAAAAACCTACAAAATAAAAATGCTACAAAATCCAATAATACTTTT
CCTTCAATCAAAGGAGGTCATAAGTTTCTTATTTATTGTATGCCTATGGCAGAGATCGTAGAG
ATAACAATTTTCAATTATTGAAAGAAAATGCTTAATTAGTTGAGCTGCTACCTCGACTTCGC
GCGGCTTTATCCGGTGCAGGATTCGATCCTCGTTCACGCAAACAAATATCCCGTCCCGGTTTCATC
CGCACACGCTCTATCAGCGACTTGCCTACTACTCATCTGCGACACAAGACAAAAAAC

CATGTGGGGCCACATCAACCCAAGTAGTGTAGTGGTGGTGGCCTGCACACCGTCCATTGT
CCGCTCGCGGCGTACGTGTACGTGGATCGGTGGTACTACGTCTCCATCGATACATTTTTTATTT
TTGCCAATGCCATCTCTCTCTCAGGACGAATTAATCAATAATAATAATGCAGATGGCCAT
TTCCTTTCATGATTATATATATTGTTCTCTCCGTTCTAAAATATAAGCATTTTTAGTATAGTACCA
AATCAATCATTTTTAACATTAATTATTAATAGAAAAAATAAAAAAAGATCAACCATGTAAAAT
TAATATTATTAGATTTTATCATTAACTATTATAATATGTAACCTTTTTTATTTAAAACATT
TTATTTTTATAGATATGGTTAGTTAAAGTAGCATCTTAAAGACTACGTGAAAATCTAAAAATGA
TTATTTTTGGAACGAAGAGATTATTAATTAATCCAAGTTAACACCGGATTAGTTACTACTCCA
GTAAGCTAGCTTTACGCCTACGGTACTTTAGCTCTTAAACGGTGGCCTCCGCCTATAAAAAGCA
GGCCAGTAGGACGCCAATAAGCAAGCAAGCAAAGCCACATCTTATTGTCACCTCCATCTCATT
CTCCTAATTGTCATCACTAGCTTCTAGCTAGCTTAATTAATTAATTAGCCATG

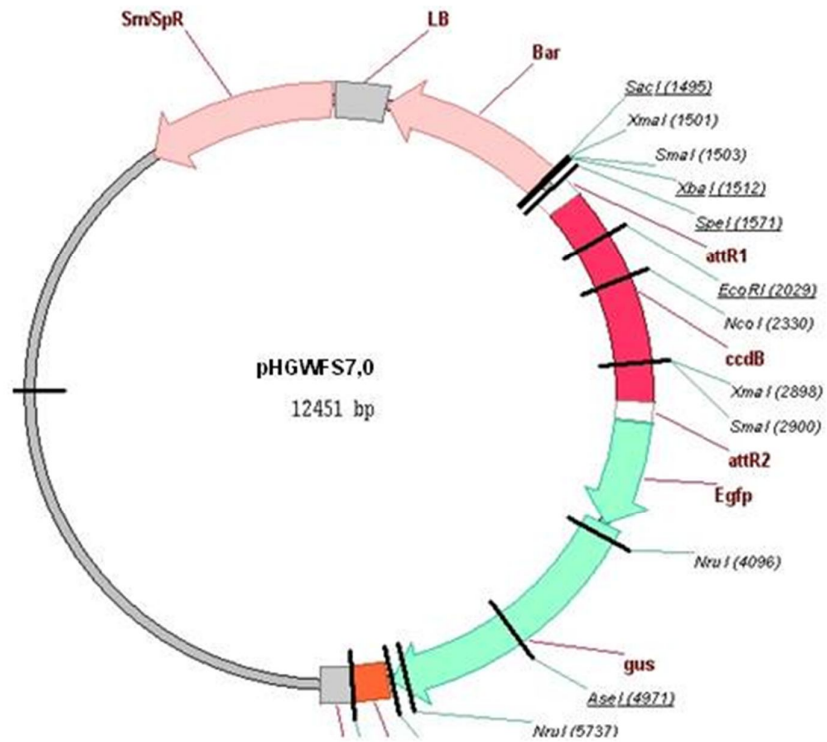
OsASR6

Sequência TIGR: LOC_Os04g34600

GTACGGCTAACGTGTATAAGGTTCTGAAATCATTGTTCTGAAGAAGGATTATATCTCCTTAAGG
GGCGTGGTGCAGTAATCACAGATTTTATGCTGATAGGTAACCTTTGGTAATAAGCTAGCAACT
GCGGCGATGACTTGTAGGCTAACGTGCATGAATACGTGATATGAGAATGTGACTTGCTTTGTA
GCTCTTACTATCAGCTAACTGGAACTAGAGAAGCAAATTTGTGTAACCTTTGTTTGATCACTT
TATGGTCACGGACCAATAGCCACTGAACATCTGCAACAGGGTAAAAAATTGTGCAGAAGGA
GTATATAATTGCATATTTACCGGTAGGGATTCATGCAGGGTCTGTAGGAAGTACCAGTAAT
TAAACCTTTTCATCACCTATATATCAAGCACTGTGAAGTATAAAGATTTTTTTTTTCATGATGAG
GTGTTGTGGTAGGGAATATAGTACGGCTAATTATTCTTTAATAGTAAATGATGTACCCGTTATC
AGTAAGACATCTATCATGACTTTATAAACTTAAGATATATATATGCCGACCTAGCATTGAAA
GTGCTTATGTATGATTTATAGGAATGAGTGTGTGTTTATATGAGTGTGCATCCAATTTGG
AACCATGCCATTGTAATTTTGCAAAGTTGAGATATGCCATCGGTATCTCAATGACATGTAGGA
CCCACATGAGTCAATGACATGTGGGTCAGGATGGCATATCTTAAATTTGCAAATTTATAGGT
ATGGTTCCAATTTTCCCGTAGTGTGTGTGTGATTTTTTTTTAAAAAACAGAGGGG
TGAGTCTTGAGAGAGGAAGTCGGTCTCATCAGAGTACTCTGCACGTCTGAAGAATGTGCTCA
ATCTTTAACAGTGGTGAAGAAAAAAGTCTATTTATCTCCTCTGCAGAGACGGCAAAATTGCG
TTGAATAGGATGCATGGCCATCACCTAATCCCATCTTTGCACTTCTATATATAATATATGCAA
CTGTTTCTTGATATATAGAGAGAGATTACTGTAATCCATGATCCGATGCGATCATGCATGTT
GCCAAGGAAGCAATTAAGCTAACTCTGAACAAATATCTCCACTAACACACTGGTAGAGTAGT
ATATCTGTCATCTCAGCATCTGGTTGCGAATGTTTATTGGCTCAAATCAGTCGTGAAATGCC
TGATTTTGTGCTAGAAAACAATATCCCTGACTCACTCAACATTATGTATGCAGATTTTGTCTA
CTCTGTCCACACTTTGTGGCCTCATGGCATCAAGAGCAAGTAATCTCCTTGATGCTGAGAATA
AACCCCATCCAATAATATTTTGTGGTCCAACCAATGACACCGACATACAATAAGAACTAT
ATCTAATTCCTGTTTGCAAAAATATCAAGGTGTTAGACTGATTAATTGCCAGTAATTTGATTT
AACCTTACGTGTACACCATATTAGCCACAATAACCCAACGCTACCTGTGAAGCCATATTTGCAT
CATCGTTCCACTTATACTTATTCGAGCTACTTATTAATAATTTAAATAATTTATTAATAATGT
TGTAATAAACTGTGGTAAAAGAACTACTCCCTTCATCCCTAAATATAAGTGATTTTGGTTGG
ATGTGACATATCCTAGTACAATGAATCCAGACAGACTCTATATCTAGATTCATTATATTAGCAT
GTTTAGAGACGAAGAGAGTACTAAATTAACCTAAAGTTTAAAGATATTACATTTAGTTT
ATAAGCATAAGCATATACTACAAAACAATAATTAGCTTTGATCAGCTTGCTCCCTGCTATAAAT

ACTTCACGTTGCTGTGTTTCATAGAAACACGGTGCAAAGTGTGCAGCGAACTCGATAAACATTA
AACAAGCTGTGTGAACCTCTTTTTTCGTGACAAGTTTAATTCTTTCTCGATCGATCGTCGTGATG

Anexo 2 – Mapa do vetor pHGWF57



Anexo 3 – Meios de cultura para a obtenção e transformação de calos embriogênicos de arroz e regeneração e cultivo de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare)

	Componentes	Concentração (mg/L)
Macronutrientes N₆	(NH ₄) ₂ SO ₄	460
	KNO ₃	2.830
	KH ₂ PO ₄	400
	MgSO ₄ .7H ₂ O	190
	CaCl ₂ .2H ₂ O	170
Micronutrientes N₆	MnSO ₄ .H ₂ O	3,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
	H ₃ BO ₃	1,6
	KI	0,8
Fe-EDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA	37,2
Vitaminas N₆	Glicina	0,2
	Tiamina	0,1
	Piridoxina	0,05
	Ácido nicotínico	0,05
	Mio-inositol	100
Aminoácidos	Caseína hidrolisada	300
	L-Prolina	3.000
Açúcar	Sacarose	30.000
Hormônio	2,4-D	2
	pH	5,8
Gelificante	Fitagel	3.500

Anexo 3.1. Meio de cultura para indução de calos em sementes de arroz (*Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare): meio N₆D

	Componentes	Concentração (mg/L)
Macronutrientes N₆	(NH ₄) ₂ SO ₄	460
	KNO ₃	2.830
	KH ₂ PO ₄	400
	MgSO ₄ .7H ₂ O	190
	CaCl ₂ .2H ₂ O	170
Micronutrientes B5	MnSO ₄ .H ₂ O	7,6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	H ₃ BO ₃	3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,039
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	KI	0,75
Fe-EDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA	37,2
Vitaminas B5	Tiamina	10
	Piridoxina	1
	Ácido nicotínico	1
	Mio-inositol	100
Aminoácidos	Caseína hidrolisada	300
	Glutamina	500
	L-Prolina	500
Açúcar	Sacarose	30.000
	pH	5,8

Anexo 3.2. Meio de cultura de tecidos de arroz (*Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare): meio de proliferação de calos NB sólido

	Componentes	Concentração (mg/L)
	MS (Invitrogen)	4.300
Vitaminas B5	Tiamina	10
	Piridoxina	1
	Ácido nicotínico	1
	Mio-inositol	100
Açúcar	Sacarose	30.000
	pH	5,8
Gelificante	Fitigel	2.500

Anexo 3.3. Meio de Murashige e Skoog (MS) para cultura de plântulas de arroz (meio de cultura universal para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais)

	HTC	NBA	Pré-regeneração	Regeneração	MS
Meio	NB	NB	NB	NB	MS
2,4-D	2 mg/L	2 mg/L	-	-	-
Fitigel	3 g/L	3 g/L	4,5 g/L	4,5 g/L	2,5 g/L
Higromicina	50 mg/L	-	-	-	50 mg/L
Timentina	150 mg/L	-	-	-	-
Cefotaxima	200 mg/L	-	-	-	-
Aceto- seringona	-	19,62 mg/L	-	-	-
BAP	-	-	2 mg/L	3 mg/L	-
ANA	-	-	1 mg/L	0,5 mg/L	-
ABA	-	-	5 mg/L	-	-

Anexo 3.4. Meios de cultura de tecidos de arroz (*Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare)

	Componentes	Concentração
Macronutrientes	KCl	0,1 mM
	KH ₂ PO ₄	0,1 mM
	K ₂ SO ₄	0,7 mM
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2 mM
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 mM
Micronutrientes	MnSO ₄ .H ₂ O	0,5 µM
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01 µM
	H ₃ BO ₃	10 µM
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5 µM
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 µM
Fe-EDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	100 µM
	Na ₂ EDTA	100 µM
	pH	4,5

Anexo 3.5. Solução nutritiva hidropônica para plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subespécie *Japonica* cultivar Nipponbare)