



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CELULAR E MOLECULAR

Análise funcional dos genes ASR - Abscisic acid, Stress and Ripening - de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta ao estresse por alumínio

Rafael Augusto Arenhart

Porto Alegre, agosto de 2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Análise funcional dos genes *ASR - Abscisic acid, Stress and Ripening* - de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta ao estresse por alumínio

Rafael Augusto Arenhart

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Margis

Porto Alegre
Agosto de 2008

INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCIADORA

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

A agência de financiamento do Projeto de Pesquisa em que se enquadra o presente trabalho de mestrado foi o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, meus pais Waldomiro e Miyoko, e minha namorada Lisangela (Lisi) pelo carinho, amor e apoio. Ao meu orientador da graduação Dr. Gilmar Roberto Zaffari, pelos ensinamentos iniciais e vitais na minha formação acadêmica. À minha orientadora, Dra. Márcia Margis e ao meu co-orientador Dr. Rogério Margis, pelos ensinamentos, compreensão e puxões-de-orelha que foram dedicados a mim; ao meu grande amigo Júlio César de Lima (Jack Bauer), meu co-orientador (não formalmente, mas no dia-a-dia); aos meus “*brothers*” do laboratório Rafa (Casudão), Lauro (PG ou CB), Tio Rene, Alex (Alecsandro), Gustavo (Ronin), Roberto Ranzinza Farina, João (John), Ruivo Hering (recessivo) e as meninas do Lab. Agradeço aos meus amigos de Camboriú Ricardo (Vela), Mauro (Beppi), Cristiano (Teschma), Nene, Valeska e Fran. Aos meus amigos Giovanny Mazarotto (Rondonense), Salvador (mestre Splinter), Tiago (Mintira) e Luciano (Bacana); aos meus amigos da liga do X Adriano Silvério, Érika, Paulo e Anderson. Enfim, valeu a todos e obrigado por existirem. Vocês tornam minha vida feliz e fácil de encarar.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	10
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Arroz: o modelo de estudos em monocotiledôneas.....	18
1.2 Toxidez por Alumínio.....	19
1.3 Ácido Abscísico (ABA).....	25
1.4 ASR (<i>ABA Stress and Ripening</i>).....	28
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Tratamento com Alumínio.....	34
3.2 Tratamento com ABA.....	34
3.3 Extração de RNA total.....	35
3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	36
3.5 qRT-PCR.....	37
3.6 PCR.....	38
3.7 Clonagem em Vetor de entrada pENTR	39
3.8 Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	40
3.9 Obtenção dos vetores de localização subcelular.....	41
3.10 Obtenção do vetor de silenciamento gênico (RNAi).....	42
3.11 Minipreparação de plasmídeo (Miniprep).....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Análises da expressão dos genes ASR em condições ótimas de cultivo e em resposta ao alumínio.....	45
4.2 Análises da expressão dos genes ASR em resposta ao fitormônio ABA.....	53
4.3 Obtenção de um vetor binário de transformação de plantas para o estudo da localização subcelular da proteína OsASR5.....	55
4.4 Obtenção de um vetor binário de transformação de plantas para o estudo do silenciamento gênico da família ASR de arroz.....	60

5. DISCUSSÃO.....	63
5.1 Construção do vetor de localização subcelular e silenciamento gênico.....	63
5.2 Expressão dos genes <i>OsASR</i> em resposta ao tratamento com ABA.....	65
5.3 <i>OsASRs</i> são reguladas por AI.....	67
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

40S - *Rice 40S ribosomal protein* (proteína ribossômica 40S de arroz)
ABA - ácido abscísico
ASR – *ABA, stress and ripening* (ABA, estresse e amadurecimento)
°C - graus Celsius
C15 – 15 carbonos
Ca²⁺ - íon de cálcio
CaMV - Cauliflower mosaic virus (vírus mosaico da couve-flor)
cDNA – DNA complementar
CH₃COONa – acetato de sódio
cv - cultivar
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleosídeos trifosfatados = desoxirribonucleotídeos
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
eF – *elongation Factor* (fator de alongação)
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST – expressed sequence tags (seqüências-marcas de genes expressos)
FDH – formaldeído desidrogenase
Fe – ferro
GA – Giberilina
GFP – proteína de fluorescência verde
h – hora(s)
HPT – higromicina fosfotransferase, gene de resistência à higromicina
IMPDH - inosina-5 ϕ -monofosfato desidrogenases
K⁺ - íon de potássio
L - litro
LB – meio de cultura Luria Broth
LeASR – *Lycopersicum esculentum, Aba, stress and ripening*
M - molar
mg – miligrama
Mg²⁺ – íon de magnésio

ml - mililitro(s)
mM - milimolar
Mb – mega par(es)-de-bases
mg.L⁻¹ – miligramas por litro
mRNA - RNA mensageiro
MS – meio de cultura de tecidos vegetais de Murashige e Skoog
NLS – *nuclear localization signals* (sinais de localização nuclear)
nm – nanômetro(s)
NOS – nopalina sintase
NPTII – neomicina fosfotransferase II, gene de resistência à neomicina e derivados (canamicina)
nt – nucleotídeo(s)
Os - *Oryza sativa*, arroz
OsASR – *Oryza sativa- Aba, stress and ripening gene* (gene ácido abscísico, estresse e amadurecimento de arroz)
OseF – *Oryza sativa-elongation factor gene* (gene fator de alongação de arroz)
OsFDH – *Oryza sativa-formalde-hyde dehydrogenase gene* (gene formaldeído desidrogenase de arroz)
pb – par(es) de bases
PCR – reação em cadeia da DNA polimerase
PEPC - fosfoenolpiruvato carboxilase
pH - potencial hidrogeniônico
Pi – fosfato inorgânico
poli-T - oligonucleotídeo de desoxitimidina
qRT-PCR – PCR quantitativa em tempo real
QTLs – *quantitative trait loci* (lócus de tratos quantitativos)
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – RNA de interferência
rpm – rotação(ões) por minuto
RT – transcriptase reversa
SDS - dodecil sulfato de sódio

TCTP - *Translationally controlled tumor protein* (proteína tumoral regulada a nivel traducional)

μg - micrograma

μL - microlitro(s)

μM – micromolar

UBI - ubiquitina

V - volume

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Plasmídeo pH7CWG2.0 (Invitrogen) para estudos de localização subcelular em tecidos vegetais.....42

Figura 2. Representação do vetor pANDA segundo Miki et al. (2005).

PstI, *HindIII*, *EcoRI* e *Sall*= sítios de restrição do vetor; *NPTII* e *HPT*= genes de resistência a Neomicina e derivados, e higromicina respectivamente; *RB*= Right border; *LB*= Left border; *Ubq pro*= promotor ubiquitina; *NOST*= terminador do gene nopalina sintase; *gus linker*= seqüência do gene codificador da β -glicuronidase de *E. Coli*; *attR*= sítios de recombinação.....43

Figura 3. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em raiz e parte aérea. O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. Os tecidos foram coletados a partir de plântulas de 12 dias crescidas em meio hidropônico sem tratamento com Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em parte aérea. *Shoot* corresponde à parte aérea e *Root* corresponde às raízes, respectivamente.....47

Figura 4. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. As raízes foram coletadas após 4 e 8 h de tratamento com 20 mg.L⁻¹ de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em plantas controle (4 h de tratamento).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e Al 4h e Al 8h correspondem às plantas tratadas por 4 e 8 h, respectivamente.....48

Figura 5. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. As raízes foram coletadas após 4 e 8 h de tratamento com 60 mg.L⁻¹ de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em plantas controle (4 h de tratamento).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e Al 4h e Al 8h correspondem às plantas tratadas por 4 e 8 h, respectivamente.....49

Figura 6. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total da parte aérea foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. A parte aérea foi coletada após 4 e 8 h de tratamento com 60 mg.L⁻¹ de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em plantas controle (4 h de tratamento).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e Al 4h e Al 8h correspondem às plantas tratadas por 4 e 8 h, respectivamente.....51

Figura 7. Determinação do nível de expressão do gene *OsASR5* de arroz subespécie *indica* em resposta ao tratamento com Al (60 mg.L⁻¹). O RNA total das raízes foram utilizados para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. A raiz foi coletada após 8 h de tratamento com Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*.

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e A1 8h corresponde às plantas tratadas 8 horas.....52

Figura 8. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com ABA. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. A raiz foi coletada após 1, 6 e 10 h de tratamento com 100 µm de ABA. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes, *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR6* em plantas controle (tratamento 10 h).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e ABA 1h, ABA 6h e ABA 10h, correspondem às plantas tratadas por 1, 6 e 10 h, respectivamente.....54

Figura 9. Confirmação da clonagem do cDNA de *OsASR5* no vetor de entrada pENTR. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones pENTR contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers OsASR5 (forward e reverse)* foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 417 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **P** = controle positivo (plasmídeo pGEM T-EASY contendo o fragmento); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **N+** = colônia positiva; **N-** = colônias negativas. *E. coli* XL-1-Blue foi usada nas transformações.....57

Figura 10. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pH7CWG2 para o estudo de localização subcelular do produto gênico. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers OsASR5 (forward e reverse)* foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 417 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **p** = controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **n** = controle

negativo (plasmídeo vazio); **N+** = colônias positivas. *E. coli* XL-1-Blue foi usada nas transformações.....58

Figura 11. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pH7CWG2 para o estudo de localização subcelular do produto gênico. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 500 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **p**= controle positivo (plasmídeo pH7CWG2); **n** = controle negativo (plasmídeo pENTR); **N+** = colônias positivas. *E. coli* XL1-Blue foi usada nas transformações.....59

Figura 12. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pANDA para o estudo do silenciamento gênico da família ASR de arroz. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 500 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **p**= controle positivo (plasmídeo pH7CWG2); **n** = controle negativo (plasmídeo pENTR); **N+** = colônias positivas. *E. coli* XL-1-Blue foi usada nas transformações.....61

Figura 13. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pANDA para o estudo do silenciamento gênico da família ASR de arroz. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. O *primer OsASR5* (*reverse*) foi utilizado na reação produzindo um fragmento de 2.000 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo pANDA vazio); **N+** = colônia positiva; **N-** =

colônias negativas para os 2 insertos de <i>OsASR5</i> . <i>E. coli</i> XL1-Blue foi usada nas transformações.....	62
Figura 14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas da família ASR de arroz utilizando o programa de análises <i>BioEdit</i> ,(Ibis Bioscience ©) mostrando o domínio WDS conservado entre os membros.....	64
Figura 15. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos membros da família ASR de arroz com ASR1 de tomate, utilizando-se o programa de análises <i>BioEdit</i> (Ibis Bioscience ©).....	70
Figura 16. Comparação das seqüências de aminoácidos de ASR5 de arroz com ASR1 de tomate, realçando-se o sítio de ligação a DNA dependente de zinco e sítios de ligação a íons de zinco em tomate e possíveis sítios em ASR5 de arroz.....	71
Tabela 1. Localização, tamanho do íntron (em pb), e da proteína (em aminoácidos) dos genes ASR em arroz (monocotiledônea) e tomate (dicotiledônea). Extraído de Frankel et al. (2006).....	31
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas análises de expressão dos genes <i>ASR</i> por qRT-PCR.....	38
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados na amplificação de <i>OsASR5</i> , para clonagem em vetor de entrada pENTR.....	39
Tabela 4. Comparação dos sinais de localização nuclear (NLS) entre proteínas ASRs de Lírio (U18972), arroz (AF039573) e tomate <i>Asr1</i> (U86130). Em cinza, aminoácidos idênticos a seqüência de LL23, e em negrito, tamanho total da proteína em aminoácidos.....	64

RESUMO

Um dos graves obstáculos para a manutenção e estabilidade da produção nacional de arroz (*Oryza sativa*) reside na susceptibilidade dos genótipos existentes a estresses abióticos. Tendo em vista a importância social e econômica do arroz e os efeitos extremamente danosos desses estresses sobre a agricultura, o conhecimento detalhado das interações entre os estresses abióticos e as respostas dos vegetais frente a esses estímulos ambientais faz-se necessário. O alumínio (Al) é considerado um dos principais fatores limitantes na produção agrícola, inibindo o crescimento das raízes e a absorção de minerais. A toxicidade do Al em plantas ocorre pela sua solubilização em solos com pH baixo ou solos ácidos. Os genes ASR (*ABA, Stress and Ripening*) são induzidos por estresse e ácido abscísico (ABA) em plantas, e seus níveis de expressão são rapidamente aumentados em resposta à salinidade e seca. Recentemente, foi demonstrado que o gene que codifica a proteína ASR5 é responsivo ao Al em raízes de arroz. Apesar do arroz ser considerado um dos cereais mais resistentes a Al, os mecanismos básicos de tolerância a este metal são pouco conhecidos no arroz em comparação a outros cereais. Por meio do presente trabalho objetivamos: i) a caracterização funcional dos membros da família gênica ASR de arroz em resposta ao Al; e ii) a construção de vetores binários de transformação de plantas visando o estudo da localização subcelular da proteína codificada pelo gene *OsASR5*, e o silenciamento gênico da família ASR de arroz. As análises dos transcritos por qRT-PCR mostraram que todos os genes da família ASR de arroz *ssp Japonica* respondem ao Al. Por outro lado, *OsASR5* não sofre modulação de sua expressão em resposta ao Al em raízes de arroz *ssp Indica*. Essas diferenças de respostas dos genes *OsASR5* em distintas variedades pode refletir diferenças no grau de tolerância ao Al de cada um desses genótipos.

Palavras-chave: Alumínio, família ASR, qRT-PCR, arroz, *Oryza sativa*

ABSTRACT

One of the major obstacles to maintain the stability of the national production of rice (*Oryza sativa*) lies on the susceptibility of the different genotypes to abiotic stress. In view of the social and economic importance of rice and due to the extremely harmful effects of stress in agriculture, detailed knowledge of the interactions between these stresses and plant responses to environmental stimuli is necessary. Aluminum (Al) is considered one of the main limitation factors for agricultural productivity, inhibiting root growth and mineral absorption. Al toxicity occurs by its solubilization in soils with low pH or acid soils. The ASR (ABA, Stress and Ripening) genes are induced by stress and abscisic acid (ABA) in plants, and their expression levels are quickly increased in response to salinity and drought. Recently, it was demonstrated that the ASR5 gene is responsive to Al in rice roots. Despite the fact that rice is considered one of the most resistant crops to Al, the basic mechanisms of tolerance to this metal are poorly known when compared to other crops. This study aimed the functional characterization of the gene expression of rice ASR family members in response to Al, and the construction of binary vectors for the subcellular localization of the protein codified by the *OsASR5* gene, and the construction of a gene silencing binary vector for the ASR family. Analyses of transcripts by qRT-PCR showed that in the ssp *Japonica*, all ASR genes responded to Al. In contrast, *OsASR5* do not suffer expression modulation in response to Al in rice roots of ssp *Indica*. These differences in response of the *OsASR5* gene in distinct varieties may reflect differences in the degree of Al tolerance in each genotype.

Keywords: Aluminum – ASR family – qRT-PCR – Rice, *Oryza sativa*

1.INTRODUÇÃO

Devido à sua natureza sésil, as plantas freqüentemente enfrentam condições adversas ou estresses bióticos e abióticos que, em muitas vezes, conduzem a uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares causando danos aos vegetais, reagindo com seu potencial genético e limitando seu crescimento, reprodução e a produtividade (MAHAJAN & TUTEJA, 2006).

Os estresses abióticos são a causa primária de perda de produção agrícola, reduzindo a produtividade da colheita de grãos em até 50% (BOYER, 1982; BRAY et al. 2000). Segundo Mahajan & Tuteja (2006), estresses abióticos causam a perda de milhões de dólares a cada ano devido à redução da produtividade de grãos, o que ameaça a sustentabilidade da agricultura.

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos que as permitem perceber essas condições adversas, ativando cascatas de tradução de sinais, que, por conseqüência, ativam genes de resposta ao estresse levando a mudanças fisiológicas e bioquímicas (GAO et al., 2007). Vários genes são ativados podendo mitigar o efeito do estresse e levar a um ajustamento celular e tolerância da planta (MAHAJAN & TUTEJA, 2006; RAMANJULU & BARTELS, 2002).

Os produtos gênicos podem agir também como reguladores de transcrição, controlando conjuntos de genes específicos de resposta ao estresse, ou estarem envolvidos na produção de moléculas regulatórias como o hormônio ácido abscísico (ABA; GRENNAN, 2006). Além disso, foi demonstrado que múltiplas rotas de sinais podem ser ativadas em resposta a diversos estresses, conduzindo a repostas similares. Hasegawa et al. (2000) demonstraram o acúmulo de metabólitos que agem como solutos compatíveis e antioxidantes em três estresses abióticos comuns: seca, baixa temperatura

e salinidade. Estudos realizados por Rabbani et al. (2003) demonstraram também sobreposição na expressão de genes entre diferentes tipos de estresses.

A identificação de novos genes e a determinação de seus padrões de expressão em resposta a estresses poderão permitir o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a tolerância a estresses em plantas (CUSHMAN & BOHNERT, 2000). A incorporação de novas ferramentas da genômica funcional poderá permitir o suprimento de genótipos com maior produtividade e resistência aos diferentes estresses ambientais, o que possivelmente poderá reduzir os custos e acarretar em uma maior estabilidade à produção agrícola.

1.1 Arroz: o modelo de estudos em monocotiledôneas

Considerado um dos cereais mais importantes do mundo, o arroz é cultivado e consumido em todos os continentes. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, chegando a uma produção de cerca de 590 milhões de toneladas. Segundo dados da EMBRAPA (2008), o arroz é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, possuindo um excelente balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária à dieta humana.

Por se adaptar facilmente a diferentes condições de solo e clima, o arroz é considerado a espécie que apresenta um grande potencial para o combate à fome no mundo. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas ao ano (EMBRAPA, 2008).

Planta-modelo de estudos entre as monocotiledôneas, o arroz é um organismo diplóide com 24 cromossomos e genoma de 390 megapares de bases (Mb), sendo o

menor entre os cereais, possuindo aproximadamente 32.000 genes com base em uma anotação acurada do genoma de *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* (THE RICE ANNOTATION PROJECT, 2007).

O genoma do arroz possui sintonia com o genoma de outros cereais, como milho e trigo (MOORE et al., 1995); protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* definidos (HIEI et al., 1994); disponibilidade de etiquetas de genes expressos ou ESTs (do inglês, *Expressed Sequence Tags*), e mapas moleculares saturados (INTERNACIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT, 2005; HARUSHIMA et al., 1998), fazendo do arroz um organismo modelo para estudos fisiológicos, genéticos e de evolução entre as plantas, em especial as monocotiledôneas (GALE & DEVOS, 1998; SHIMAMOTO & KYOZUKA, 2002).

Tendo em vista a importância social e econômica do arroz e os efeitos extremamente danosos dos estresses abióticos sobre a agricultura, o conhecimento detalhado das interações entre estresses abióticos e respostas vegetais se faz necessário, visto que um dos graves obstáculos para a manutenção e estabilidade da produção nacional de arroz reside na susceptibilidade dos genótipos existentes a estresses abióticos, dentre outros.

1.2 Toxidez por Alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre, compreendendo cerca de 7% de sua massa, e não é de regra um nutriente essencial, mas em pequenas concentrações pode ajudar no crescimento das plantas (FOY, 1983). A grande maioria do Al está quelada por ligantes, ou ocorrem em outras formas não tóxicas tais como

aluminossilicatos ou precipitados. A toxicidade por Al ocorre devido à sua solubilização em solos ácidos com pH baixo (abaixo de 5,0, ALAM & ADAMS, 1979; e BLUE & DNATZMAN, 1977). A acidificação do solo pode se desenvolver devido à chuva ácida, bem como quando cátions básicos são lavados do solo e, além disso, pode ser acelerado por práticas agrícolas (DELHAIZE & RYAN, 1995). Os solos ácidos ocupam 40% dos solos aráveis no mundo (KOCHIAN, 1995) e sua toxicidade é considerada um dos principais fatores de limitação da produtividade agrícola no mundo (MATSUMOTO, 2000).

A área de cerrado no Brasil ocupa quase um quarto do território nacional e concentra-se nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás. Os solos destas regiões, em geral, apresentam baixa fertilidade natural (GOEDERT, 1989), elevada acidez (FAGERIA & SOUZA, 1995), alta saturação de Al e reduzida disponibilidade de fósforo (FERREIRA, 1995).

Plantas cultivadas nesses solos estão sujeitas a estresse pela toxidez de Al através das raízes, as quais quando expostas a este nutriente podem ser inibidas em crescimento rapidamente, em minutos ou horas (KOCHIAN, 1995). O ápice da raiz é particularmente sensível ao Al (RYAN et al., 1993). Segundo Foy (1992), altas concentrações de Al interferem na divisão celular em raízes, aumentam a rigidez da parede celular, reduzem a replicação de DNA, diminuem a respiração das raízes, interferem com atividades enzimáticas, captação, transporte e uso de diversos nutrientes, como K^+ , Ca^{2+} , e Mg^{2+} , além de interferir na dinâmica do citoesqueleto, na síntese de beta-(1,3)-glicanas (calose), na peroxidação de lipídeos, e na transdução de sinal via inositol-1,4,5-trifosfato (MILLA et al., 2002). Al também induz a secreção de ácidos orgânicos como citrato, malato, e oxalato das raízes (DELHAIZE & RYAN, 1995) que por sua vez formam um complexo

estável com Al, prevenindo os efeitos tóxicos e fornecendo uma fonte valiosa de tolerância na maioria das espécies estudadas.

Em arroz, o excesso de Al induz sintomas semelhantes aos causados pela deficiência de ferro (Fe, CLARK et al., 1981). Os efeitos resultam em diminuição do crescimento e produtividade, devido à redução na absorção de nutrientes e água.

A incorporação profunda de corretivos e fertilizantes tem sido uma alternativa para recuperar a fertilidade destes solos; porém, essas técnicas não permitem controlar adequadamente o Al permutável na parte subsuperficial dos solos (FERREIRA, 1995). A toxidez de Al limita a produção do arroz, e de outras culturas que são cultivadas em solos ácidos, por inibirem o crescimento das raízes e a absorção de outros minerais (LIU & LUAN, 2001) e, conseqüentemente, por reduzir a produtividade (MILLA et al., 2002).

De modo geral, o arroz é uma espécie tolerante ao Al (FAGERIA et al., 1989; DUNCAN & BALIGAR, 1990). Diferentes genótipos de arroz foram selecionados em relação à tolerância ao Al em sistema hidropônico. A concentração considerada crítica para estudos genéticos foi de 20 mg.L^{-1} (FERREIRA, 1995). Segundo Fageria et al. (1988) o arroz, apesar de ser considerado tolerante ao Al, possui variabilidade entre os genótipos, sendo a tolerância amplamente divergente entre as cultivares.

A alta variabilidade da tolerância ao Al indica que algumas espécies de plantas desenvolveram mecanismos especiais de sobrevivência a condições de estresses (MA et al., 2001; DELHAIZE et al., 2001). Entre as estratégias de resistência estão a exclusão do Al do interior das células da raiz (mecanismos apoplásticos) e/ou a neutralização do Al tóxico dentro da célula (mecanismos simplásticos).

Os mecanismos apoplásticos de resistência mais conhecidos de resistência são a exsudação de ácidos orgânicos pelas células da raiz, ligação de íons Al na parede celular

e aumento do pH da rizosfera. Os mecanismos simplásticos de resposta das plantas ao estresse por Al são ainda pouco conhecidos. Um exemplo de mecanismo de resistência dentro das células é a quelatação interna de Al tóxico por ácido oxálico, descrito por Ma et al. (1997).

Ácidos orgânicos como malato, citrato e oxalato têm importante papel na detoxificação de Al^{+3} por formar complexos no citosol ou na interface raiz-solo, em várias culturas (MA et al., 2001), protegendo as raízes das plantas (DELHAIZE et al., 1993; MA & MYASAKA, 1998). O mecanismo molecular de tolerância ao Al em arroz não é conhecido, mas sabe-se que a secreção de nenhum ácido orgânico foi induzido pela exposição a Al, exceto citrato em pequenas quantidades, e não houve diferença significativa na detoxificação de Al entre variedades tolerante e sensível de arroz (MA et al., 2002), o que significa que, o arroz pode ter um mecanismo diferente de tolerância a Al, que não seja a liberação de ácidos orgânicos (CHUANZAO et al., 2004). Em estudos recentes, Yang et al. (2008) demonstraram o envolvimento do conteúdo de polissacarídeos da parede celular em ápices de raízes de arroz agindo na exclusão de alumínio.

Wu et al. (2000), usando técnicas moleculares, identificaram diversos loci de tratos quantitativos (QTLs, do inglês, *Quantitative Trait Loci*) conferindo tolerância a Al em populações de arroz das variedades Azucena e IR1552. Nguyen (2001) detectou 5 QTLs para tolerância a Al espalhados em 5 cromossomos. Em 2002, 10 QTLs para tolerância a Al foram localizados em 9 cromossomos usando uma população duplo-haplóide derivada do cruzamento das variedades CT9993 x IR2266 (NGUYEN et al., 2002).

Em trigo (*Triticum aestivum* cv Chinese Spring), genes para a tolerância à toxicidade de Al^{3+} foram encontrados nos cromossomos 6AL, 7AS, 2DL, 3DL, 4DL e 4BL,

(ANIOL & GUSTAFSON, 1984), e um par de genes no cromossomo 4 do genoma D, na cultivar BH-1146 (LAGOS et al., 1991). Além disso, em centeio (*Secale cereale*) também foram localizados genes para tolerância nos cromossomos 3R, 6RS e 4R (ANIOL & GUSTAFSON, 1984).

Os mecanismos responsáveis pela tolerância de AI são variáveis entre as diversas espécies e cultivares e, possivelmente, controlados por diferentes genes e diferentes rotas metabólicas (KHATIWADA et al., 1996; WU et al., 2000; NGUYEN et al., 2001).

Uma vez que mudanças na expressão gênica controlam os processos fisiológicos normais e são também efetores nas respostas celulares aos estresses bióticos e abióticos, estudos visando identificar os genes de resposta ao estresse por AI forneceram uma descrição inicial dos genes potencialmente importantes envolvidos nesse tipo de estresse. Diversos genes regulados positivamente (induzidos) sob condições de fitotoxicidade foram descobertos. O gene ALMt1 de *T. aestivum*, codificante de um transportador de malato, foi recentemente isolado de ápices de raízes da cultivar tolerante a AI (ET8), e a expressão heteróloga do mesmo aumentou a tolerância de células de tabaco ao AI (SASAKI et al., 2004).

Os seguintes genes foram descritos como regulados positivamente em resposta ao AI: Sali3-2 e Sali5-4 em soja (*Glycine Max*, RHAGLAND & SOLIMAN, 1997), Zmal em milho (*Zea mays*, MENOSSI et al., 1999), pEARLI8 e pEARLI1, pEARLI2, pEARLI4, e pEARLI5 em *Arabidopsis thaliana* (RICHARDS et al., 1998) e fosfatidilserina sintase em trigo (*T. aestivum*, DELHAIZE et al., 1999). Os genes homólogos a glutationa-S-transferase (GST) e fenilalanina amônia-liase (PAL) foram induzidos por AI e deficiência de fosfato inorgânico (Pi) em tabaco (*Nicotiana tabacum*, EZAKI et al., 1995).

Grande parte desses genes parece estar relacionada a respostas gerais a estresses, que são induzidos por diversas perturbações incluindo baixos níveis de fósforo, outros metais tóxicos, ferimentos, infecção por patógenos ou estresses oxidativos (EZAKI et al., 2000). Entre eles, está um gene que codifica uma proteína semelhante à metalotioneína wali1 (SNOWDEN & GARDNER, 1993) ou genes de função desconhecida tais como wali7 (RICHARDS et al., 1994) ou Zmal (MENOSSI et al., 1999). Com o objetivo de descobrir a função desses genes na tolerância ao estresse, alguns deles foram super-expressos em *A. thaliana* (EZAKI et al., 2000). Apenas o gene de *Arabidopsis* codificando a “blue copper binding protein” (AtBCB) e os genes de tabaco codificando uma glutationa-S-transferase (parB), uma peroxidase (NtPox) e um inibidor de GDP-dissociation (NtGDI1) conferiram alguma tolerância sob condições moderadas de estresse por Al. Em altas concentrações de Al, entretanto, as plantas transgênicas não foram superiores às controles na sobrevivência ao estresse.

Ermolayev et al. (2003) realizaram um estudo comparativo entre genes induzidos por Al em cultivares sensíveis e tolerantes de soja ao estresse, demonstrando que dentre 8 genes descritos como potencialmente relacionados à tolerância ao Al, apenas o gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) teve a expressão aumentada em raízes de plantas tolerantes quando comparadas às plantas sensíveis. Além disso, dois novos genes homólogos a proteínas de tumor (TCTP, *GenBank accession number* AF421558) e a inosina-5 ϕ -monofosfato desidrogenase (IMPDH, *GenBank accession number* AF421559) tiveram a expressão aumentada apenas em raízes da cultivar tolerante.

Milla et al. (2002) analisaram ESTs em raízes de *S. cereale* cv Blanco sob estresse por Al. Neste trabalho, treze genes novos envolvidos no alongamento e na divisão celular (codificadores da aquaporina tonoplástica e de uma proteína semelhante à ubiquitina,

SMT3), estresse oxidativo (glutathiona peroxidase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, e ascorbato peroxidase), metabolismo de ferro (IDS3a, IDS3b, e IDS1; S-adenosilmetionina sintase; e metionina sintase), e outros mecanismos celulares (proteína relacionada à patogênese 1.2, heme oxigenase, e epóxido hidrolase) foram reguladas pelo estresse por Al.

Em plantas, existem a princípio dois mecanismos de tolerância ao Al. A primeira classe permite à planta tolerar o acúmulo de Al em raízes e parte aérea, enquanto a segunda classe opera excluindo o Al do ápice da raiz, freqüentemente relatado pela exsudação de ácidos orgânicos (KIKUI et al., 2005).

Entretanto, o arroz, que apresenta a maior tolerância ao Al dentre os cereais, apresenta pouca capacidade de efluxo de ácidos orgânicos em resposta a estresse por Al (MA et al., 2002) e ainda apresenta pouco acúmulo de Al em raízes (WALLACE & ROMMEY, 1977), sugerindo um ou múltiplos mecanismos diferentes envolvendo vários genes (KHATIWADA et al., 1996; WU et al., 1997, 2000; NGUYEN et al., 2001), os quais, combinados, resultam na alta tolerância observada para esta espécie (KOCHIAN et al., 2004).

1.3 Ácido Abscísico

Considerado o fitormônio do estresse, o ácido abscísico (ABA) é um sesquiterpenóide (C15) sintetizado em plantas por uma rota indireta usando precursores de carotenóides (NORTH et al., 2007). ABA participa da regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, por todo o ciclo de vida. Além disso, responde a vários

estresses ambientais, incluindo seca, salinidade e frio (LEUNG & GIRAUDAT, 1998; FINKELSTEIN et al., 2002).

ABA possui papel crítico na resposta a vários sinais de estresse, e sua aplicação exógena em plantas mimetiza os efeitos de condições de estresses (MAHAJAN & TUTEJA, 2006). Em trabalhos de Xiong et al. (2001), Leung & Giraudat (1998) e Finkelstein et al. (2002), foi demonstrado que diversos sinais de estresses e ABA compartilham elementos em comum em suas rotas de sinalização, e estes elementos estão interconectados mantendo à homeostase celular. ABA atua em sementes inibindo a germinação em condições de estresse, previne a germinação precoce de embriões prematuros, e provoca fechamento estomatal sob condições de seca, o que previne a perda de água da planta (MAHAJAN & TUTEJA, 2006; YANG et al., 2005).

A função principal de ABA consiste na regulação do balanço de água e tolerância ao estresse osmótico. Diversos mutantes de *A. thaliana* para ABA (incapazes de responder ao ABA ou de sintetizar o fitormônio) foram descritos, os quais nas condições ideais de crescimento têm o desenvolvimento equivalente ao desenvolvimento de plantas controles (não mutantes). Entretanto, sob estresse hídrico, os mutantes para ABA não resistem ao estresse contínuo (KOORNNEEF et al., 1998). Uma diminuição do crescimento foi descrito também por Xiong et al. (2001) em mutantes de *A. thaliana* para ABA, sob estresse salino.

Mutantes para ABA também já foram isolados em outras espécies como *N. plumbaginifolia*, *Z. mays*, *Lycopersicon esculentum* e *Pisum sativum* (TAYLOR, 1991). Segundo Hoth et al. (2002), três classes de mutantes já estão bem caracterizadas: ABA-deficiente, hipersensitivo e insensitivo. Em mutantes ABA-deficientes, a indução de fechamento estomatal e a expressão de alguns genes são prejudicadas (TAYLOR et al.,

2000; XIONG et al., 2001; XIONG et al., 2002). Em ABA-hipersensitivos, a mutação resulta numa diminuição da germinação em baixas concentrações de ABA e na redução da perda de água devido ao aumento do fechamento estomatal por ABA (LU & FEDOROFF, 2000; STEBER & McCOURT, 2001). Mutantes ABA-insensitivos incluindo *abi1*, *abi5* e *gpa1* são afetados na inibição da germinação e crescimento mediados por ABA, e são também prejudicados no movimento estomatal. (LEUNG & GIRAUDAT, 1998; WANG et al., 2001).

Os fenótipos dos mutantes são uma forte indicação que os efeitos de ABA são similares nas plantas, permitindo a extrapolação dos resultados de *A. thaliana* para outras espécies (KOORNNEEF et al., 1998).

Diversos genes que respondem a aplicação exógena de ABA já foram identificados (SKRIVER & MUNDY, 1990), e mensageiros secundários como Ca²⁺, ADP-ribose cíclico, e inositol trifosfatado mostram-se regulados em respostas mediadas por ABA (WU et al., 1997; PANDEY et al., 2000; VISWANATHAN & ZHU, 2002). Segundo Finkelstein et al. (2002), Abe et al. (2003) e González-García et al. (2003), componentes reguladores como cinases, fosfatases e reguladores de transcrição estão envolvidos na rede de sinalização mediada por ABA.

Apesar da gama de estudos realizados, muitos dos componentes celulares e genes envolvidos nesta percepção de ABA ainda não foram bem caracterizados.

1.4 ABA, Stress and Ripening

Genes ASR (do inglês, *ABA, Stress and Ripening*) foram descritos inicialmente em tomate (*L. esculentum*, IUSEN et al., 1993) e, em seguida, identificados em diversas plantas como batata (*Solanum tuberosum*, SILHAVY et al., 1995), pinheiro (*Pinus taeda*, CHANG et al., 1996), milho (*Z. mays*, RICCARDI et al., 1998), arroz (*O. 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) lírio (*Lilium longiflorum*, YANG & WANG, 2005) e *Gingko biloba* (SHEN et al., 2005), sendo amplamente distribuído no reino vegetal, porém, ausente na planta modelo *A. thaliana* (MASKIN et al., 2001). Segundo Finkelstein & Gibson (2002), muitos genes ASR são induzidos por ABA, e estes regulam genes envolvidos no transporte de açúcar e resposta a ABA.

Os genes ASR são induzidos também por estresse em plantas, e seus níveis de expressão são rapidamente aumentados em resposta à salinidade e à seca (ZEIGERSON et al., 1995; SILHAVY et al., 1995; PADMANABHAN et al., 1997; RICCARDI et al., 1998; KAWASAKI et al., 2001; SUGIHARTO et al., 2002; WANG et al., 2003a).

Entretanto, os padrões de expressão variam em diferentes tecidos e em diferentes espécies (PADMANABHAN et al., 1997). Enquanto o gene *lp3* (homólogo em *P. taeda*) é induzido preferencialmente em raiz, *ASR1* de *L. esculentum* é mais induzido em folhas.

O gene ASR é também regulado pelo desenvolvimento, sendo expresso durante a polinização (WANG et al., 1998), em flores (GILAD et al., 1997; DÓCZI et al., 2005), e frutos em desenvolvimento (CANEL et al., 1995; GILAD et al., 1997; MBEGUIE et al., 1997; HONG et al., 2002; CAKIR et al., 2003; DÓCZI et al., 2005).

Em tomate, a família ASR é composta de quatro genes, os quais são diferencialmente expressos em folhas e raízes em resposta a estresse hídrico (MASKIN et al., 2001). Kalifa et al. (2004) mostraram que a proteína ASR1 de tomate liga-se a uma sequência consenso de DNA, fato que está de acordo com sua localização nuclear. As proteínas ASR de outras espécies também estão localizadas no núcleo, onde regulam promotores específicos (WANG et al., 2005; CAKIR et al., 2003; YANG et al., 2005), sugerindo que estas proteínas atuam como fatores de transcrição e que, provavelmente, ligam-se a genes transportadores de hexoses e genes responsivos ao ABA.

Segundo Yang et al. (2005) a ASR1 de tomate contém duas regiões altamente conservadas. A primeira região contém resíduos de histidina na extremidade amino-terminal, possuindo uma sequência específica de ligação de DNA dependente de zinco (KALIFA et al., 2004a). A segunda região está localizada na região carboxi-terminal (CAKIR et al., 2003).

Recentemente, Konrad & Zvi (2008) mostraram que a ASR1 de tomate possui atividade similar às chaperonas, protegendo proteínas da desnaturação causada por calor e ciclos de congelamento e descongelamento. O gene *ASR1* de tomate é expresso em frutos, flores, folhas, raízes, gemas, e sementes sob condições normais. Em contraste, os outros membros da família não mostram ampla distribuição no padrão de expressão sob condições normais, sendo restritos a órgãos específicos (Maskin et al., 2001).

No primeiro trabalho envolvendo genes ASR de arroz, Vaidyanathan et al. (1999) caracterizaram o padrão de expressão de *OsASR1* em resposta a ABA e estresse osmótico. A proteína codificada pelo gene *OsASR1* (recentemente nomeada de ASR5 por Frankel et al., 2006) é hidrofílica, com potencial de substrato para proteína cinase. Possui um sítio de miriostilação na posição glicina-68 conservada entre todas as proteínas ASR

alinhas por Vaidyanathan et al. (1999), o que sugere um importante papel na função da proteína. O resíduo miriostil pode se ligar a pacotes hidrofóbicos e conferir estabilidade estrutural à proteína (ZHENG et al., 1993).

Em arroz, análises *in silico* revelaram seis cópias de genes ASR, dispersas em diferentes cromossomos, todas confirmadas por ESTs (Frankel et al., 2006; Tabela 1).

O mRNA primário *OsASR1* de arroz possui quatro diferentes sítios de *splicing*, cujos transcritos originam quatro proteínas diferentes. Os genes *OsASR3* e *OsASR4* estão localizados em *tandem* e possuem íntrons com o mesmo comprimento, sugerindo uma recente duplicação gênica, enquanto que *OsASR2* está localizado a mais de 200 kb de distância de *OsASR3* e *OsASR4* (FRANKEL et al., 2006). *OsASR6* possui grande divergência dos outros ASR de arroz, mas se assemelha a ASR4 de tomate em análise filogenética realizada por Frankel et al. (2006). A sequência genômica de *OsASR1* localiza-se no cromossomo 2, na posição 20,159,721 a 20,160,800 (Loc_Os02g33820.1); *OsASR2* no cromossomo 1 na posição 42,787,403 a 42,789,160 (Loc_Os01g73250.1); *OsASR3* e *OsASR4* também no cromossomo 1 nas posições 42,608,120 a 42,608,821 (Loc_Os01g72900.1), e 42,609,680 a 42,610,468 (Loc_Os01g72910.1) respectivamente; *OsASR5* no cromossomo 11 na posição 3,274,338 a 3,275,328 (Loc_Os11g06720.1); e *OsASR6* no cromossomo 4 na posição 20,747,447 a 20,748,680 (Loc_Os04g34600.1).

Tabela 1. Localização, tamanho do íntron (em pb), e da proteína (em aminoácidos) dos genes ASR em arroz (monocotiledônea) e tomate (dicotiledônea). Extraído de Frankel et al. (2006).

	Cromossomo	Tamanho do íntron	Tamanho da proteína	ESTs	Em tandem com
Arroz					
<i>ASR1</i>	II	<i>splicing</i>	63/71/91/105	sim	
<i>ASR2</i>	I	440	182	sim	
<i>ASR3</i>	I	131	105	sim	<i>ASR4</i>
<i>ASR4</i>	I	131	96	sim	<i>ASR3</i>
<i>ASR5</i>	XI	119	138	sim	
<i>ASR6</i>	IV	84	229	sim	
Tomate					
<i>ASR1</i>	IV	687	110	sim	?
<i>ASR2</i>	IV	111	114	sim	?
<i>ASR3</i>	IV	476	108	sim	?
<i>ASR4</i>	IV	111	297	sim	?

Takasaki et al. (2008), em trabalho de identificação de proteínas reguladas por giberilina (GA), demonstraram que a expressão de *OsASR5* é regulada em nível de proteína, mas não em nível de mRNA, durante a alongação de folhas da bainha em arroz, indicando um envolvimento dessa proteína no crescimento da planta.

Experimentos de super-expressão têm mostrado o uso potencial de genes ASR para aumentar a tolerância de plantas contra estresses abióticos. A super-expressão do gene *ASR1* de tomate em plantas de tabaco aumentou a tolerância destas em reposta à salinidade (Kalifa et al., 2004b). A super-expressão do ortólogo de ASR (*LLA23*) de lírio, em plantas de *A. thaliana*, aumentou a tolerância da planta à seca e salinidade (YANG et al., 2005).

Usando uma abordagem proteômica, Yang et al., (2007) identificaram proteínas responsivas ao Al em raízes de arroz. Dentre essas proteínas, *ASR5* apresentou aumento de sua expressão em reposta ao tratamento com Al.

Até o momento não há estudos da regulação da expressão da família gênica ASR, em nível de mRNA em resposta ao Al e a outros tipos de estresses abióticos.

A aplicação de corretivos de solos ácidos, apesar de ser uma estratégia efetiva para a redução da toxidez por Al, não é uma opção econômica e sustentável em longo prazo, e o desenvolvimento de variedades de cereais resistentes ao Al deve ser considerada (YANG et al., 2007). A identificação e a caracterização de genes e proteínas ligadas a mecanismos de resistência a Al poderão prover informações moleculares para uso no desenvolvimento de cultivares com melhor adaptabilidade a solos ácidos (KOCHIAN et al., 2005).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral que norteou o desenvolvimento deste trabalho foi estudar o papel de genes envolvidos nos mecanismos moleculares que governam a tolerância a AI em plantas de arroz, pela caracterização da expressão dos genes ASR.

Objetivos específicos:

- a- Avaliar o padrão de expressão relativa dos transcritos da família de genes ASR em plantas de arroz submetidas ao estresse por AI;
- b- Avaliar o efeito da aplicação exógena do ácido abscísico na regulação dos genes da família ASR em arroz;
- c- Construção de vetores binários de transformação de plantas para o estudo da localização subcelular do produto gênico de *OsASR5*;
- d- Construção de vetores binários de transformação de plantas para o estudo do silenciamento gênico da família ASR de arroz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tratamento com Alumínio

Sementes de arroz *ssp japonica* (cv Nippombare) e *ssp indica* (cv Taim) foram germinadas em papel filtro por 2-4 dias no escuro a 28°C. As plântulas germinadas foram colocadas em solução hidropônica (Baier et al., 1995) por 12 dias, em câmara de crescimento a 28°C e 12 h de luz. A solução hidropônica foi trocada a cada 4 dias. Após 12 dias de cultivo, as plântulas foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de cloreto de alumínio (AlCl₃; 20 ou 60 mg.L⁻¹). Amostras do tecido radicular e folhas foram coletadas nos tempos de 4 e 8 h após o tratamento para a cultivar Nippombare. Para a cv Taim, as plântulas foram submetidas ao tratamento com Al na concentração de 60 mg.L⁻¹ por 8 h, onde amostras do tecido radicular foram coletadas. Como controles foram utilizadas plantas não tratadas com Al, mas mantidas nas mesmas condições de cultivo. A solução controle e a solução contendo Al foram mantidas em pH 4,5.

3.2 Tratamento com ABA

Sementes de arroz (cv Nippombare) foram desinfestadas em câmara de fluxo com etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 30 min, e lavadas 5 vezes em água destilada esterelizada. Após esterilização, as sementes foram colocadas para germinar em papel filtro estéril por 4 dias no escuro a 28°C. As plântulas germinadas foram colocadas em meio de cultura sólido com 50% dos sais Murashigue & Skoog (MS;

1962), acrescido de Fitagel a 3%, e pH ajustado para 5,8. As plântulas foram mantidas por 11 dias, em câmara de crescimento a 28°C e 12 h de luz. Após este período, as plântulas foram retiradas com o auxílio de uma pinça do meio de cultura sólido e colocadas em meio MS 50% líquido. Após aclimatação de 24 h, as plântulas foram então submetidas ao tratamento com ABA em concentração de 100 µM, e amostras do tecido radicular foram coletadas nos tempos de 1, 6 e 10 h de estresse. Como controles, foram utilizadas plantas não tratadas com ABA, mas mantidas nas mesmas condições de cultivo.

3.3 Extração de RNA total

Amostras de tecido radicular e parte aérea coletadas, foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas em morteiro. Aproximadamente 100 mg do tecido macerado foram homogeneizados em 1 mL de Trizol (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 5 min em temperatura entre 15 e 30°C para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol. Após agitação por 15 s, os tubos de microcentrífuga contendo as amostras homogeneizadas foram incubados por 5 min entre 15 e 30°C. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, a fase aquosa, a qual contém o RNA, foi coletada.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 0,5 mL de isopropanol foi adicionado para cada 1 mL de Trizol inicial. As amostras foram incubadas por 10 min entre 15 e 30°C, seguindo centrifugação por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado.

O precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% para cada 1 mL de Trizol inicial. As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas à 7.500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi secado em estufa à 37°C. O RNA foi ressuspendido em 20 µL de água MiliQ autoclavada.

3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega). A reação da transcriptase reversa foi feita em um volume final de 50 µL. Inicialmente, foi preparado a mistura I contendo 1 µL do oligonucleotídeo poli(dT) contendo 23 nt a 0,5 µM, 1 µL de dNTP a 10 mM e 8 µL de água Mili-Q autoclavada para cada reação. Ao volume de 10 µL da mistura I foram adicionados 2 µL da solução contendo o RNA e, em seguida a mistura foi homogeneizada por pipetagem. As amostras foram incubadas à 65°C por 5 min, seguido imediatamente de 5 min no gelo. A cada amostra foi adicionado 38 µL da mistura II contendo 10 µL de tampão 5 X, 27 µL de água MiliQ autoclavada e 1 µL de enzima M-MLV RT (200U/µL). As amostras foram incubadas por 2 h à 37°C e em seguida a enzima foi inativada por incubação à temperatura de 70°C por 15 min. A solução estoque foi então preparada diluindo dez vezes o cDNA obtido. Para as PCRs quantitativas em tempo real (qRT-PCR), a solução estoque de cDNA foi diluída mais dez vezes (diluição final 1:100).

3.5 qRT-PCR

As análises de qRT-PCR foram realizadas no aparelho “*Applied Biosystems 7500 Real-Time System*”. As qRT-PCRs foram compostas de um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 60°C e 15 s a 72°C. As amostras foram mantidas por 2 min a 40°C para reanelamento e, então, aquecidas de 55°C a 99°C para a aquisição dos dados relativos à curva de desnaturação do produto de amplificação.

As qRT-PCRs foram feitas usando 10 µL da amostra de cDNA diluído (1:100), 2,0 µL de tampão PCR 10 X (Tris/HCL a 100 mM, (pH 8,0), KCl a 500 mM), 1,2 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,1 µL de dNTPs a 5 mM, 0,2 µL de cada *primer* 10 µM, 4,25 µL água, 2,0 µL de SYBR-Green (1:100.000), e 0,05 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U/µL; Invitrogen). O volume final da reação por tubo foi de 20 µL. Os *primers* utilizados nas reações estão listados na Tabela 2. Como normalizadores internos da reação, foram utilizados 3 seqüências gênicas: fator de alongação alfa-1 (Ef; LocOs03g08020); *Rice 40S ribossomal protein* (40S; LocOs01g22490); e formaldeído desidrogenase (FDH; LocOs02g57040). Todas as reações foram realizadas com quatro repetições experimentais e o cálculo foi feito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. *Primers* utilizados nas análises de expressão dos genes *ASR* por qRT-PCR.

Primer	F/R	Seqüência dos <i>primers</i>
OsASR1	F R	5'- TGGTGGACTACGACAAGGAGA -3' 5'- GCCACCTCCTCCTTCACC -3'
OsASR2	F R	5'- CATGGCGGCTACGGCTAC -3' 5'- GGTCCCTTCTTCGCCTGGT -3'
OsASR3	F R	5'- CACCACAAGAACGACGACAA -3' 5'- TGTGATGCTCGTGGATGG -3'
OsASR4	F R	5'- CGACTATCGCAAGGAGGAGA -3' 5'- CGATCCCTTCCTTCATCTTG -3'
OsASR5	F R	5'- CCAGGACGAGTACGAGAGGT -3' 5'- CGATCTCCTCCGTGATCTTG -3'
OsASR6	F R	5'- GCCCGGAGAAGTACAGGAAG -3' 5'- GCCCTCCTCGATCCTGTG -3'
Os40S	F R	5'- CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA-3' 5'- ACACTTCACCGGACCATTCAA -3'
OseF	F R	5'- TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3' 5'- GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA-3'
OsFDH	F R	5'- CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC-3' 5'- TTCCAATGCATTCAAAGCTG-3'

3.6 PCR

As reações de amplificação do cDNA de *OsASR5* por PCR visando a clonagem em vetores de expressão foram realizadas usando *primers* específicos para *OsASR5* (Tabela 3). Além disso, PCRs usando *primers* específicos para o gene *hpt* e para *OsASR5*, foram também realizadas para a confirmação da transformação de *E. coli*. Para a reação de amplificação, foram adicionados 2 µL de DNA, 0,5 µL de dNTP a 10 mM, 2 µL de tampão de PCR 10X concentrado, 1 µL de MgCl₂ a 10 mM, 1 µL de cada *primer* a 10 mM (*forward* e *reverse*), 0,2 µL de Taq DNA-polimerase (5 U/µL) e 12,3 µL de água MiliQ autoclavada. As condições utilizadas na amplificação dos DNAs foram: 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento 60°C, (1 min) e

extensão (72°C por 1 min). O último ciclo foi seguido de uma extensão final de 5 min a 72°C. A amplificação e o tamanho dos fragmentos de DNA foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Tabela 3. *Primers* utilizados na amplificação de *OsASR5*, para fusão em vetor de entrada pENTR.

OsASR5_Loc_N-terminal	F	5'- CACCATGGCGGAGGAGAAGCAC -3'
	R	5'- T G AGCCGAAGAGGTGGTG -3'

CACC (em negrito), corresponde às quatro bases inseridas no *primer forward*, adicionados para a correta clonagem no vetor pENTR. G (em cinza) corresponde a alteração do *primer reverse* no códon de terminação, necessário para a continuação da síntese protéica e fusão à proteína GFP.

3.7 Clonagem em Vetor de entrada pENTR (*Invitrogen*)

O produto de PCR amplificado a partir de cDNA de arroz foi clonado primeiramente no vetor de entrada Gateway pENTR (*Invitrogen*) seguindo-se o protocolo do fabricante. Neste sistema, o produto de PCR é diretamente clonado graças à adição de quatro bases no início do *primer forward* (CACC). A sequência do vetor de clonagem (GTGG) invade a região 5' do produto de PCR, anela-se às bases adicionadas, e estabiliza o produto de PCR em orientação correta. Os primers utilizados estão listados na tabela 3. Para a reação, 1 µl de produto de PCR foi adicionado a 1 µl de solução salina (diluída 1:6), 1 µl de vetor e completado com água estéril para um volume final de 6 µl. A reação foi então misturada gentilmente e incubada a temperatura ambiente (22-23°C) por 5 min. O produto recombinado foi inserido em bactérias competentes por eletrotransformação.

3.8 Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação

As bactérias competentes para eletroporação foram preparadas seguindo o protocolo descrito a seguir. Uma pré-cultura foi preparada inoculando a bactéria em 50 mL de meio de cultura Luria-Broth (LB) líquido e mantendo a mesma sob agitação constante de 225 rpm, a 37°C por 16 h. Em seguida, 10 mL da pré-cultura foram diluídos em 1 L de LB líquido. Esta cultura foi mantida sob agitação nas mesmas condições anteriores até a mesma atingir densidade ótica de 0,5-0,8 a 600 nm. A cultura foi resfriada no gelo por 30 min e, a seguir, centrifugada a 4.000 rpm por 15 min, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado contendo as células concentradas foi ressuscitado em 1 L de água destilada a 4°C. A centrifugação foi repetida e as células foram lavadas com 500 mL de água destilada. A mistura foi centrifugada novamente a 4.000 rpm por 15 min, a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi então ressuscitado em 3 mL de glicerol 10 % à 4°C, dividido em alíquotas de 80 µL, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -70 °C. Durante toda a manipulação, as amostras foram conservadas no gelo.

Para a transformação de *E. coli* por eletroporação, um volume entre 1 e 1,5 µL do produto da reação de recombinação foi misturado com 40 µL de bactéria competente. A mistura foi submetida a uma voltagem de 2,5 V. Após a eletroporação, 250 µL de LB líquido foi acrescentado à cubeta de eletroporação. O material foi então transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e mantido à 37°C por 1 h. Volumes de 40 e 200 µL da suspensão de bactérias foram plaqueados em 2 placas com meio LB sólido contendo canamicina (25µg/mL) para seleção de bactérias transformadas com o vetor pENTR e pANDA, e espectiomicina (50µg/mL) para seleção de bactérias transformadas com o vetor

de destino pH7CWG2. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 24 h. As colônias de bactérias que multiplicaram-se no meio contendo o antibiótico de seleção foram selecionadas para extração de plasmídeos. A transformação das colônias de bactérias selecionadas foi confirmada por PCR utilizando os *primers* específicos para o gene *OsASR5* e *Hpt*.

3.9 Obtenção dos vetores de localização subcelular

Essa etapa tem por objetivo recombinar o fragmento dos plasmídeos de entrada (pENTR_*OsASR5*) com o vetor de destino pH7CWG2 (Figura1). Esse plasmídeo é um vetor binário e permite a fusão traducional da proteína de interesse na região N-terminal da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). Além disso, a proteína de fusão é regulada pelo promotor e terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). O gene marcador *Hpt*, que confere resistência à higromicina nas plantas está contido dentro das bordas do T-DNA desses plasmídeos.

Esta recombinação, chamada LR, foi realizada da seguinte forma: 50 ng de pENTR_*OsASR5* foram misturados a 100 ng do vetor de destino (pH7CWG2), 1 µl de tampão (LR Reaction Buffer 5 X), 1 µl de *Clonase Enzyme Mix* e água em quantidade final de 5 µl. A reação foi incubada por 2 h a 25°C. Em seguida, foram adicionados 2 µl de proteinase K (2µg/µl) e a reação foi realizada por incubação a 37°C durante 10 min. Após a recombinação, 2 µl da reação foram utilizados na transformação de *E. coli* (XL1-Blue), por eletroporação (protocolo descrito acima). Os plasmídeos foram extraídos das células de *E. coli* transformadas, multiplicadas em meio LB adicionado de espectomicina

(50µg/ml) e as clonagens foram confirmadas por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose 2%.

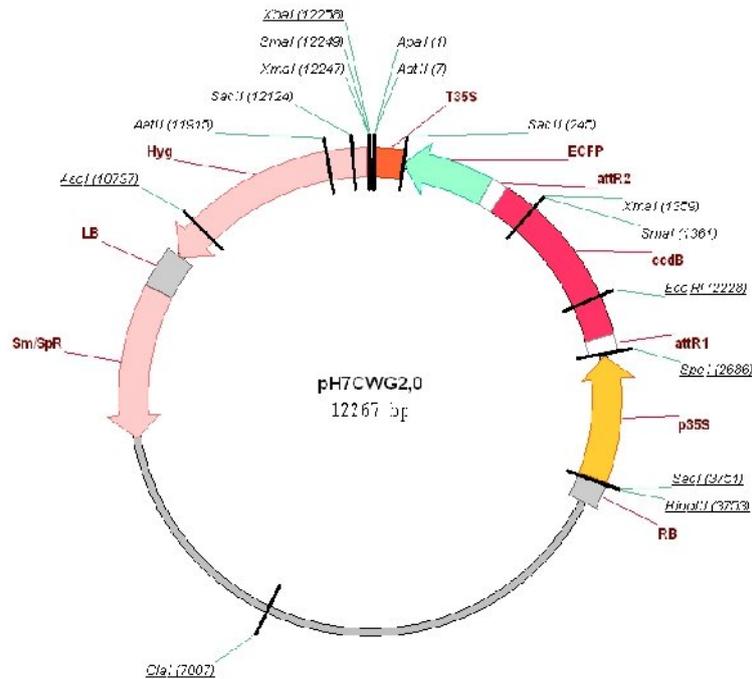


Figura 1. Plasmídeo pH7CWG2.0 (Invitrogen) para estudos de localização subcelular em tecidos vegetais.

3.10 Obtenção do vetor de silenciamento gênico (RNAi)

O produto de recombinação (pENTR_OsASR5) foi recombinado no vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004; Figura 2), seguindo o protocolo de recombinação LR descrito acima. Este produto foi incorporado por recombinação no vetor no sentido senso e antisenso, cuja transcrição leva a formação de um transcrito com estrutura em grampo (*hairpin*). Neste vetor, a transcrição da seqüência introduzida é regulada pelo promotor

ubiquitina (UBI) de milho. Entre o promotor e as seqüências introduzidas está presente um íntron para aumentar a expressão do mRNA. Uma seqüência do gene codificador da β -glicuronidase (*Gus*) de *E. coli* encontra-se entre as duas regiões inseridas. O vetor pANDA apresenta o terminador do gene da nopalina sintase (NOS) de *A. tumefaciens*. Os genes de seleção presentes no vetor são o de resistência à higromicina (*Hpt*) e o de resistência à neomicina (*NptII*) e antibióticos derivados (canamicina, neste trabalho).

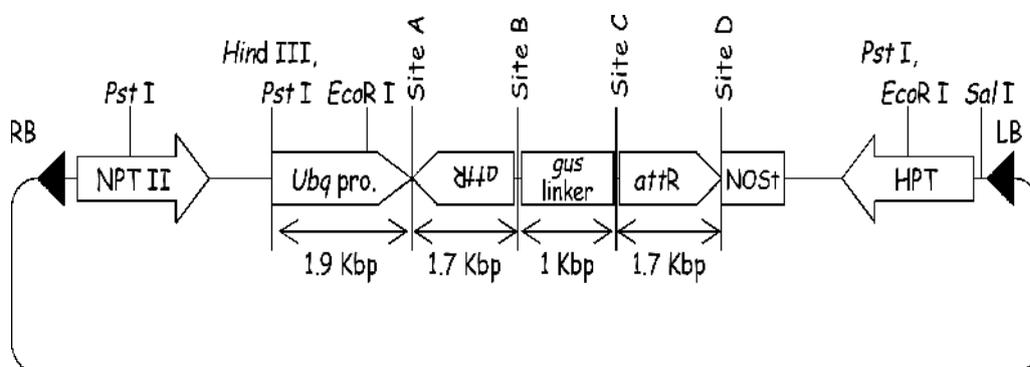


Figura 2. Representação do vetor pANDA segundo Miki et al. (2005).

PstI, *HindIII*, *EcoRI* e *SalI*= sítios de restrição do vetor; *NPTII* e *HPT*= genes de resistência a Neomicina e derivados, e higromicina respectivamente; *RB*= Right border; *LB*= Left border; *Ubq pro*= promotor ubiquitina; *NOS t*= terminador do gene nopalina sintase; *gus linker*= seqüência do gene codificador da β -glicuronidase de *E. Coli*; *attR*= sítios de recombinação

3.11 Minipreparação de plasmídeo (Miniprep)

Colônias isoladas de bactérias *E. coli* contendo os vetores de entrada e os binários descritos acima foram selecionadas e inoculadas em 4 mL de meio de cultura LB líquido contendo canamicina (25 μ g/mL) para o vetor pENTR e pANDA, e espectomicina

(50µg/mL) para o vetor de localização subcelular. A extração de plasmídeos ou miniprep foi realizada de acordo com Sambrook et al., (1989). Células de 1,5 mL da suspensão de bactérias foram coletadas por centrifugação em 13.000 rpm por 1min. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado contendo as células foi ressuscitado com 200 µL da solução I (Tris-HCl a 25 mM, pH 8,0; EDTA a 10 mM; glicose a 25 mM). Em seguida, a solução II (200 µL) contendo NaOH a 0,2 M e SDS a 1 % foi misturada lentamente por inversão à mistura anterior. Finalizando esta etapa de lise, 200 µL da solução III (CH₃COONa a 5 M, pH 5,2) foi adicionada e também homogeneizada por inversão. Após centrifugação por 5 min a 13.000 rpm, 600 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Os plasmídeos foram então precipitados utilizando 600 µL de isopropanol e centrifugação por 20 min em 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 350 µL de etanol 70 %. A mistura foi centrifugada novamente por 5 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37°C. Os plasmídeos extraídos foram ressuscitados em 50 µL de água Mili-Q autoclavada.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da expressão dos genes ASR em condições ótimas de cultivo e em resposta ao AI

Por meio do presente trabalho pudemos avaliar o efeito do AI na expressão da família gênica ASR em plântulas de arroz com duas semanas após germinação, submetidas ao tratamento com AI. Para isso, tecido radicular e parte aérea foram coletados após 4 e 8 h de tratamento e as análises por qRT-PCR foram realizadas para os 6 membros da família gênica das ASRs de arroz.

Os níveis relativos de transcritos dos genes *OsASR* em folhas e raízes de plantas cultivadas em condições controles foram primeiramente quantificados (Figura 3). Estas análises demonstraram que níveis mais altos de transcritos dos genes *OsASR1*, *OsASR2*, *OsASR4* e *OsASR5* estão presentes em tecido radicular. Na parte aérea, *OsASR3* apresentou maior quantidade de transcritos em relação ao tecido radicular, enquanto que *OsASR6* níveis equivalentes de transcritos estão presentes no tecido radicular e nas partes aéreas. Em quantidade, os genes *OsASR1* e *OsASR5* apresentaram uma maior concentração relativa de transcritos.

As análises do padrão de expressão dos diferentes genes ASR em resposta ao tratamento com AI (20 mg.L⁻¹) mostraram que os mesmos responderam diferencialmente ao tratamento (Figura 4). Os níveis dos transcritos correspondentes aos genes *OsASR1*, *OsASR3*, *OsASR4* e *OsASR5* foram aumentados após 4 e 8 h de tratamento, enquanto que os genes *OsASR2* e *OsASR6* só apresentam aumento na expressão após 8 h de tratamento. *OsASR1* (4 e 8 h), *OsASR2* (8 h) e *OsASR3* (4 h) foram fortemente induzidos por AI e seus níveis aumentaram em quase 6 vezes quando comparados aos seus respectivos controles.

No tratamento com 60 mg.L^{-1} de Al, os níveis de expressão de toda a família ASR foram drasticamente aumentados em comparação ao tratamento com 20 mg.L^{-1} (Figura 5). Todos os genes da família ASR apresentaram elevados níveis de transcritos em comparação aos controles tanto em 4 quanto 8 h de tratamento. Os níveis de transcritos correspondentes aos genes *OsASR3* e *OsASR6* apresentaram os valores mais elevados em resposta ao Al na ordem de 17 e 15 vezes de aumento respectivamente, quando comparados aos seus controles. *OsASR5* foi também regulado por Al e os níveis de seus transcritos aumentaram tanto em 4 quanto 8 h de tratamento.

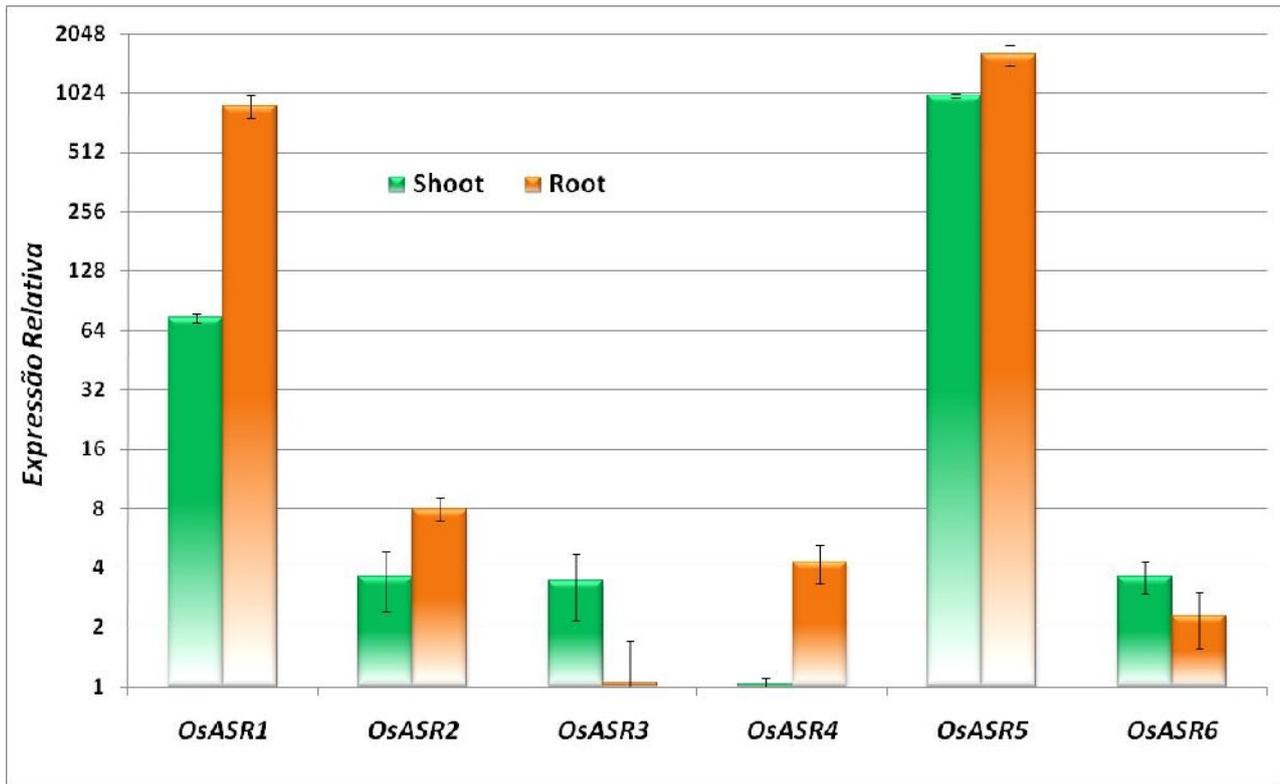


Figura 3. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em raiz e parte aérea. O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. Os tecidos foram coletados a partir de plântulas de 12 dias crescidas em meio hidropônico sem tratamento com Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em parte aérea. *Shoot* corresponde à parte aérea e *Root* corresponde às raízes, respectivamente.

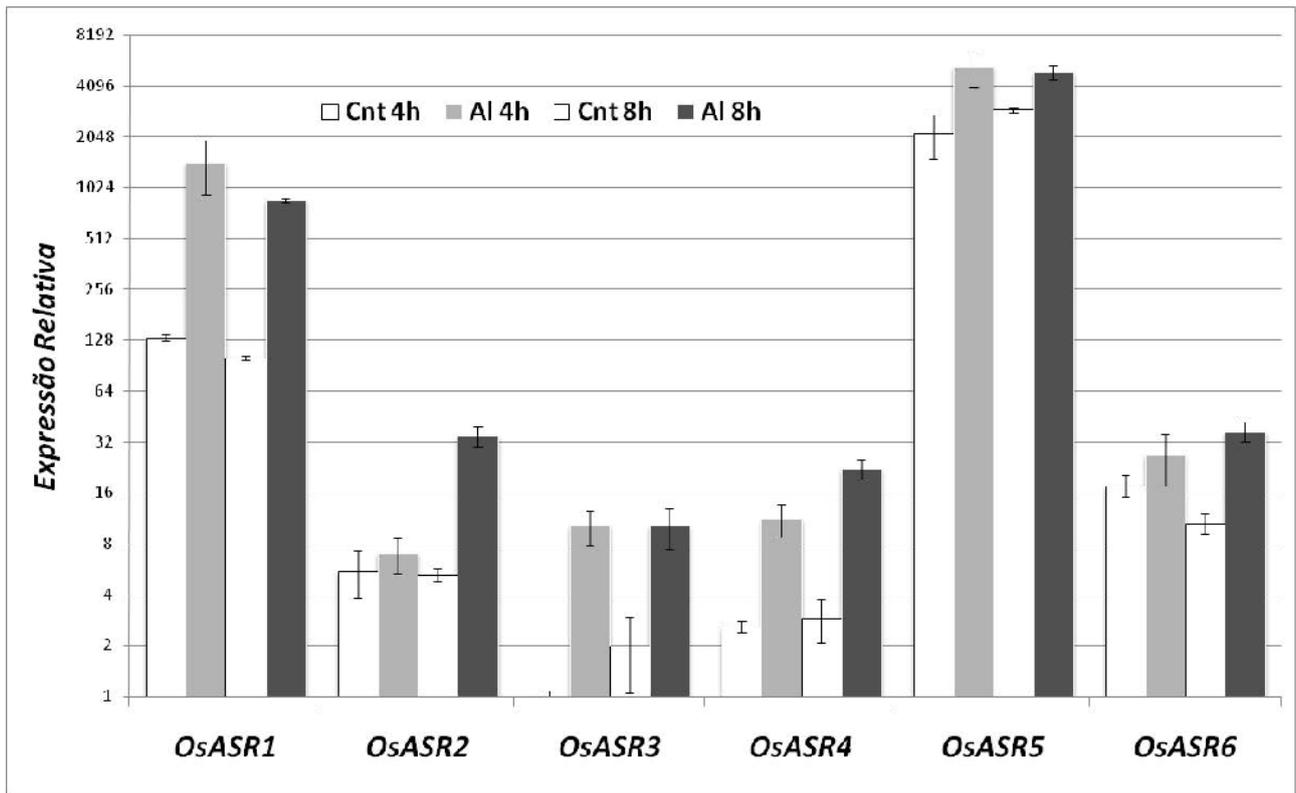


Figura 4. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. As raízes foram coletadas após 4 e 8 h de tratamento com 20 mg.L⁻¹ de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em plantas controle (4 h de tratamento).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e **Al 4h** e **Al 8h** correspondem às plantas tratadas por 4 e 8 h, respectivamente.

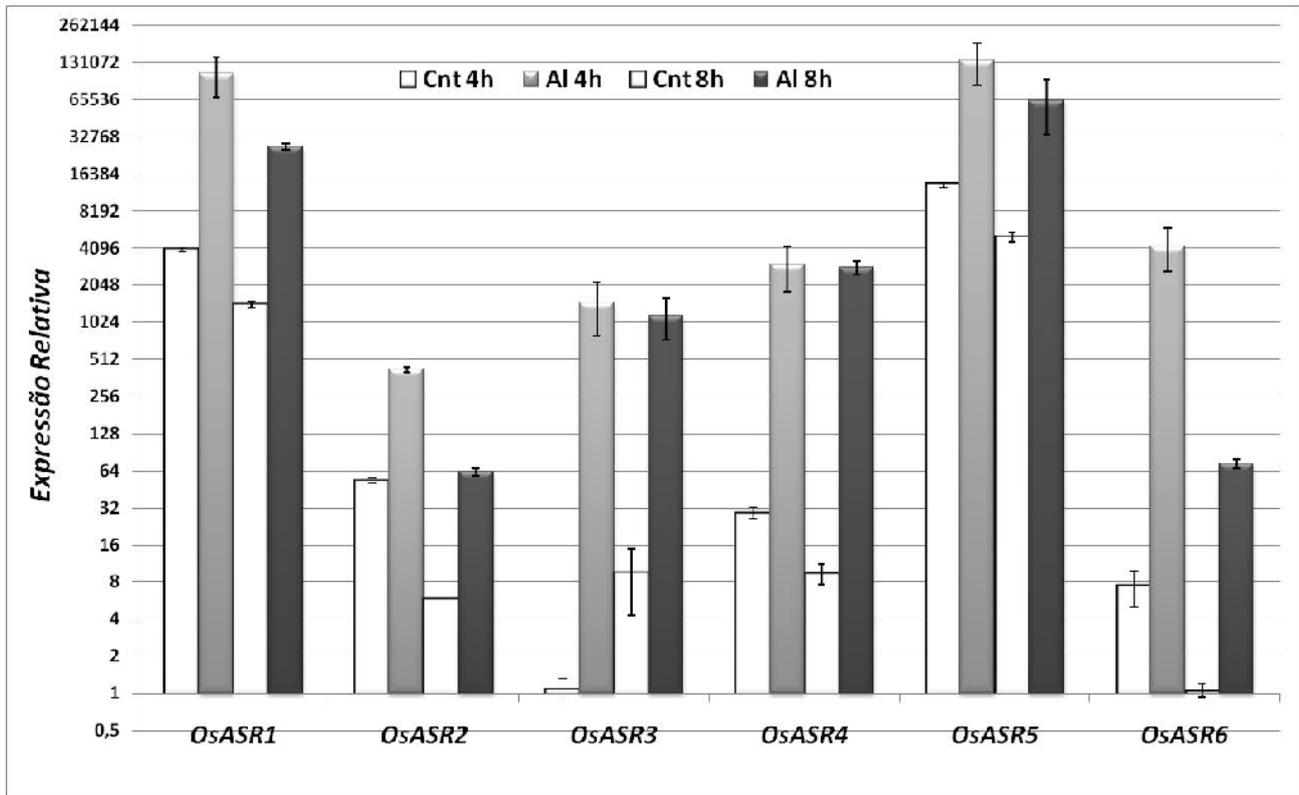


Figura 5. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. As raízes foram coletadas após 4 e 8 h de tratamento com 60 mg.L⁻¹ de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em plantas controle (4 h de tratamento).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e **Al 4h** e **Al 8h** correspondem às plantas tratadas por 4 e 8 h, respectivamente.

As alterações nos níveis de expressão da família gênica ASR em resposta ao tratamento com Al (60 mg.L^{-1}) na parte aérea da planta foram menos significativos em comparação com os efeitos observados nas raízes (Figura 6). *OsASR1* respondeu aumentando o nível de transcritos apenas após 4 h de tratamento enquanto que *OsASR2*, só respondeu ao Al após 8 h de tratamento. *OsASR5* apresentou aumento de sua expressão nos dois tempos analisados. Os níveis de *OsASR3* caíram em resposta ao Al em 4 h e tornaram-se levemente aumentados em 8 h de tratamento. *OsASR4* também apresentou queda de seus transcritos em 4 h de tratamento, porém, seus níveis se igualaram ao controle em 8 h.

O gene *OsASR5* foi analisado também quanto à sua expressão relativa em arroz *ssp indica*, relatado por Ma et al. (2002) como mais suscetível ao Al. Raízes foram coletadas em 8 h de tratamento com 60 mg.L^{-1} de Al, e as análises mostraram que a expressão de *OsASR5* não variou em resposta ao tratamento por Al (Figura 7).

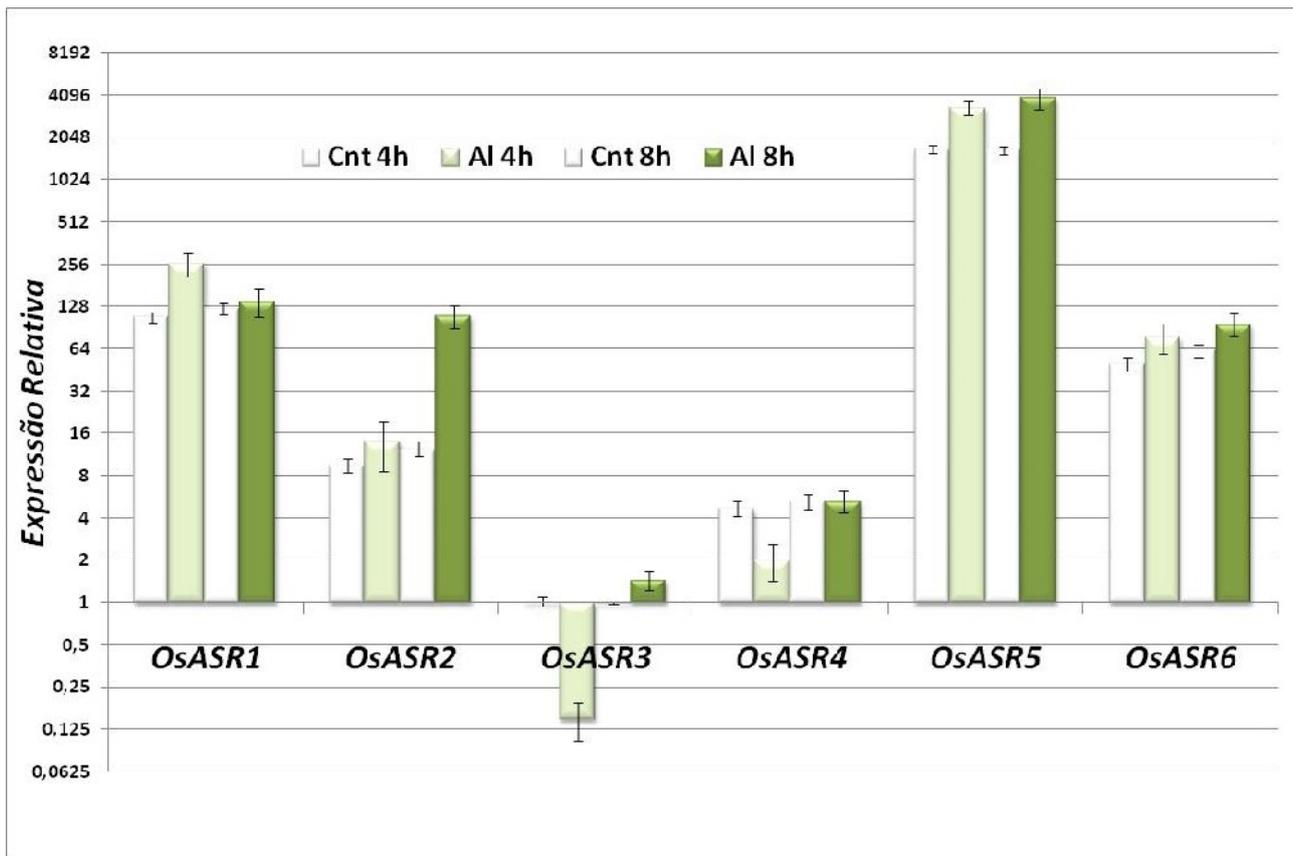


Figura 6. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total da parte aérea foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. A parte aérea foi coletada após 4 e 8 h de tratamento com 60 mg.L⁻¹ de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR3* em plantas controle (4 h de tratamento).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e **Al 4h** e **Al 8h** correspondem às plantas tratadas por 4 e 8 h, respectivamente.

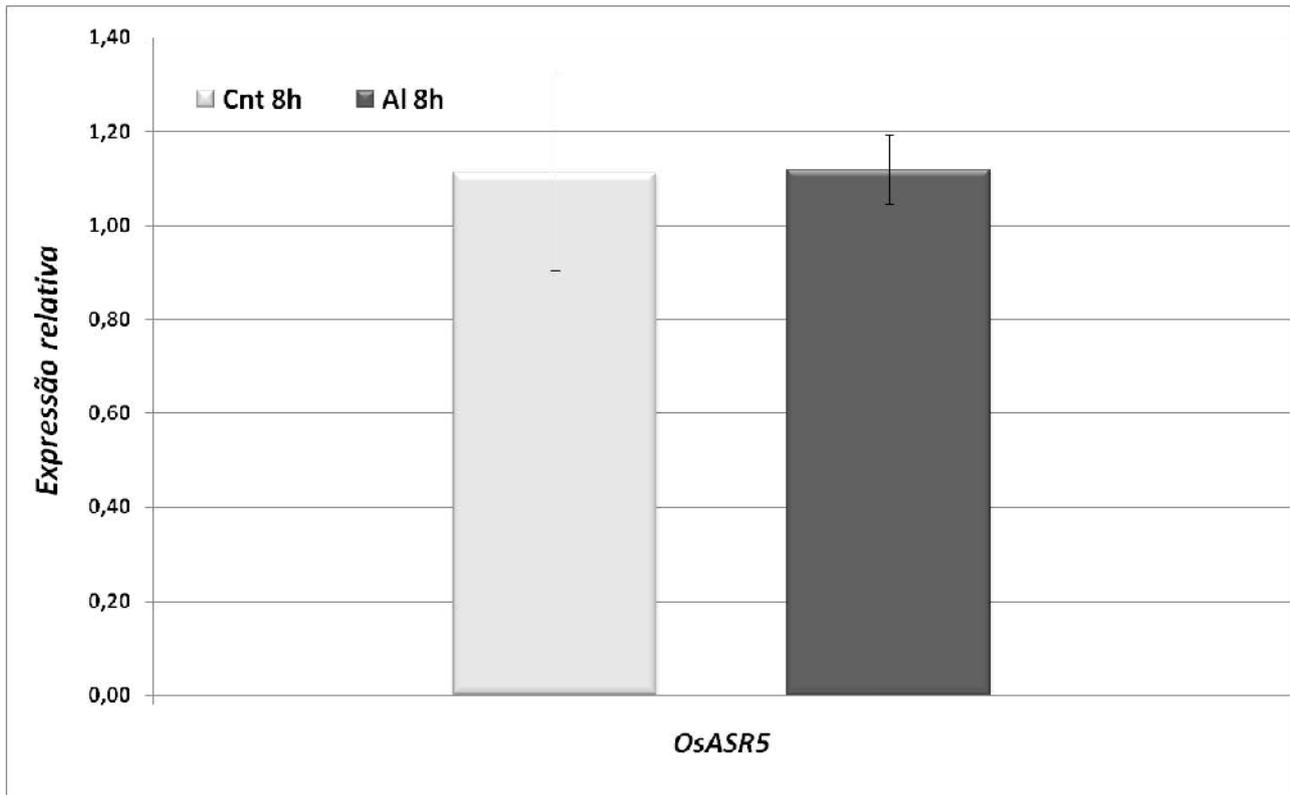


Figura 7. Determinação do nível de expressão do gene *OsASR5* de arroz subespécie *indica* em resposta ao tratamento com Al (60 mg.L^{-1}). O RNA total das raízes foram utilizados para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. A raiz foi coletada após 8 h de tratamento com Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*.

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e **Al 8h** corresponde às plantas tratadas 8 horas.

4.2 Análises da expressão dos genes ASR em resposta ao fitormônio ABA

Plântulas de arroz foram submetidas ao tratamento com 100 μ M de ABA e amostras do tecido radicular foram coletadas nos tempos de 1, 6 e 10 h de estresse. As análises mostraram pouca alteração no nível de expressão da família ASR em 1 h de tratamento, sendo que somente o gene *OsASR2* apresentou aumento de expressão (Figura 8). Em 6 e 10 h de tratamento, houve redução dos níveis de transcritos de todos os genes, com exceção de *OsASR6* que se igualou ao controle em 10 h de tratamento.

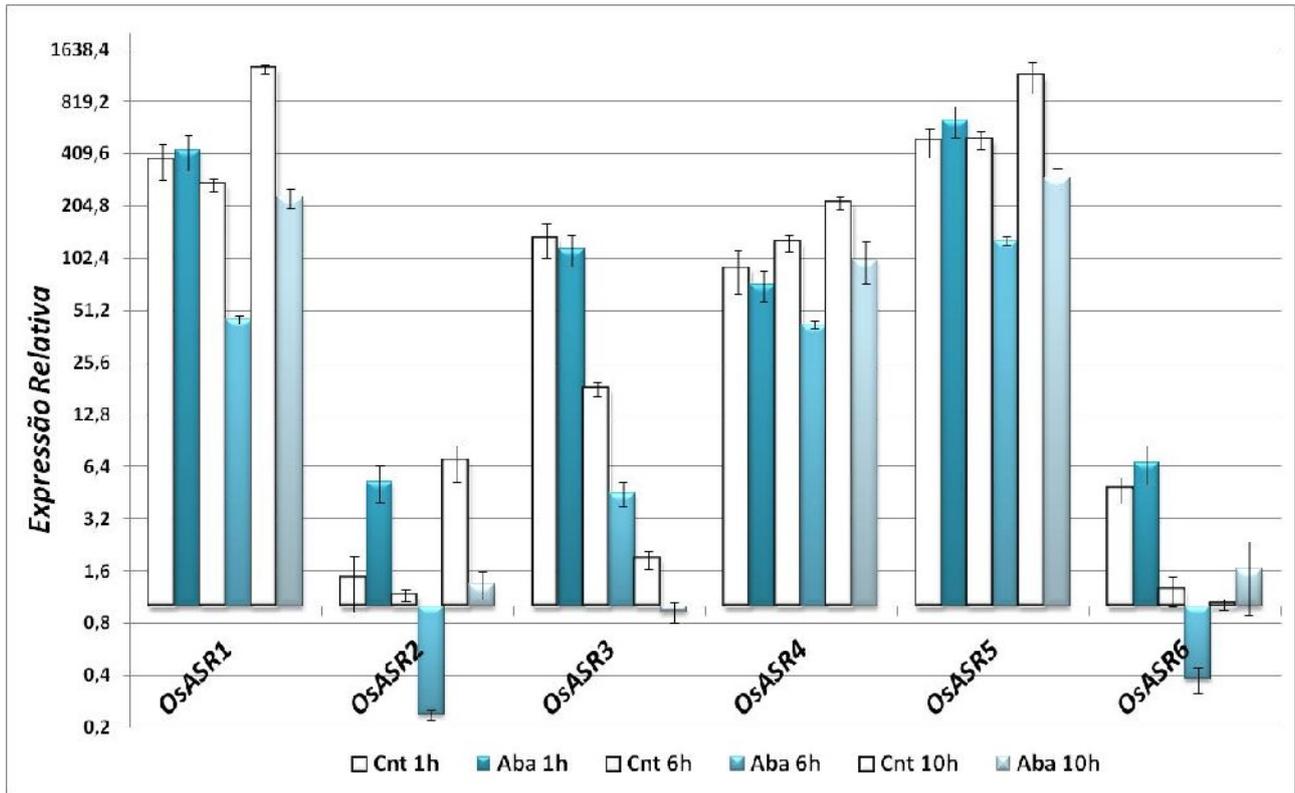


Figura 8. Determinação do nível de expressão dos genes da família ASR de arroz em resposta ao tratamento com ABA. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. A raiz foi coletada após 1, 6 e 10 h de tratamento com 100 μ m de ABA. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes, *40S*, *fdh* e *ef*. A normalização dos resultados foi feita em relação a expressão relativa do gene *OsASR6* em plantas controle (tratamento 10 h).

Cnt corresponde às plantas controle não tratadas, e ABA 1h, ABA 6h e ABA 10h, correspondem às plantas tratadas por 1, 6 e 10 h, respectivamente.

4.3 Obtenção de um vetor binário de transformação de plantas para o estudo da localização subcelular da proteína OsASR5

Tendo por objetivo a construção de um vetor para a caracterização subcelular da proteína ASR5, o cDNA de *OsASR5* foi clonado em fusão traducional com a proteína GFP pelo sistema *Gateway™ Technology* (Invitrogen). *Primers* específicos foram projetados no intuito de amplificar a região codificante do cDNA de interesse. Para a fusão com GFP, o códon de término de tradução do cDNA de *OsASR5* foi modificado de modo a substituir o códon de término UGA por UCA (serina), permitindo que a proteína de interesse seja expressa na extremidade N-terminal da proteína de fusão (GFP).

A primeira etapa para a obtenção do vetor foi a clonagem do cDNA de interesse no vetor de entrada pENTR (Invitrogen), permitindo que o produto de PCR fosse clonado na orientação correta no referido vetor. Bactérias *E. coli* (XL-1-Blue) competentes foram transformadas por eletroporação e multiplicadas em meio de seleção LB contendo canamicina (25 µg/mL). Colônias positivas foram crescidas novamente em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina. Após 24 h, foi realizada a extração de plasmídeos. A clonagem do fragmento correspondente a *OsASR5* foi confirmada por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 9). Nessa análise foi possível confirmar a presença do cDNA inserido no vetor de entrada em 2 colônias analisadas. O plasmídeo do clone número 2 foi utilizado para clonagem no vetor binário.

Na segunda etapa o inserto foi transferido para o vetor de destino. Estes correspondem a vetores binários de T-DNA que permitem a fusão traducional da proteína de interesse na região N-terminal (vetor pH7CWG2, Invitrogen) da proteína GFP. Após

recombinação LR entre o vetor de entrada (pENTR-OsASR5) e o vetor de destino (pH7CWG2), os plasmídeos resultantes (pH7CWG2-OsASR5) foram transferidos para bactérias *E. coli* (XL1-Blue) competentes por eletroporação. Após obtenção das colônias de bactérias recombinantes, os plasmídeos foram extraídos a partir dessas células, as quais foram multiplicadas em meio LB suplementado com espectomicina (50 µg/ml). Novamente, as clonagens foram confirmadas através de PCR e análise em eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando *primers* para *OsASR5* (Figura 10), e *Hpt* (Figura 11). Nessa análise, foi possível confirmar a presença do cDNA inserido no vetor de entrada em 2 colônias analisadas.

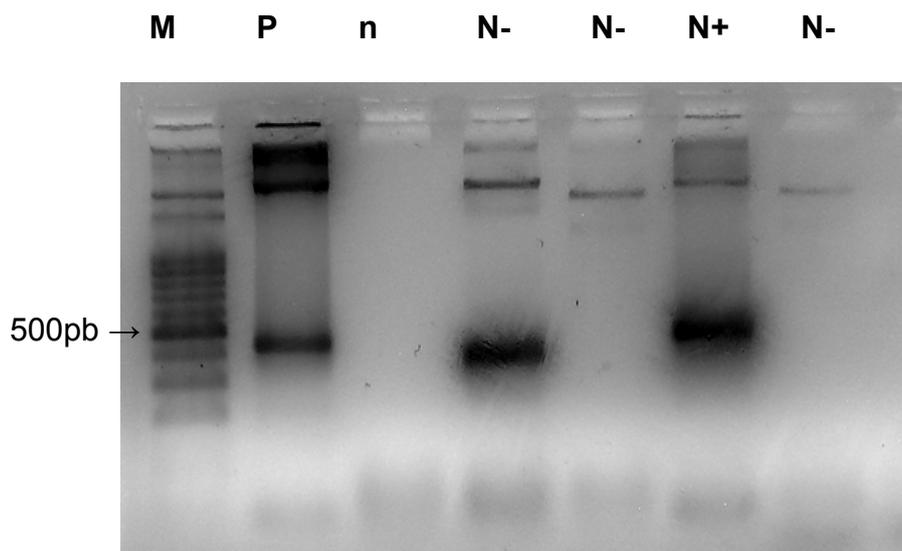


Figura 9. Confirmação da clonagem do cDNA de *OsASR5* no vetor de entrada pENTR. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones pENTR contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers OsASR5* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 417 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **P** = controle positivo (plasmídeo pGEM T-EASY contendo o fragmento); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **N+** = colônia positiva; **N-** = colônias negativas. *E. coli* XL-1-Blue foi usada nas transformações.

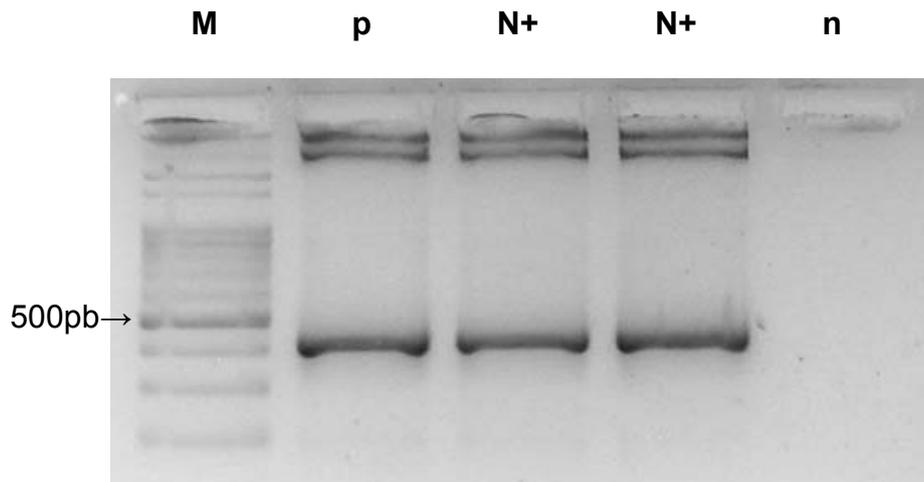


Figura 10. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pH7CWG2 para o estudo de localização subcelular do produto gênico. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers OsASR5* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 417 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **p** = controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **N+** = colônias positivas. *E. coli* XL-1-Blue foi usada nas transformações.

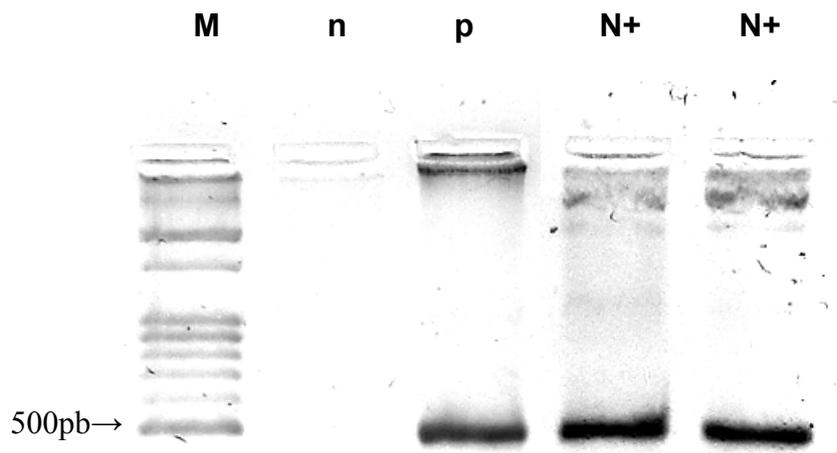


Figura 11. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pH7CWG2 para o estudo de localização subcelular do produto gênico. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 500 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **p**= controle positivo (plasmídeo pH7CWG2); **n** = controle negativo (plasmídeo pENTR); **N+** = colônias positivas. *E. coli* XL1-Blue foi usada nas transformações.

4.4 Obtenção de um vetor binário de transformação de plantas para silenciamento gênico da família ASR de arroz

Após a recombinação do vetor pANDA com o vetor de entrada pENTR_OsASR5, o mesmo foi introduzido em *E. coli* (XL-1-Blue) competentes por eletroporação. Os plasmídeos foram extraídos das células transformadas, crescidas em meio LB adicionado de higromicina (50 µg/ml) e canamicina (25 µg/ml). As clonagens foram confirmadas através de PCR e análise em eletroforese em gel de agarose a 2 %, utilizando *primers* para *Hpt* e *OsASR5* (Figuras 12 e 13 respectivamente).

Nessa análise, apesar de 3 clones serem positivos para *Hpt*, foi possível confirmar apenas 1 colônia com a presença de duas cópias do cDNA de *OsASR5* (necessário para a produção da dupla fita de RNA).

As construções foram projetadas de forma a produzirem RNAs de dupla fita (dsRNA) de regiões específicas dos membros da família ASR. Como alvo principal foi escolhido o gene *OsASR5*. Assim, seu cDNA completo foi inserido no vetor possibilitando o silenciamento do referido gene. Além disso, o cDNA de *OsASR5* possui 28 nucleotídeos contínuos idênticos a seqüência de *OsASR1*, 19 em *OsASR2*, 14 em *OsASR3*, 23 em *OsASR4* e 28 em *OsASR6*. Estas homologias com os outros genes desta família possibilitarão o silenciamento para todos os membros da família ASR de arroz.

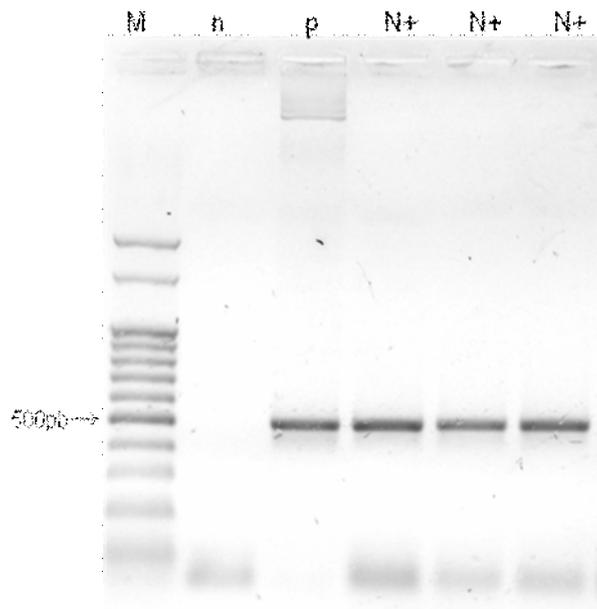


Figura 12. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pANDA para o estudo do silenciamento gênico da família ASR de arroz. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. Os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 500 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **p**= controle positivo (plasmídeo pH7CWG2); **n** = controle negativo (plasmídeo pENTR); **N+** = colônias positivas. *E. coli* XL-1-Blue foi usada nas transformações.

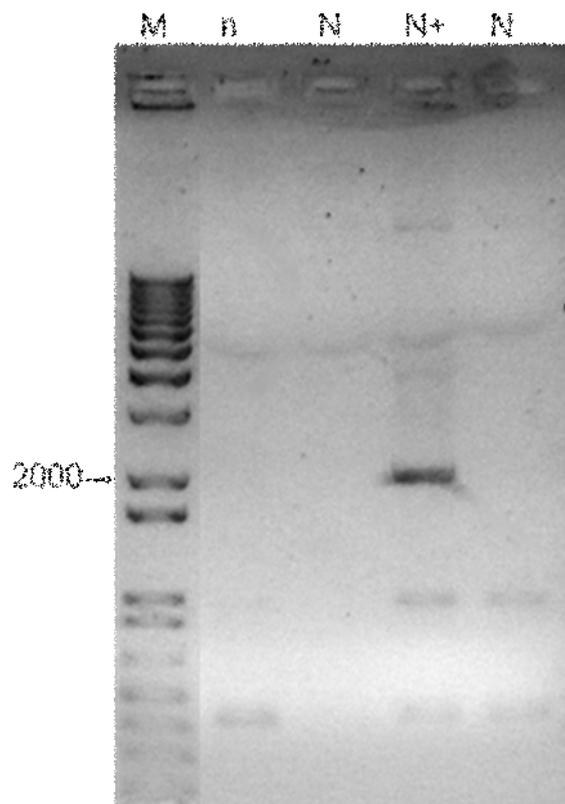


Figura 13. Confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pANDA para o estudo do silenciamento gênico da família ASR de arroz. Análise de eletroforese em gel de agarose a 2 %, dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR5* extraídos de *E. coli*. O *primer OsASR5 (reverse)* foi utilizado na reação produzindo um fragmento de 2.000 pb. **M** = marcador 100 pb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo pANDA vazio); **N+** = colônia positiva; **N-** = colônias negativas para os 2 insertos de *OsASR5*. *E. coli* XL1-Blue foi usada nas transformações.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi analisada a expressão relativa dos diferentes genes que compõem a família gênica ASR de arroz em resposta a A1 e ao ABA. Além disso, visando definir a localização subcelular da proteína codificada pelo gene *OsASR5* foi construído um vetor binário de transformação de plantas capaz de permitir a expressão de uma proteína da fusão *OsASR5-GFP*. Para o estudo funcional dos genes *OsASR* foi produzido um vetor binário visando o silenciamento da família gênica ASR de arroz via RNA de interferência.

5.1 Construção dos vetores de localização subcelular e silenciamento gênico

Em experimentos com tomate, Iusen et al. (1993) determinaram a localização nuclear para ASR1. Este resultado está de acordo com o fato de que a maioria das proteínas ASR possuem sinais de localização nuclear (NLS – *nuclear localization signals*) na extremidade C-terminal (PADMANABHAN et al., 1997; HUANG et al., 2000; HONG et al., 2002) (Tabela 4). Em arroz a seqüência NLS está presente em todos os genes ASR no domínio WDS (*Water Deficit Stress*) (Figura 14). Além disso, estas proteínas têm a capacidade de se ligar a DNA, como demonstrado em ensaios com ASR1 de tomate utilizando ‘*filter binding*’ e *gel -shift assays* (GILAD et al., 1997; CAKIR et al., 2003).

Tabela 4. Comparação dos sinais de localização nuclear (NLS) entre proteínas ASRs de Lírio (U18972), arroz (AF039573) e tomate Asr1 (U86130). Em cinza, aminoácidos idênticos a seqüência de LL23, e em negrito, tamanho total da proteína em aminoácidos.

Espécie/nome do gene	Seqüência NLS (Nuclear localization signal)	
Lírio LLA23	GGYTFHEHHEKKTLLKKEEEE --VEG-KKHH-- FFG	142
Arroz OsASR5	GGYAFHEHHEKKKDHKSAEE-- STGEKKHH—LFG	138
Tomate Asr1	GGFADFHEHHEKTKDAKKEEKKKLRGDTTISKLLF	115

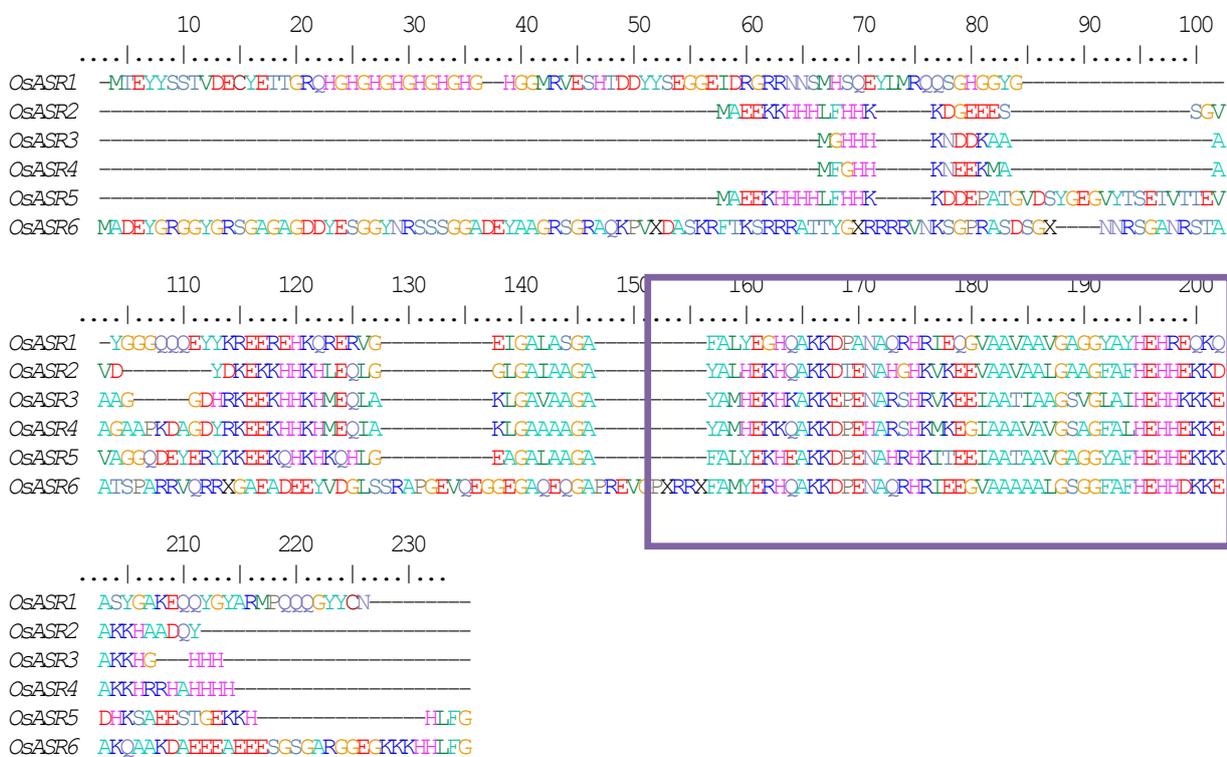


Figura 14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas da família ASR de arroz utilizando o programa de análises *BioEdit*, (Ibis Bioscience ©) mostrando o domínio WDS conservado entre os membros.

Recentemente Takasaki et al., (2008), identificaram a proteína ASR5 em frações nucleares e citosólicas de folhas de arroz, sugerindo que essa proteína possa estar localizada nesses dois compartimentos subcelulares, podendo inclusive modular sua localização em função de estímulos ambientais. O acúmulo de transcritos de *OsASR5* é induzido por seca, sal (RABBANI et al., 2003), e Al (Figura 5). Esses indícios sugerem que ASR5 possa estar envolvida na resposta a estresses abióticos.

A construção do vetor de localização para ASR5, obtida neste trabalho, permitirá a obtenção de plantas transgênicas de arroz super-expressando a fusão de *OsASR5-GFP*. A análise dessas plantas poderá revelar o comportamento da proteína, e a possível realocação da proteína em resposta a estresses.

Da mesma forma, a obtenção de plantas transgênicas de arroz silenciadas para o gene *OsASR5* bem como o possível silenciamento de outros membros da família ASR, poderão contribuir para o entendimento da função dessas proteínas nos mecanismos de defesa das plantas.

5.2 Expressão dos genes *OsASR* em resposta ao tratamento com ABA

Apesar de diversos autores relatarem a indução de ASR por ABA (AMITAI-ZEIGERSON et al., 1995; PADMANABHAN et al., 1997; VAIDYANATHAN et al., 1999; SUGIHARTO et al., 2002; CAKIR et al., 2003), o mesmo não aconteceu em nossas análises uma vez que o tratamento com ABA não induziu a expressão dos genes ASR em arroz. Esta discrepância de resultados pode ser atribuída às diferentes condições nas quais os experimentos foram realizados. Em primeiro lugar, diferentes gêneros e espécies foram utilizadas nos trabalhos descritos na literatura. Além disso, outros fatores também

podem ter contribuído para tais resultados contrastantes tais como: diferentes protocolos de tratamentos e/ou estresses aplicados às plantas, condições de crescimento, estratégias e metodologias de detecção.

Apenas *OsASR2* apresentou pequeno aumento em 1 h de tratamento com ABA. Em 6 e 10 h de experimento, houve redução dos níveis de transcritos de todos os membros da família ASR, o que pode ser explicado devido ao fato da aplicação exógena de ABA mimetizar um estresse (OLIVER et al., 2007), sendo a concentração aplicada neste experimento tóxica para a planta, resultando num estresse e menor grau de ativação de genes. A queda da expressão de *OsASR5* em resposta a ABA por tempo prolongado foi verificada também por Rabbani et al. (2003) em análises com microarranjos em raízes de arroz tratadas com 100 μ m de ABA.

ABA é considerado um hormônio vegetal envolvido na resposta a estresse abiótico em especial a déficit de água. Durante o estresse, a concentração de ABA aumenta em todos os órgãos das plantas (PLANT et al., 1991). Abordagens genéticas usando mutantes ABA-deficientes e ABA-insensitivos indicaram claramente que ABA tem uma função essencial na resposta ao estresse por déficit de água (FINKELSTEIN et al., 1990). Entretanto, seu modo específico de ação e a rota que leva a tal resposta permanecem desconhecidas (INGRAM & BARTELS, 1996). Enquanto a maioria dos ortólogos de ASR são regulados por ABA, a expressão do ortólogo de batata *DS2* é independente de ABA (DÓCZI et al., 2005).

5.3 OsASRs são reguladas por Al

Todos os genes da família gênica ASR de arroz foram fortemente regulados por Al respondendo ao estresse através do acúmulo de transcritos correspondentes a esses genes. Yang et al. (2007) relataram pela primeira vez o aumento do nível da proteína ASR5 de arroz em resposta ao tratamento com Al. Em arroz, o gene *OsASR5* foi identificado primeiramente por Vaidyanathan et al. (1999), que demonstraram um aumento nos seus níveis de mRNA, induzidos por ABA, seca e salinidade. Em trabalho posterior com microarranjos, a avaliação da regulação da expressão de genes em arroz na resposta ao tratamento com cloreto de sódio revelou a indução do acúmulo de transcritos de diversos genes entre eles, *OsASR5* (KAWASAKI et al., 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que o gene *OsASR5* é induzido em diferentes setores de raízes de arroz submetido a déficit hídrico (YANG et al., 2004). Além disso, a expressão do gene *OsASR5* foi induzido na cultivar de arroz “Pokkali” tolerante a sal, mas não na cultivar sensível “IR29” (SALEKDEH et al., 2002).

Apesar dos estudos envolvendo *OsASR5*, não há estudos relacionados aos outros membros da família ASR tanto a nível de transcrito quanto protéico em arroz, na resposta a estresses abióticos.

Nos experimentos com Al realizados neste trabalho, toda a família ASR apresentou resposta ao tratamento com Al. Apesar de todos os genes ASR apresentarem indução do acúmulo de transcritos em resposta ao Al em raiz de arroz, quando analisados os níveis de expressão da família ASR em parte aérea, *OsASR3* e *OsASR4* em 4 horas de exposição ao Al, apresentaram redução no nível de seus transcritos, o que sugere um papel para

esses genes mais acentuado na raiz, visto que, neste órgão da planta, os níveis de transcritos aumentaram drasticamente nos tempos analisados.

A proteína ASR1 de tomate possui atividade de ligação a DNA dependente de zinco, conforme demonstrado por Kalifa et al., (2004). O sítio de ligação foi mapeado na região que compreende os aminoácidos 60 a 68. Além disso, dois sítios adicionais de ligação a zinco foram encontrados na região N-terminal da proteína. Goldgur et al. (2007) demonstraram, pela utilização de algoritmos de predição, que a proteína ASR1 de tomate é monomérica e intrinsecamente desestruturada (unfold). A adição de íons de zinco resultou numa mudança conformacional da estrutura de ASR1 que resultou na dimerização da proteína. Com a ligação de íons de zinco, a proteína se tornou ordenada indicando que ASR1 é uma proteína desestruturada na ausência de zinco, e torna-se estruturada quando ligada a um íon de metal.

Em nossas análises, o alinhamento dos aminoácidos de ASR1 de tomate com as 6 proteínas ASR de arroz revelou similaridades, detalhadas na Figura 15. A região de ligação a DNA dependente de zinco de ASR1 de tomate apresenta-se bem conservada em arroz, especialmente em OsASR5, com diferença em dois aminoácidos em relação à proteína de tomate (Figura 16). Além disso, ASRs de arroz possuem regiões conservadas em relação a ASR1 de tomate na região N-terminal, sugerindo a presença de possíveis sítios de ligação a metal. ASR5 de arroz possui 4 resíduos de histidina em sua região N-terminal, enquanto em tomate, ASR1 possui 5 resíduos de histidina próximo a região N-terminal, que apresenta alta afinidade para íons de metal como níquel ou zinco (CHRISTIANSON, 1991).

O gene *OsASR5* foi analisado também quanto ao seu nível de expressão em raízes de arroz ssp *indica*, relatado na literatura como a subespécie de arroz mais suscetível ou

sensível ao Al (NGUYEN et al., 2003; MA et al., 2002; Wu et al., 2000). As análises revelaram que este gene não respondeu ao Al sendo seus níveis de transcritos iguais ao controle. Desta forma, a família gênica ASR de arroz, em especial *OsASR5*, podem estar desempenhando um papel fundamental na proteção da planta em resposta ao Al, sendo estes genes promissores para a produção de plantas com maior tolerância a Al e particularmente, a solos ácidos.

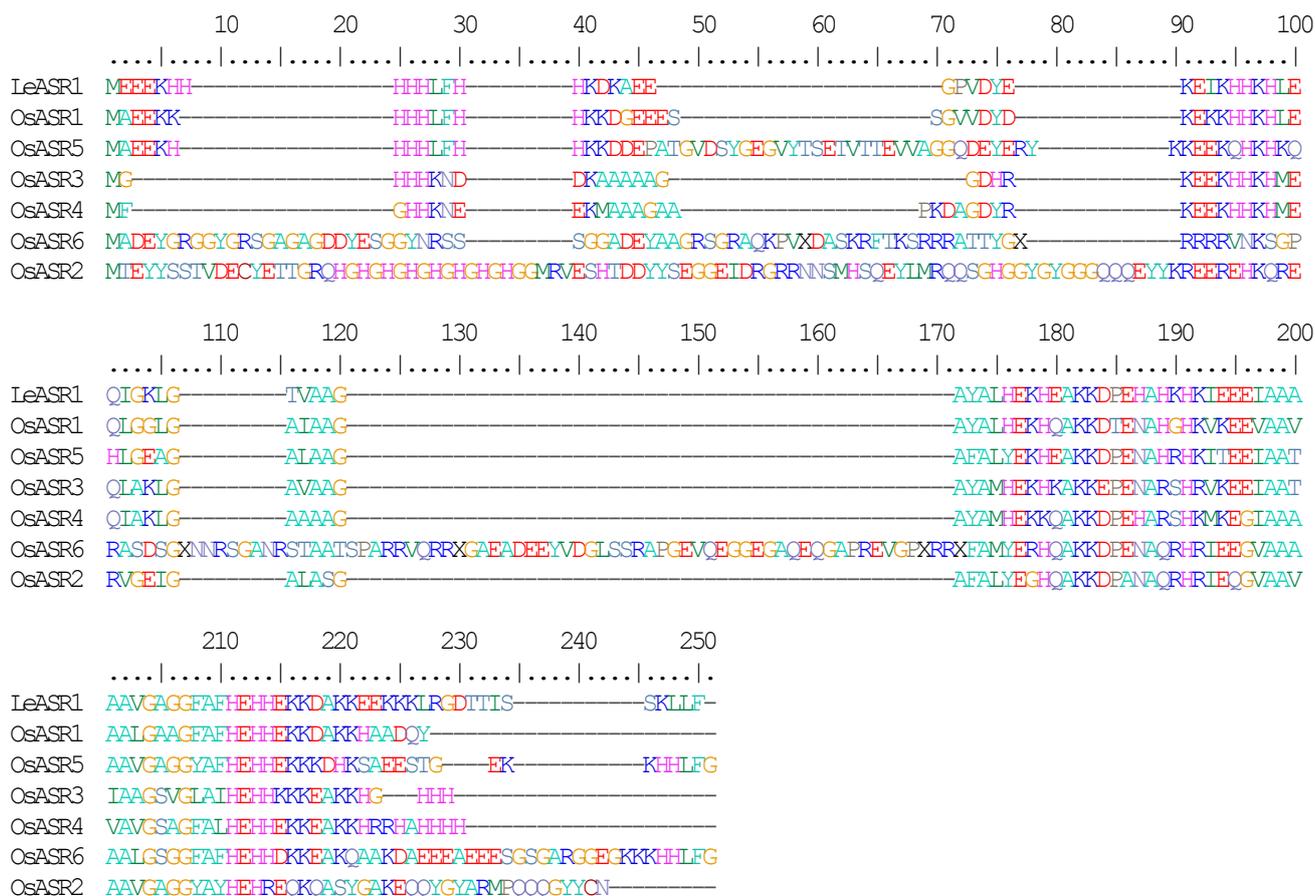
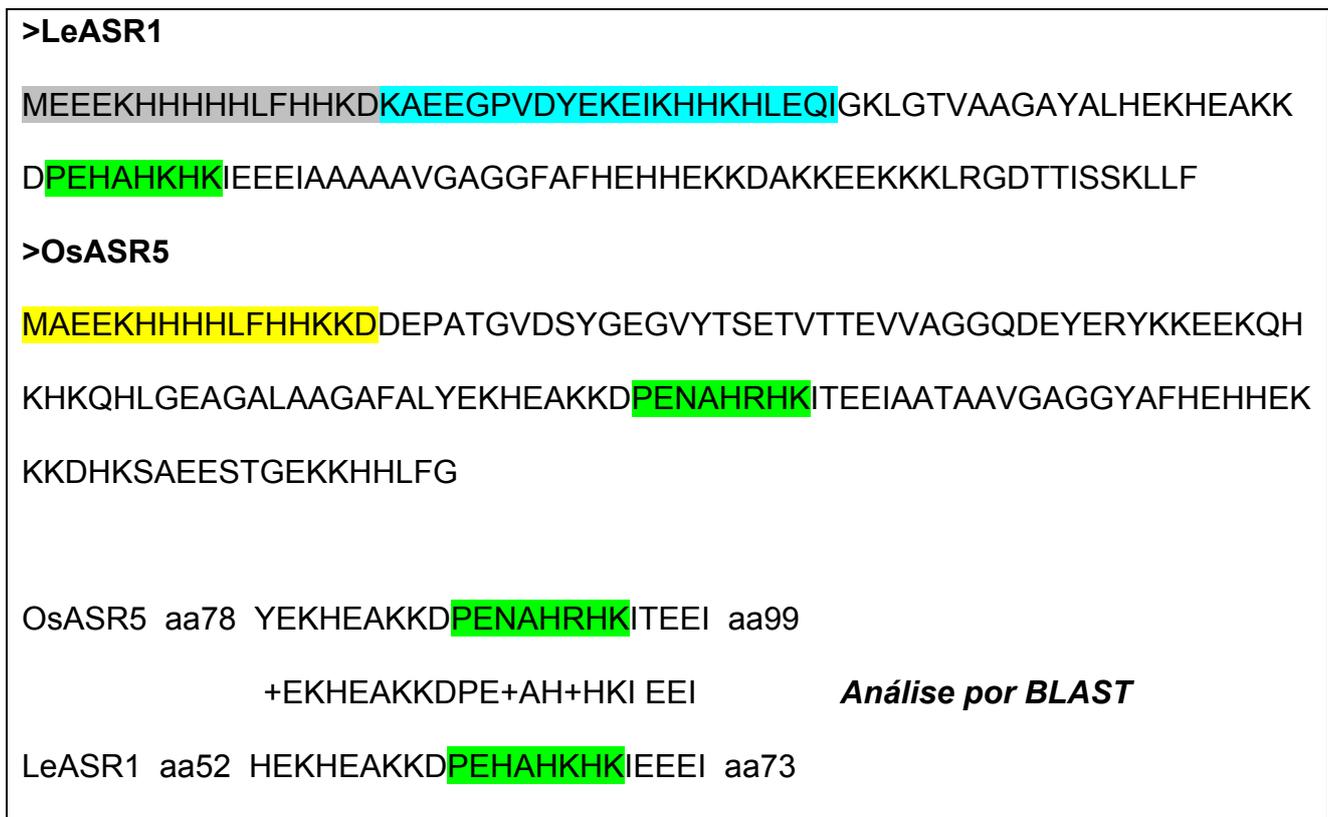


Figura 15. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos membros da família ASR de arroz com ASR1 de tomate, utilizando-se o programa de análises *BioEdit* (Ibis Bioscience ©).



-  Sítios de ligação a zinco em ASR1 de tomate
-  Possível sítio de ligação a metal em ASR5 de arroz.
-  Sítio de ligação a DNA dependente de zinco em ASR1 de tomate, e sua comparação com ASR5 de arroz.

Figura 16. Comparação das seqüências de aminoácidos de ASR5 de arroz com ASR1 de tomate, realçando-se o sítio de ligação a DNA dependente de zinco e sítios de ligação a íons de zinco em tomate e possíveis sítios em ASR5 de arroz.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi analisado o padrão de expressão de membros da família gênica ASR de arroz em resposta ao Al. Além disso, foram obtidos vetores binários de transformação de plantas visando o estudo da localização subcelular da proteína codificada pelo gene *OsASR5*, e o silenciamento gênico da família ASR de arroz.

As análises dos transcritos por qRT-PCR mostraram que todos os genes da família ASR de arroz respondem ao tratamento com Al na ssp *Japonica*, tendo seus níveis de transcritos aumentados quando a planta é exposta a diferentes concentrações de Al em raízes. *OsASR5*, no entanto, não sofre modulação de sua expressão em resposta ao Al em raízes de arroz ssp *Indica*. Essas diferenças de respostas dos genes *OsASR5* em distintas variedades podem refletir diferenças no grau de tolerância ao Al de cada um desses genótipos, resultados esses que sugerem uma possível relação do gene à proteção da planta ao Al.

A expressão dos genes ASR não foi induzida por ABA com exceção de *OsASR2*, cujo acúmulo de transcrito aumentou após uma hora de tratamento. Em 6 e 10 horas, houve queda da expressão relativa de toda a família, provavelmente devido ao efeito tóxico de ABA.

Para caracterizar a família gênica ASR frente a outros estresses, serão realizados experimentos com plântulas estressadas pelo excesso de luz, peróxido de hidrogênio, frio, e NaCl.

A transformação de plantas contendo a proteína de fusão ASR5-GFP encontra-se em andamento. Essa construção permitirá o estudo da localização dessas proteínas utilizando calos transgênicos de arroz ou plantas regeneradas. As análises em plantas

transgênicas permitirão verificar o comportamento dessa proteína em resposta a estímulos ambientais.

A transformação de plantas contendo o vetor de silenciamento gênico também está em andamento, no intuito de silenciar o gene *OsASR5* como alvo principal assim como os outros genes da família ASR como alvos secundários.

7. REFERÊNCIAS

ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, R.A.K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signalling. *Plant Cell* 15: 63–78, 2003.

ALAM, S.M.; ADAMS, W.A. Effects of aluminum on nutrient composition and yield of roots, *Journal of Plants Nutrition*, 1: 365–375, 1979.

AMITAI-ZEIGERSON, H.; SCOLNIK, P.A.; BAR-ZVI, D. Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science*, 110: 205–213, 1995.

ANIOL, A.; GUSTAFSON, J.P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat rye and triticale. *Journal of Genetics and Cytology*, 26:701-705, 1984.

BAIER, A. C.; SOMERS, D.J.; GUSTAFSON, J.P. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breeding*, 114 (4): 291–296, 1995.

BLUE, W.G.; DANTZMAN, C.L. Soil chemistry and root development in acid soils, Proc. *Soil and Crop Science Society of Florida* 36: 9–15, 1977.

BROWN, J.C.; AMBLER, J.E.; CHANEY, R.L.; FOY, C.D. Differential responses of plant genotypes to micronutrients, in: MORTYEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L. (Eds.), *Micronutrients in Agriculture*, Madison, Wisconsin. *The Soil Science Society of America Journal*: 389–418, 1962.

BROWN, J.C.; JONES, W.E. Heavy metal toxicity in plants. A crisis in embryo. Communication. Plant anal. *Soil Science*, 6: 421–438, 1975.

BOLLARD, E.G.; BUTLER, G.W. Mineral nutrition of plants, Annu. Rev. *Plant Physiology*, 17: 77–112, 1966.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443–448, 1982.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: GRUISSEM, W.; BUCHANNAN, B.; JONES, R (eds) Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists*: 1158–1249, 2000.

CAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DELROT, S.; ATANASSOVA, R. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 2165–2180, 2003.

CANEL, C.; BAILEY-SERRES, J.N.; ROOSE, M.L. Pumelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiology*, 108: 1323–1324, 1995.

CHANG, S.; PURYEAR, J.D.; DIAS, M.A.D.L.; FUNKHOUSER, E.A.; NEWTON, R.J.; CAIRNEY, J. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiology of Plant*, 97: 139–148, 1996.

CHANEY, R.L.; GIORDANO, P.M. Macroelements as related to plant deficiencies and toxicities, in: ELLIOT, L.F.; STEVENSON, F.J. (Eds.), Soils for Management and Utilization of Organic Wastes and Waste Waters. Madison, *American Society of Agronomy*: 233–280, 1977.

CHRISTIANSON, D. W. Structural biology of zinc. *Advances in Protein Chemistry*. 42: 281–355, 1991.

CHUANZAO, M.; YI, YANG, L.K.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F. E.; WU, P. Identification of aluminum-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*: 137-143, 2004.

CROWE, J.; DOBELI, H.; GENTZ, R.; HOCHULI, E.; STUBER, D.; HENCO, K. 6×His-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods in Molecular Biology*, 31: 371–387, 1994.

CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biology*, 3: 117–124, 2000.

DAVIES, W.J.; BACON, M.A. Adaptation of roots to drought. In: *Root Ecology (Ecological Studies)* (Vol. 168) (de Kroon, H. and Visser, E.J.W., eds), 173–192, Springer-Verlag, 2003.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action* (Davies, P.J., ed.), pp. 1–15, Kluwer Academic Publishers, 2004.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices). *Plant Physiology*, 103(3): 695-702, 1993.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 107: n. 2, 315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; RICHARDS, K.D.; LIN, J.M.; RYAN, P.R.; GARDNER, R.C. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11):7082-8, 1999.

DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; RYAN, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiology*, 125(4): 2059-67, 2001.

DÓCZI, R.; KONDRÁK, M.; KOVÁCS, G.; BECZNER, F.; BANFALVI, Z. Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. *Plant Physiology Biochemical*, 43: 269–276, 2005.

DUNCAN, R. R.; BALIGAR, V. C. Genetics and physiological basis of nutrient uptake and use efficiency. In: BALIGAR, V.C.; DUNCAN, R.R., (Eds.). Crops as enhancers of nutrient use. *Academic Press*, p.3-35, 1990.

EMBRAPA – Arroz. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br> Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.

ERMOLAYEV, V.; WESCHKE, W.; MANTEUFFEL, R. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *Journal of Experimental Botany*, 54:2745–2756, 2003.

EZAKI, B.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in tobacco cultured cells. *Physiology of Plant*, 93: 11–18, 1995.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced gene in transgenic arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/oxidative stress. *Plant Physiology*, 122: 3, 531-538, 2000.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRITH, R.J. Aluminum toxicity in crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, (11) 3: p.303-319, 1988.

FAGERIA, N.K. Sistemas de cultivo consorciado. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. *Embrapa-DPU*, p.185-196, 1989.

FAGERIA, N.K; ZIMMERMANN, F.J.P; BALIGAR, V.C. Lime and phosphorus interaction on growth and nutrient uptake by upland rice, wheat, common bean and corn in on oxisol. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 2519-2532, 1995.

FERREIRA, R. P. Análises biométricas da tolerância do arroz (*Oryza sativa* L.) Dr. tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

FINKELSTEIN, R.R.; GIBSON, S. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd?, *Current. Opinion. Plant Biology*, 5: 26–32, 2002.

FINKELSTEIN, R.R.; SOMERVILLE, C.R. Three classes of abscisic acid (ABA) insensitive mutations of arabidopsis define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiology*, 94: 1172–1179, 1990.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings, *Plant Cell*, 14 :(suppl.)-S15–S45, 2002.

FOY, C.D. The physiology of plant adaptation to metal stress. *Journal Research*, 57: 355–391, 1983.

FOY, C.D. Soil chemical factors limiting plant root growth, in: HATFIELD, J.L.; STEWART, B.A. (Eds.), *Advances in Soil Sciences: Limitations to Plant Root Growth*, Vol. 19, *Springer Verlag*: 97–149, 1992.

FRANKEL, N.; CARRARI, F.; HASSON, E.; IUSEM, N.D. Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene*, 378: 74–83, 2006.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Plant comparative genetics after 10 years. *Science*, 282 (5389): 656-659, 1998. In: SHIMAMOTO, K. & KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 399-419, 2002.

GAO, J.P.; CHAO, D.Y.; LIN, H.X. Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: (6): 742–750, 2007.

GERLOFF, G.C. Comparative mineral nutrition of plants. *Annu. Rev. Plant Physiology*, 14: 107–124, 1963.

GILAD, A.; AMITAI-ZEIGERSON, H.; SCOLNIK, P.A.; BAR-ZVI, D. Asr1, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. *Acta Horticulturae*, 447: 447–453, 1997.

GOLDGUR, Y.; ROM, S.; GHIRLANDO, R.; SHKOLNIK, D.; SHADRIN, N.; KONRAD, Z.; BAR-ZVI, D. Desiccation and Zinc Binding Induce Transition of Tomato Abscisic Acid Stress Ripening 1, a Water Stress- and Salt Stress-Regulated Plant-Specific Protein, from Unfolded to Folded State. *Plant Physiology*, 143: 617–628, 2007.

GOEDERT, W.J. Região dos cerrados: potencial agrícola e política para o seu desenvolvimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 24(1): 1-17, 1989.

GONZÁLES-GARCÍA, M.P.; RODRÍGUEZ, D.; NICOLÁS, C.; RODRÍGUEZ, P.L.; NICOLÁS, G.; LORENZO, O. Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant Physiology*, 133: 135–144, 2003.

GRENNAN, A.K. Abiotic Stress in Rice. An “Omic” Approach. *Plant Physiology*, 140: 1139-1141, 2006.

HARUSHIMA, Y.; YANO, M.; SHOMURA, A.; SATO, M.; SHIMANO, T.; KUBOKI, Y.; YAMAMOTO, T.; LIN, S.Y.; ANTONIO, B.A.; PARCO, A.; KAJIYA, H.; HUANG, N.; YAMAMOTO, K.; NAGAMURA, Y.; KURATA, N.; KHUSH, G.S. & SASAKI, T. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics*, 148: 479-494, 1998.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Phy. Plant Molecular Biology*, 51: 463–499, 2000.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T. & KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2): 271-282, 1994.

Internacional Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436 (11): 793-800, 2005.

HONG, S.H.; KIM, I.J.; YANG, D.C.; CHUNG, W-II. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from Cucumis melo. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2271–2272, 2002.

HOSE, E. et al. Abscisic acid in roots—biochemistry and physiology, In *Plant Roots: The Hidden Half* (3rd edn) (Waisel, Y. et al., eds), 435–448, 2002.

HOTH, S.; MORGANTE, M.; SANCHEZ, J.P.; MICHAEL, K.; HANAFEY, S.V.T.; NAM-HAI, C. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science*, 115: 4891-4900, 2002.

IKEGAWA, H.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Responses to aluminum of suspension-cultured tobacco cells in a simple calcium solution. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46: 503-514, 2000.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 47: 377–403, 1996.

IUSEM, N.D.; BARTHOLOMEW, D.M.; HITZ, W.D.; SCOLNIK, P.A. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiology*, 102: 1353–1354, 1993.

JORGE, R. A.; ARRUDA, P. Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. *Phytochemistry*, 45: 4, 675-681, 1997.

KALIFA, Y.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; ZACCAI, M.; SCOLNIK, P.; BAR-ZVI, D. The water- and salt-stress regulated *Asr1* gene encodes a zinc dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal*, 381: 373–378, 2004.

- KALIFA, Y.; PEARLSON, E.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; SCOLNIK, P.A.; BAR-ZVI, D. Overexpression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell and Environment*, 27: 1459–1468, 2004b.
- KHATIWADA, S.P.; SENADHIRA, D.; CARPENA, A.L.; ZEIGLER, R.S.; FERNANDEZ, P.G. Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 738–744, 1996.
- KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 13: 889–905, 2001.
- KIKUI, S.; SASAKI, T.; MAEKAWA, M.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, A. Physiological and genetic analyses of aluminium tolerance in rice, focusing on root growth during germination. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99: 1837–1844, 2005.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 46: 237-260, 1995.
- KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review Plant Biology*, 55: 459–493, 2004.
- KOCHIAN, L.V.; PINEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. *Plant Soil*, 274:175–195, 2005.
- KOORNNEEF, M.; LEON-KLOOSTERZIEL I, K.M.; SCHWARTZ, S.H.; ZEEVAART, J.A.D. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36 (1-2): 83-89, 1998.

KUSABA, M.; MIYAHARA, K.; IIDA, S.; FUKUOKA, H.; TACANO, T.; SASSA, H.; NISHIMURA, M.; NISHIO, T. Low glutelin content 1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell*, 15: 1455-1467, 2003.

LAGOS, M.B.; FERNANDES, M.I.B. de M.; CAMARGO, C.E. de O.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de Genética*, 14, n.4:1011-1020, 1991.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Structural Biology*, 11: 39–46, 2001.

LEE, H.; XIONG, L.; GONG, Z.; ISHITANI, M.; STEVENSON, B.; ZHU, J.K. The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes & Development*, 15: 912–924, 2001.

LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 49: 199-222, 1998.

LIU, K.; LUAN, S. Internal Aluminum Block of Plant Inward K⁺ Channels. *The Plant Cell*, 13: 1453-1466, 2001.

LU, C.; FEDOROFF, N. A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell*, 12: 2351-2365, 2000.

MA, Z.; MIYASAKA, S.C. Oxalate Exudation by Taro in Response to Al. *Plant Physiology*, 118: 861-865, 1998.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6: 273-278, 2001.

MA, J. F.; SHEN, R. F.; ZHAO, Z. Q.; MATTHIAS, W.; YOSHINOBU, T.; EBITANI, T.; YANO, M. Response of Rice to Al Stress and Identification of Quantitative Trait Loci for Al Tolerance. *Plant Cell Physiology*, 43: 652–659, 2002.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139–158, 2006.

MAO, C.; YI, K.; YANG, I.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; WU, P. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *Journal of Experimental Botany*, 55: 394, 137-143, 2004.

MASKIN, L.; GODESBLAT, G.E.; MORENO, J.E.; CARRARI, F.O.; FRANKEL, N.; SAMBADE, A.; ROSSI, M.M.; IUSEM, N.D. Differential expression of the members of Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Plant Science*, 161: 739–746, 2001.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*, 200: 1-46, 2000.

MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; GOMEZ, R.M.; FILS-LUACON, B. Molecular cloning and nucleotide sequence of an abscisic acid-stress-ripening induced (ASR)-like protein from apricot fruit (acc. No. U93164): gene expression during fruit ripening. *Plant Physiology*, 115: 1288, 1997.

MENOSSI, M.; MARON, L.G.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P. NCBI Database, accession number AF031083, Direct Submission, 1999.

MILLA, M.A.; BUTLER, E.; HUETE, A.R.; WILSON, C.F.; ANDERSON, O.; GUSTAFSON, J.P. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant Physiology*, 130(4):1706-16, 2002.

MIKI, D.; SHIMAMOTO, K. Simple vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiology*, 45 (4): 490 - 495, 2004.

MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z. & GALE, M.D. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology*, 5(7): 737-739, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497, 1962.

NGUYEN, V.T.; THANH, L.D.; PATERSON, A.H.; BINH, L.T.; NGUYEN, H.T. Rapid screening method for aluminum tolerance in rice in nutrient solution (in Vietnamese with English abstract). *Journal of Genetic Application* (ISSN: 0866-8566) 2:5–11, 2000.

NGUYEN, V.T.; BUROW, M.D.; NGUYEN, H.T.; LE, B.T.; LE, T.D.; PATERSON, A.H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1002–1010, 2001.

NGUYEN, V.T.; NGUYEN, B.D.; SASRKARUNG, S.; MARTINEZ, C.; PATERSON, A.H.; NGUYEN, H.T. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. *Molecular Genetics and Genomics*, 267: 772-780, 2002.

NORTH, H.M.; ALMEIDA, A.; BOUTIN, J.P.; FREY, A.; TO, A.; BOTRAN, L.; SOTTA, B.; POLL, A.M. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal*, 50: 810–824, 2007.

OLIVER, S.N.; DENNIS, E.S.; DOLFERUS, R. ABA Regulates Apoplastic Sugar Transport and is a Potential Signal for Cold-Induced Pollen Sterility in Rice. *Plant Cell and Physiology*, 48(9): 1319–1330, 2007.

PADMANABHAN V, DIAS, D.; NEWTON R.J. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology*, 35: 801–807, 1997.

PANDEY, S.; TIWARY, S.B.; UPADHYAYA, K.C.; SOPORY, S.K. Calcium signaling: linking environmental signals to cellular functions. *CRC Crit Rev. Plant Science*, 19: 291–318, 2000.

PLANT, A.L.; COHEN, A.; MOSES, M.S.; BRAY, E.A. Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought and abscisic acid-induced gene in tomato. *Plant Physiology*, 97: 900-906, 1991.

RABBANI, M.A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755–1767, 2003.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environment*, 25:141–151, 2002.

RICCARDI, F.; GAZEAU, D.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology*, 117: 1253–1263, 1998.

RHAGLAND, M.; SOLIMAN, K.M. Two genes induced by Al in soybean roots. *Plant Physiology*, 114: 395, 1997.

RICHARDS, K.D.; SCHOTT, E.J.; SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R.; GARDNER, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116: 409–418, 1998.

RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminium Toxicity in Roots: An Investigation of Spatial Sensitivity and the Role of the Root Cap. *Journal of Experimental Botany*, 44: 437-446, 1993.

SALAKDEH, G.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice. *Field Crops Research*, 76:199–219, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 2344, 1989.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37: (5), 645-653, 2004.

SHEN, G.; PANG, Y.; WU, W.; DENG, Z.; LIU, X.; LIN, J.; ZHAO, L.; SUN, X.; TANG, K. Molecular cloning, characterization and expression of a novel Asr gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 836–843, 2005.

SILHAVI, D.; HUTVAGNER, G.; BARTA, E.; BANFALVI, Z. Isolation and characterization of a water-stress inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology*, 27: 587–595, 1995.

SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2: 503–512, 1990.

SNOWDEN, K.C.; GARDNER, R.C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiology*, 103: 855-861, 1993.

STEBER, C. M.; McCOURT, P. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 125: 763-769, 2001.

SUGIHARTO, B.; ERMAWATI, N.; MORI, H.; AOKI, K.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; YAMAYA, T.; SUGIYAMA, T.; SAKAKIBARA, H. Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant Cell and Physiology*, 43: 350–354, 2002.

TAYLOR, I.B. Genetics of ABA synthesis. In: *Abscisic acid, physiology and biochemistry*, DAVIES, W.J.; JONES, H.G. *Bios Scientific*, 23-37, 1991.

TAYLOR, I. B.; BURBRIDGE, A.; THOMPSON, A. J. Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1563-1574, 2000.

The Rice Annotation Project. Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 17: 175-183, 2007.

VAIDYANATHAN, R.; KURUVILLA, S.; THOMAS, G. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science*, 140: 25–36, 1999.

VALLEE, B. L.; AULD, D. S. Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins. *Faraday Discussion*, 93: 47–65, 1992.

VISWANATHAN, C.; ZHU, J.K. Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *Philos Trans R Soc Lond B. Biological Sciences*, 357: 877–886, 2002.

WALLACE, A.; ROMMEY, E.M. Aluminium toxicity in plants grown in solution culture, *Commun. Plant Anal. Soil Science*, 8: 791–794, 1977.

WANG, C.S.; LIAU, Y.E.; HUANG, J.C.; WU, T.D.; SU, C.C.; LIN, C.H. Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant Cell Physiology*, 39: 1307–1314, 1998.

WANG, H.; MIYAZAKI, S.; KAWAI, K.; DEYHOLOS, M.; GALBRAITH, D.W.; BONHERT, H.J. Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology*, 52: 873–891, 2003a.

WANG, H.J.; HSU, C.M.; GUANG, Y.J.; WANG, C.S. A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiology of Plants*, 123: 314–320, 2005.

WANG, X. Q.; ULLAH, H.; JONES, A. M.; ASSMANN, S. M. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science*, 292: 2070-2072, 2001.

WU, Y.; KUZMA, J.; MARECHAL, E.; GRAEFF, R.; LEE, H.C.; FOSTER, R.; CHUA, N.H. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science*, 278:2126–2130, 1997.

WU, P.; ZHAO, B.; YAN, J.; LUO, A.; WU, Y.; SENADHIRA, D. Genetic control of seedling tolerance to aluminum toxicity in rice. *Euphytica*, 97: 289–293, 1997.

WU, P.; LIAO, C.Y.; HU, B.; YI, K.K.; JIN, W.Z.; NI, J.J.; HE, C. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seeding stages. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:1295–1303, 2000.

XIONG, L.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHU, J. K. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress and osmotic stress responsive gene expression. *Plant Cell*, 13: 2063-2083, 2001.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 8588-8596, 2002.

YANG, L.; ZHENG, E.B.; MAO, E.C.; QI, E.X.; LIU, E.F.; WU, E.P. Analysis of transcripts that are differentially expressed in three sectors of the rice root system under water deficit. *Molecular Genetics and Genomics*, 272: 433–442, 2004.

YANG, C.Y.; CHEN, Y.C.; JAUH, G.Y.; WANG, C.S. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139: 836–846, 2005.

YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W.; QIAN, C.; PENG, X. 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, 2007.

YANG, J.L.; LI, Y.Y.; ZHANG, Y.J.; ZHANG, S.S.; WU, Y.R.; WU, P.; ZHENG, S.J. Cell Wall Polysaccharides Are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminum from the Rice Root Apex. *Plant Physiology*, 146: 602–611, 2008.

ZHENG, J.; KNIGHTON, D.R.; XUONG, N.H.; TAYLOR, S.S.; SOWADSKI, H.M.; TEN EYCK, L.F. Crystal structures of the myristoylated catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase reveal open and closed conformations, *Protein Science*, 2:1559–1573, 1993.

APÊNDICE

Seqüências de cDNA dos genes *OsASR* e alinhamento dos “*primers*” utilizados nas análises da expressão transcricional por RT-PCR quantitativo. Negrito corresponde às seqüências nas quais os *primers* anelam-se, e em cinza, o íntron.

OsASR1 >LOC_Os02g33820

cDNA

ATGGCTGAGGAGAAGAAGCACCACCACCTGTTCCACCACAAGAAGGACGGGGAGGAGGAGAGCTCCG
GCGT**TGGTGGACTACGACAAGGAGA**AAGAAGCACCACAAGCACCTCGAGCAGCTCGGCGGCCTCGGCG
CCATCGCCGCCGGCGCCTACGCTCTCGTAAGTCATTAATTAGTACATTTGACCACCACTATTACAAGAAA
ATCGATTTTCGACAGCTATATGTCATCCCCCACTTTAACTAACCTATATGTTTTAGCCGCTTGAAAAAT
CGATTATGTAGTGGTGAACATGATCTAATGATAACTACCTAGCCATAGCTGATTAATTAAGAGATAATTA
ACGGAGAATTTATTTGTGGTACGTCGTTGCAGCACGAGAAGCACCAGGCGAAGAAGGACACGGAGAAC
GCGCACGGGCACA**AGGTGAAGGAGGAGGTGGC**GGCGGTGGCCGCGCTGGGCGCCGCGGGGTTTCGC
CTTCCACGAGCACCACGAGAAGAAGGACGCCAAGAAGCACGCCGCGGACCAATACTAG

OLIGO [start](#) [len](#) [tm](#) [gc%](#) [any](#) [3' seq](#)
LEFT PRIMER 1 21 60.70 52.38 3.00 0.00 TGGTGGACTACGACAAGGAGA
RIGHT PRIMER 157 18 60.62 66.67 2.00 0.00 GCCACCTCCTCCTTACC

OsASR2 >LOC_Os01g73250

cDNA

ATGACGGAGTACTACTCCAGCACCGTGGACGAGTGCTACGAGACCACCGGCAGGCAGCACGGCCACG
GGCACGGCCACGGTCACGGGCACGGGCACGGGCATGGTGGCATGAGGGTGGAGTCCCACACCGGACG
ACTACTACAGCGAGGGCGGCGAGATCGACCGTGGGAGGAGGAACAACCTCCATGCACTCGCAGGAGTA
CCTGATGAGGCAGCAGAGCGGCC**CATGGCGGCTACGGCTAC**GGCGGCGGCCAGCAGCAGGAGTACTA
CAAGCGGGAGGAGCGCGAGCACAAGCAGCGCGAGCGCGTCCGGCGAGATCGGGCGCCCTCGCCAGCGG
CGCCTTCGCTCTCGTATGTCCTTAGATCTTCTCATCTTCAATAATTCTTGATGTATTCCTCCTTTTTTTA
TAGATGATACCGTCAAATTTAAACACATATTTAACAATTCATTTATTCAAAAATTTTATATAACTATATAAG
ATGTAATCATGCTTAAAGTACGTAAAGTGATAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TAAATGAATGGTTAAATTTGTGATGAAAACCAACGACATCATCTATTGAAAAACAGAGATAGCATTATAT
TAAATTAGAGCAATTTTATGGTTTTTAAGATGTATACCACACGTTTACATTAAACTTTTTGGTACGTACATC
ATAATACATTCTCAAGGATTGTAAACTGCTTATTAATTAGCTGAATATATATATATCGATCGGTAATATA
TACGATGTGTTGGATGATCAGTATGAGGGGCACCAGGCG**AAGAAGGACCCGGCGAAC**GCAGAGG
CACAGGATCGAGCAGGGCGTGGCGGCGGTGGCGGCGGTGGGCGCCGGCGGCTACGCCTACCACGA
GCACCGCGAGCAGAAGCAGGCCAGCTACGGCGCCAAGGAGCAGCAGTACGGCTACGCCAGGATGCC
GCAGCAGCAGGGCTACTACTGCAACTGA

OLIGO [start](#) [len](#) [tm](#) [gc%](#) [any](#) [3' seq](#)
LEFT PRIMER 13 18 62.70 66.67 4.00 0.00 CATGGCGGCTACGGCTAC
RIGHT PRIMER 171 18 62.50 61.11 4.00 0.00 GTTCGCCGGGTCTTCTT

OsASR3 >LOC_Os01g72900

cDNA

ATGGGGCAC**CACCACAAGAACGACGACA**AGGCCGCGGCGGCGGCCGGCGGCGACCACCGCAAGGA
GGAGAAGCACCACAAGCACATGGAGCAGCTTGCCAAGCTCGGCGCCGTCGCCGCCGGAGCATAACGCC
ATGGTACTTACCATTTTCAACTAAAGATCGATCCTAAGTGCATCCATGAATTGTACATGTTGGTGTGCTTT

TGATGCATGCATCCCAATGTCAGTTTCTTAACTTGTGATTTGATGATGCGTGTGTGGGTGCAGCACGAG
AAGCACAAGGCCGAAGAAGGAACCGGAGAATGCGCGGTGCGCACAGGGTGAAGGAGGAGATCGCCGCCA
CCATCGCCGCCGGCAGCGTCCGCCTCG**CCATCCACGAGCATCACA**AAGAAGAAGGAAGCTAAGAAGCA
TGGCCATCACCATTAG

OLIGO [start](#) [len](#) [tm](#) [gc%](#) [any](#) [3' seq](#)
LEFT PRIMER 10 20 60.76 50.00 3.00 0.00 CACCACAAGAACGACGACAA
RIGHT PRIMER 205 18 60.21 55.56 4.00 0.00 TGTGATGCTCGTGGATGG

OSASR4 >LOC_Os01g72910 Gen

cDNA

ATGTTTCGGCCACCACAAGAACGAGGAGAAGATGGCAGCAGCCGGGGCGGCGCCCAAGGACGCCGGC
GACTATCGCAAGGAGGAGAAAGCACCACAAGCAGCATGGAGCAGATCGCCAAGCTCGGCGCCGCCGCC
GCCGGAGCATACGCCATGGTACATATACGTACATTGTGTTCTTGATTCTACGTACTTAATTAGCTTCTAG
CTAGCTAATGATCTTAATTAATTAATTAGTAGTAGCACTGCTAATGATCTGACGCATCTGTATGCATGGTG
TGCTGCAGCATGAGAAGAAGCAGGCGAAGAAGGACCCGGAGCACGCGCGGTGCGCA**CAAGATGAAGG**
AAGGGATCGCCGCCCGCGTCCGCGTCCGCGAGCGCCGGATTCGCCCTCCACGAGCACCACGAGAAGA
AGGAAGCCAAGAAGCACCGCCGCCATGCCACCACCACCTAA

OLIGO [start](#) [len](#) [tm](#) [gc%](#) [any](#) [3' seq](#)
LEFT PRIMER 14 20 60.50 55.00 4.00 0.00 CGACTATCGCAAGGAGGAGA
RIGHT PRIMER 165 20 59.62 50.00 4.00 1.00 CGATCCCTTCCTTCATCTTG

OsASR5

> LOC_Os11g06720

cDNA

ATGGCGGAGGAGAAGCACCACCACCTGTTCCACCACAAGAAGGACGACGAGCCGGCCACCGGAG
TAGACTCCTACGGCGAGGGCGTCTACACGTGCGGAGACGGTGACCACCGAGGTGGTCGCCGGCGG**CCA**
GGACGAGTACGAGAGGTTACAAGAAGGAGGAGAAGCAGCACAAGCACAAGCAGCACCTCGGCGAGGC
CGGCGCCCTCGCCGCCGGCGCCTTCGCCCTGGTAATTAATAATTAATTAACCACTAATTAATTGATCTA
ACGCCGCCTTAATTAATCAATTAATTTGCTAAGAAATCATCAAGAAGTAATTAATTAAGCTGATTAATCGT
GGTGTGTAGTATGAGAAGCACGAGGCGAAGAAGGACCCGGAGAACGCGCACAGGC**CAAGATCACGG**
AGGAGATCGCGGCCACGGCGGGCGGTGCGCGCCGGCGGCTACGCCTTCCACGAGCACCACGAGAAGA
AGAAGGACCACAAGAGCGCCGAGGAGTCCACC GGCGAGAAGAAGCACCACCTCTTCGGCTGA

OLIGO [start](#) [len](#) [tm](#) [gc%](#) [any](#) [3' seq](#)
LEFT PRIMER 96 20 59.33 60.00 4.00 0.00 CCAGGACGAGTACGAGAGGT
RIGHT PRIMER 262 20 60.76 55.00 4.00 2.00 CGATCTCCTCCGTGATCTTG

OsASR6 >LOC_Os04g34600

cDNA

ATGGCTGACGAGTACGGCCGCGCGGCTACGGCAGGTCCGGCGCCGGCGCCGGCGACGACTACGAG
AGCGGCGGCTACAACAGGTCCAGCTCCGGCGGCGCCGACGAGTACGCCGCCGGCCGGAGCGGTCTG
GCTCAAAGCCGGTGNACGACGCTTCGAAACGCTTACAAAGTCNCGGCGGCGCGACGACTTACG
GCGNACGGCGGCGGCGGTTCAACAAGTCCGGACCGCGCTTCCGACAGCGGCTNCAACAACAGGT
CAGGGGCTAACAGAAGTACGGCCGCAACAAGTCCGGCGCGACGAGTACAGCGGCGGNGCGCGCCG
AAGCCGACGAGGAGTACGTCGACGGGTTGTCGTCCCGGGC**GCCCGGAGAAGTACAGGAAGGAGGAG**
AAGGAGCACAAGAACAAGGAGCGCCTCGCGAGGTGGGGCCNTCCGCCGGCNCTTCGCCATGGTACG
TTCTTGAACCTCGATCAATTTCTCAAAATAAATAACTCGGTGCGGCCATTGACGACGATAGATGACCA
TGCGTGCAGTACGAGAGGCACCAGGCGAAGAAGGACCCGGAGAACGCGCAGCGG**CACAGGATCGAG**

GAGGGCGTGGCGGCGGCGGCGGCGCTGGGGAGCGGCGGGTTCGCGTTCACGAGCACCACGACAA
GAAGGAGGCCAAGCAGGCGGCGAAGGACGCCGAGGAGGAGGCGGAGGAGGAGTCCGGCTCCGGCG
CCCGCGGCGGCGAGGGGAAGAAGAAGCACCACCTCTTCGGCTGA

OLIGO [start](#) [len](#) [tm](#) [gc%](#) [any](#) [3' seq](#)
LEFT PRIMER 1 20 61.14 60.00 4.00 0.00 GCCCGGAGAAGTACAGGAAG
RIGHT PRIMER 151 18 61.79 66.67 4.00 0.00 GCCCTCCTCGATCCTGTG

Primers utilizados para amplificação do cDNA completo de OsASR5 para inserção em vetores de localização subcelular e silenciamento gênico.

cDNA de OsASR5

CACCATGGCGGAGGAGAAGCACCACCACCACCTGTTCCACCACAAGAAGGACGACGAGCCGGCCACC
GGAGTAGACTCCTACGGCGAGGGCGTCTACACGTCGGAGACGGTGACCACCGAGGTGGTCGCCGGC
GGCCAGGACGAGTACGAGAGGTACAAGAAGGAGGAGAAGCAGCACAAGCACAAGCAGCACCTCGGCG
AGGCCGGCGCCCTCGCCGCCGGCGCCTTCGCCCTGTATGAGAAGCACGAGGCCGAAGAAGGACCCGG
AGAACGCGCACAGGCACAAGATCACGGAGGAGATCGCGGCCACGGCGGCGGTTCGGCGCCGGCGGCT
ACGCCTTCACGAGCACCACGAGAAGAAGAAGGACCACAAGAGCGCCGAGGAGTCCACCGGCGGAGAA
GAAG**CACCACCTCTTCGGCTGA**

CURRICULUM VITÆ resumido

ARENHART, R.A.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rafael Augusto Arenhart

Local e data de nascimento: Cuiabá – Mt – Brasil, 02/03/1981

E-mail: rafaarenhart@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO: Ciências Biológicas – Ênfase em Biotecnologia – Universidade do Vale do Itajaí – 1999/1 a 2005/2

3. ESTÁGIOS: 1 - monitoria – Lab. De cultivo celular – Univali – Resp. Dr Gilmar R. Zaffari;

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Pesquisador de Apoio técnico - Análise funcional de genes potencialmente envolvidos nas respostas das plantas de arroz (*Oryza sativa*) ao tratamento por alumínio – UFRGS, bolsa CNPq –Res. Dra Marcia Margis

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. LIMA, J. C. ; ARENHART, R. A. ; MARGIS, R. ; MARGIS-PINHEIRO, M. . Aluminium effects on microRNA expression in rice roots. In: RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA, 2008. RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA, 2008.
2. ARENHART, R. A. ; BEVITORI, R. ; MARGIS, R. ; MARGIS-PINHEIRO, M. . ANÁLISE DE GENES DE ARROZ DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO. In: XI Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal, 2007, Gramado. XI Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal, 2007.
3. ABREU-NETO, J. B. ; RAUBER, R. ; PEDRON, M. ; ARENHART, R. A. ; BEVITORI, R. ; ZANETTINI, M. H. ; MARGIS-PINHEIRO, M. . GENÔMICA FUNCIONAL A PARTIR DE MUTAGÊNESE INSERCIONAL EM ARROZ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare). In: XI Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal, 2007, Gramado. XI Congresso Nacional de Fisiologia Vegetal, 2007.
4. LIMA, J. C. ; Caverzan, A. ; ARENHART, R. A. ; MARGIS-PINHEIRO, M. ; MARGIS, R. . PADRÃO DE EXPRESSÃO DE microRNAs EM ARROZ SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS. In: 53 Congresso Nacional de genética, 2007, Águas de Lindóia. 53 Congresso Nacional de genética, 2007.
5. MAZZAROTTO, G. C. ; ARENHART, R. A. ; MULLER, G. ; MELO, T. ; MACHADO, M. ; LIRA, V. ; PERCIAVALLE, G. ; LIMA, A. O. S. ; SILVA, M. A. C. . Avaliação da resistência a antibióticos de amostras de *Chromobacterium violaceum* isoladas de rios de Santa Catarina-Brasil. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005.
6. ZAFFARI, G. R. ; NICOLETTI, M. E. ; ARENHART, R. A. ; PEREIRA, C. L. A. . Estabelecimento in vitro de *Bambusa gracilis*. In: 2 Congresso Brasileiro de Cultura de tecidos de plantas, 2005, Fortaleza. 2 Congresso Brasileiro de Cultura de tecidos de plantas, 2005.

7. PEREIRA, C. L. A. ; BATISTA, M. J. ; ARENHART, R. A. ; ZAFFARI, G. R. . Estabelecimento in vitro de *Calatea saturno*. In: 56º Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba. 56º Congresso Nacional de Botânica, 2005.
8. BATISTA, M. J. ; PEREIRA, C. L. A. ; ARENHART, R. A. ; ZAFFARI, G. R. . Estabelecimento in vitro de *Estrelitzia reginae* a partir de semente. In: 56 ° CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2005, Curitiba. 56 ° CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2005.
9. ARENHART, R. A. ; PEREIRA, C. L. A. ; BATISTA, M. J. ; ZAFFARI, G. R. . Estabelecimento in vitro de *Liquidambar styraciflua*. In: 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba. 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005.
10. STERN NETO, C. ; ARENHART, R. A. ; ZAFFARI, G. R. . Estabelecimento in vitro de *Passiflora alata* Curtis. In: 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba. 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005.
11. PEREIRA, C. L. A. ; ARENHART, R. A. ; RODRIGUES, H. M. ; ZAFFARI, G. R. . Estabelecimento in vitro de *Streptocarpus saxorum* Eng.. In: 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005, Fortaleza. 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005.
12. BATISTA, M. J. ; ARENHART, R. A. ; PEREIRA, C. L. A. ; ZAFFARI, G. R. . Micropropagação de *Zantedeschia aethiopica* Calla (copo-de-leite). In: 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005. 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005.
13. ZAFFARI, G. R. ; COELHO, M. R. ; ARENHART, R. A. ; PEREIRA, C. L. A. . Produção de mudas de *Arundina bambusifolia* a partir de organogênese direta in vitro. In: 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005. 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005.
14. ZAFFARI, G. R. ; COMANDOLLI, V. ; ARENHART, R. A. ; PEREIRA, C. L. A. . Propagação in vitro da espécie *Murraya paniculata*. In: 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005, Fortaleza. 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005.
15. PEREIRA, C. L. A. ; RISCH, O. L. ; ARENHART, R. A. ; ZAFFARI, G. R. . Propagação in vitro de *Impatiens walleriana* Hook. In: 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005, Fortaleza. 2 CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005.
16. BATISTA, M. J. ; PEREIRA, C. L. A. ; ARENHART, R. A. ; ZAFFARI, G. R. . Propagação vegetativa in vitro de *Agave angustifolia* e *Agave macroacantha*. In: 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba. 56 ° Congresso Nacional de Botânica, 2005.
17. ARENHART, R. A. ; PEREIRA, C. L. A. ; BATISTA, M. J. ; ZAFFARI, G. R. . Regeneração de plântulas de *Eucalyptus grandis* a partir de organogênese direta in vitro. In: 56º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2005, Curitiba. 56º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2005.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. ARENHART, R. A. ; ZAFFARI, G. R. . Regeneração de plântulas de *Eucalyptus grandis* a partir de organogênese direta in vitro. *Agropecuária Catarinense*, v. 21, p. 74/3-78, 2008.