



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Produção de vetores de transformação de plantas contendo fusões das proteínas ASR (*Abcisic acid, Stress and Ripening*) e GFP (*Green Fluorescent Protein*) visando a determinação da localização subcelular das proteínas ASR de arroz (*Oryza sativa* L.)**

Marcelo Pedron

Porto Alegre, Novembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Produção de vetores de transformação de plantas  
contendo fusões das proteínas ASR (*Abcisic acid,  
Stress and Ripening*) e GFP (*Green Fluorescent  
Protein*) visando a determinação da localização  
subcelular das proteínas ASR de arroz (*Oryza sativa* L.)**

Marcelo Pedron

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como  
um dos requisitos a obtenção de grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Marcia Pinheiro Margis  
Co-orientador: Rafael Augusto Arenhart

Porto Alegre, Novembro de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Marcia Pinheiro Margis, pelos conselhos, orientação, paciência, dedicação e esforço para proporcionar as melhores condições de trabalho.

Aos demais integrantes do Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, em especial aos mestres e amigos Rafael Arenhart e Andréia Caverzan pelos ensinamentos.

Agradeço aos meus pais Otilio e Sueli e meu irmão Dirceu, pela oportunidade de estudo.

Aos membros da banca, Felipe dos Santos Maraschin e Luciane Maria Pereira Passaglia pela correção e pelas importantes sugestões.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação.

## RESUMO

**Palavras-chave:** ASR, localização subcelular, estresses abióticos, ABA, *Oryza sativa*

Os genes *ASR* (*ABA, Stress and Ripening*) foram descritos, inicialmente, em tomate (*Solanum lycopersicum*) e, em seguida, identificados em diversas espécies de plantas. A expressão dos genes *ASR* é induzida por ácido abscísico (ABA) e seus níveis de transcritos são rapidamente aumentados em resposta à salinidade e à seca. Estudos de localização subcelular mostraram que as proteínas *ASR* localizam-se no núcleo onde regulam promotores específicos, indicando que estas proteínas atuam como fatores de transcrição e que, provavelmente, ligam-se a promotores de genes de transportadores de hexoses e genes responsivos à ABA. Em tomate, foi demonstrado a localização citoplasmática de uma parcela das proteínas *ASR1* que desempenham um importante papel na proteção contra a desnaturação e agregação protéica causadas por estresses abióticos. Em arroz (*Oryza sativa*), análises *in silico* revelaram a presença de seis cópias de genes *ASR*, dispersas em diferentes cromossomos. Dados de localização subcelular demonstraram a localização nuclear e citoplasmática da proteína *ASR5* de arroz. No entanto, a localização subcelular das demais proteínas *ASR* de arroz ainda não foi determinada. O objetivo deste trabalho foi produzir vetores de transformação de plantas contendo fusões das proteínas *ASR* e GFP (*Green Fluorescent Protein*) visando a determinação da localização subcelular das proteínas *ASR* de arroz. Os genes *OsASR* foram amplificados por PCR utilizando-se como molde cDNA produzido a partir de RNA de folhas de arroz. Os produtos de PCR foram clonados no vetor de entrada pENTR. Os plasmídeos pENTR/*OsASR* foram utilizados para recombinação com o vetor de localização subcelular pH7FWG2/UBI; obtido neste trabalho pela substituição do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, pelo promotor da ubiquitina do milho no vetor pH7FWG2. As clonagens foram confirmadas por PCR utilizando *primers* específicos para cada gene *OsASR* e para o gene *Hpt* (gene que confere resistência à higromicina), presente no plasmídeo pH7FWG2/UBI. Foram obtidos plasmídeos binários contendo fusões com GFP que serão usados como vetores de transformação portando os genes *OsASR1*, *OsASR2*, *OsASR4* e *OsASR5*. Estes vetores de expressão foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens*, a qual está sendo utilizada para transformação genética de calos embriogênicos de arroz para estudo de localização subcelular. Os dados de localização subcelular das proteínas *ASR* poderão contribuir para inferir as possíveis funções que estas proteínas exercem na célula vegetal.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>05</b>
1.1. O arroz como planta modelo.....	<b>05</b>
1.2. Proteínas ASR ( <i>ABA, stress and ripening</i> ) e seu envolvimento em respostas fisiológicas.....	<b>06</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Análise da sequência de aminoácidos do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz.....	<b>13</b>
3.2. Amplificação dos membros da família ASR através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	<b>13</b>
3.3. Clonagem no vetor de entrada pENTR.....	<b>14</b>
3.4. Transformação de <i>Escherichia coli</i> por eletroporação.....	<b>15</b>
3.5. Substituição do promotor p35S do vírus do mosaico da couve-flor pelo promotor da ubiquitina (UBI) de milho no vetor de localização subcelular pH7FWG2.....	<b>15</b>
3.6. Clonagem no vetor binário para estudo de localização subcelular pH7FWG2/UBI.....	<b>17</b>
3.7. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	<b>18</b>
3.8. Transformação genética de calos embriogênicos de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. Subespécie <i>japonica</i> cultivar Nipponbare).....	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
4.1. Análise da sequência de aminoácidos do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz.....	<b>20</b>
4.2. Obtenção do vetor de localização subcelular pH7FWG2/UBI.....	<b>20</b>
4.3. Obtenção dos vetores binários contendo a fusão ASR/GFP.....	<b>22</b>
4.4. Transformação de calos embriogênicos de arroz.....	<b>27</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>
ANEXO 1: Sequências de cDNA dos genes <i>OsASR</i> .....	<b>37</b>
ANEXO 2: Meios de cultura utilizados na obtenção e transformação de calos embriogênicos de arroz.....	<b>39</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O arroz (*Oryza sativa* L.) como planta modelo

O arroz (*Oryza sativa* L., família Poaceae) é um dos mais importantes produtos agrícolas e é o mais importante alimento para a metade da população humana em todo o mundo (MATSUMOTO et al., 2007).

A sequência do genoma do arroz foi publicada pela primeira vez em 2002 (YU et al. 2002; GOFF et al., 2002). Em 2007, uma anotação acurada do genoma de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* foi publicada, sugerindo que seu genoma é composto por 390 Mb, o menor entre os cereais, e contém aproximadamente 32000 genes (THE RICE ANNOTATION PROJECT, 2007).

O arroz possui várias características que fazem dele um organismo modelo para estudos fisiológicos, genéticos e de evolução entre as plantas, em especial, as monocotiledôneas (GALE & DEVOS, 1998); tais como: a disponibilidade de etiquetas de genes expressos ou ESTs (do inglês, *Expressed Sequence Tags*), mapas moleculares saturados (INTERNACIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT, 2005; HARUSHIMA et al., 1998) e protocolos bem definidos para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (HIEI et al., 1994). Além disso, mapas genéticos comparativos dentro da família Poaceae revelaram regiões extensas de conteúdo gênico conservado e ordenado (sintenia) entre as espécies (MOORE et al., 1995). Em virtude da similaridade em sequência, estrutura, ordem e função dos genes entre as espécies da família Poaceae, a função dos genes de arroz, determinada por métodos de genômica funcional, pode ser aplicada para outros cereais (UPADHYAYA, 2007) e contribuir para o melhoramento agrônomico destas espécies (BENNETZEN, 2002).

Com o sequenciamento do genoma do arroz (ssp. *indica* e *japonica*), disponível para a comunidade científica internacional, a determinação da função específica de cada um dos genes preditos é, claramente, o próximo desafio; e poderá proporcionar um enorme impacto na agricultura.

## 1.2. Proteínas ASR (*ABA, Stress and Ripening*) e seu envolvimento em respostas fisiológicas

O Ácido abscísico (ABA) é um sesquiterpenóide (C<sub>15</sub>) sintetizado, em plantas, por uma rota indireta usando precursores de carotenóides (NORTH et al., 2007). O 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).

O fitormônio ABA possui papel crítico na resposta a vários sinais de estresse, e sua aplicação exógena em plantas mimetiza os efeitos de condições de estresse (MAHAJAN & TUTEJA, 2006). O ABA atua em sementes prevenindo a germinação precoce de embriões, e provoca fechamento estomático sob condições de seca, reduzindo a perda de água pela planta (MAHAJAN & TUTEJA, 2006; YANG et al., 2005).

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

Diversos genes que respondem à aplicação exógena de ABA já foram identificados (SKRIVER & MUNDY, 1990). Segundo Finkelstein et al. (2002), Abe et al. (2003) e González-García et al. (2003), componentes reguladores como quinases, 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 na percepção de ABA ainda não foram bem caracterizados.

Os genes *ASR* (do inglês, *ABA, Stress and Ripening*) foram descritos, inicialmente, em tomate (*Solanum lycopersicum*, IUSEN et al., 1993), através de *screening* de uma biblioteca genômica obtida a partir do fruto e, em seguida, identificados em diversas plantas como pinheiro (*Pinus taeda*, CHANG et al., 1996), milho (*Zea 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 et al., 2005) e *Gingko biloba* (SHEN et al., 2005), sendo amplamente distribuídos no reino vegetal, porém, ausentes na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (MASKIN et al., 2001). A expressão dos genes ASR é induzida, em plantas, por ABA e estresses, como a salinidade e a seca (SILHAVY et al., 1995; PADMANABHAN et al., 1997; RICCARDI et al., 1998; SUGIHARTO et al., 2002). Entretanto, os padrões de expressão variam em diferentes tecidos e em diferentes espécies e fases de desenvolvimento (PADMANABHAN et al., 1997).

A comparação das sequências de aminoácidos das proteínas ASR de diferentes espécies demonstrou certa homologia entre uva (*V. vinifera*), pomelo (*Citrus maxima*), damasco (*Prunus americana*), pêssigo (*Prunus persica*) e pêra (*Pyrus pyrifolia*). O próximo grupo que compartilha importante identidade é formado pelas proteínas ASR de tomate (*S. lycopersicum*) e batata (*Solanum tuberosum*); seguido por um terceiro grupo formado principalmente por monocotiledôneas. O quarto e último grupo é composto pelas proteínas ASR de *Pinus taeda* (Figura 1, CAKIR et al., 2003).

Todas as proteínas ASR conhecidas contêm duas regiões fortemente conservadas (YANG et al., 2008). A primeira região é um curto trecho na posição N-terminal contendo seis a sete resíduos de histidina que constitui um sítio de ligação a DNA dependente de zinco (KALIFA et al., 2004a; GOLDGUR et al. 2007). A segunda região é um segmento, localizado na posição C-terminal, correspondendo a aproximadamente 70 aminoácidos (Figura 1, CAKIR et al., 2003). Além disso, a maioria das proteínas ASR possui um sinal de localização nuclear na região C-terminal (PADMANABHAN et al., 1997; CAKIR et al., 2003; KALIFA et al., 2004a), composto por dois conjuntos de aminoácidos básicos, conservados entre diferentes membros de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Figura 2), separados por um segmento composto de aproximadamente 10 aminoácidos não conservados; ou um conjunto contínuo de aminoácidos básicos (WANG et al., 2005).



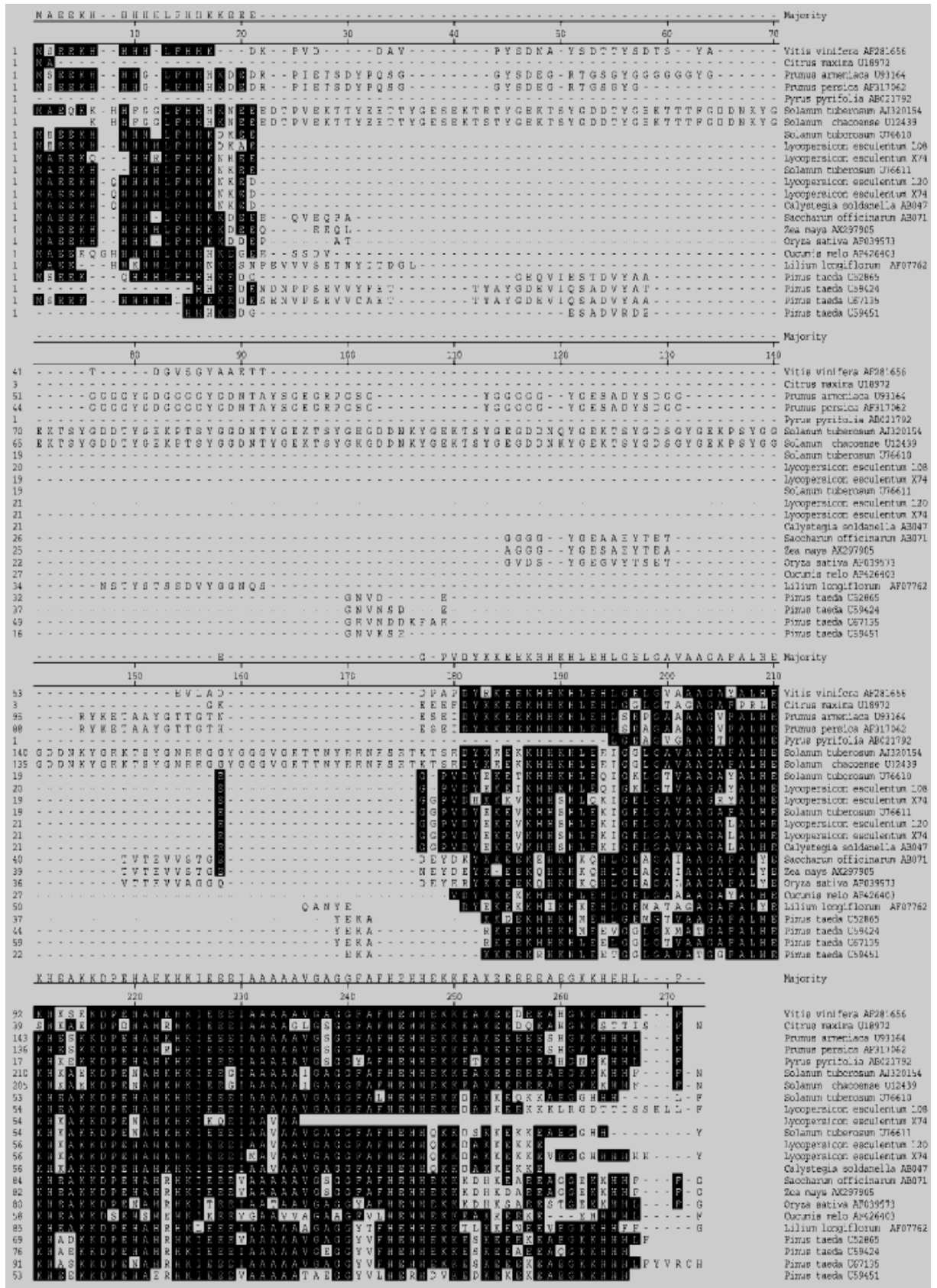


Figura 1. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas ASR de diferentes espécies. As seqüências conservadas estão sombreadas. Extraída de Cakir et al. (2003).

As proteínas ASR localizam-se, principalmente, no núcleo onde regulam promotores específicos (CAKIR et al., 2003; WANG et al., 2005; YANG et al., 2005). Experimentos publicados por Cakir et al. (2003) demonstraram a localização nuclear da proteína ASR de uva (*V. vinifera*– VvMSA) e a importância do sinal de localização nuclear na alocação da proteína ao núcleo, em protoplastos de tabaco, através do rastreamento da proteína de fusão VvMSA-GFP. Além disso, demonstraram, *in vitro*, sua ligação ao promotor do gene que codifica uma proteína transportadora de hexose - *VvHT1* - através de ensaios de *gel – shift*; e, *in vivo*, o aumento da expressão do gene *gus* em plantas de tabaco super-expressando VvMSA de uva, transformadas com uma construção na qual este gene está sob o controle do promotor do gene *VvHT1*.

	240	<u>A</u>	<u>B</u>	274
Lily LLA23		GGYTFHEHHEKKTLLKKEEEE	--VEG-KKHH--	FFG 142
Rice Asr1		GGYAFHEHHEKTKLHKSAEE	--STGKTKHH--	LFG 138
Maize Asr1		GGFAPHEHHEKTKDHDAAEE	--AGGKTKHH--	FFG 140
Grape VvMSA		GGFAPHEHHEKKEAKEDEEE	--AHG-KKHHH-LF	149
Apricot APRI41		GGFAPHEHHEKKEAKEDEEE	--SHG-KKHHH-LF	200
Muskmelon Asr1		AGFVLHEHHEKKEAKREEKE	---BH---HHH-LF	112
Pinus Lp3-1		GGYVFHEHHEKKEKKEEKE	--AEG-KKHHH-LFVVRCH	153
Pinus Lp3-2		GGYVLHEHHDVKEDKEKEKE	--AEG-KKHHH	108
Pinus Lp3-3		GGYVFHEHHEKKEKKEAEE	--AQG-KKHHH	131
Potato CI21A		GGFALHEHHEKDKAKKQKK	--AEGG--HHH-LF	109
Potato DS2		GGFAPHEHHEKKEAKEDEEE	--AEGKTKHH--	FFN 263
Citrus Asr1		GGFAPHEHHEKKEAKEDEQE	--AHG-KKSTTISFN	98
Tomato Asr1		GGFAPHEHHEKDKAKKKEKKLRGDTT	ISSKLLF	115
Tomato Asr2		GGFAPHEHHQKDKAKKKEKE	--VEG-GHHHH-HHY	115

**Figura 2.** Comparação das sequências sinalizadoras de localização nuclear das proteínas ASR de lírio e de outras espécies. As letras em negrito indicam os aminoácidos básicos do suposto sinal de localização nuclear com os dois conjuntos representados pelas regiões A e B sublinhadas. Os aminoácidos idênticos a ASR de lírio estão sombreados. O tamanho de cada proteína, em número de aminoácidos, está indicado à direita. Extraída de Wang et al. (2005).

Nota: A proteína de arroz referida na Figura 2 como Asr1 (WANG et al., 2005), cuja sequência de aminoácidos do suposto sinal de localização nuclear está representada, é tratada neste trabalho como ASR5 (FRANKEL, et al., 2006).

A localização nuclear e a capacidade de ligação a DNA indicam que estas proteínas atuam como fatores de transcrição (FRANKEL et al., 2007) e que ligam-se a genes que codificam proteínas transportadoras de hexoses e genes responsivos ao ABA (CAKIR et al., 2003; YANG et al., 2005 ).

Além disso, experimentos de super-expressão demonstraram o uso potencial de genes *ASR* para aumentar a tolerância de plantas em relação a estresses abióticos (KALIFA et al., 2004b; YANG et al., 2005).

Wang et al. (2005) demonstraram, através da técnica de imunolocalização, que as proteínas ASR de lírio (*L. longiflorum* - LLA23), expressas especificamente

nas células vegetativa e generativa do grão de pólen, localizam-se no citoplasma e no núcleo de ambas as células, tendo a sua localização subcelular preferencialmente no núcleo. Estes autores sugerem que as proteínas LLA23, devido à sua abundância e características hidrofílicas, podem desempenhar um papel semelhante às proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*), cuja função é proteger estruturas celulares do efeito da perda de água. Dessa maneira, LLA23 poderia proteger o DNA nuclear e a estrutura de proteínas da desidratação decorrente do processo de maturação dos grãos de pólen (YANG et al., 2008). LLA23, além disso, foi capaz de modular a expressão de diversos genes em plantas transgênicas de *A. thaliana* super-expressando esta proteína, indicando sua atuação como fator de transcrição (YANG et al., 2008).

Em tomate (*S. lycopersicum*), 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. (2004a), através da análise por *Western blotting* de amostras de proteínas obtidas por fracionamento celular de folhas de tomate e hibridizadas com anticorpo anti – ASR1 marcado com  $\alpha$  –  $^{32}\text{P}$ , demonstraram a localização citoplasmática e nuclear da proteína ASR1; e o aumento do nível da proteína em plantas submetidas ao tratamento com NaCl (150mM) durante 48 horas em ambos compartimentos, quando comparado a plantas não tratadas. Além disso, a proteína ASR1 de tomate é capaz de ligar-se a uma sequência consenso de DNA, fato que está de acordo com sua localização nuclear (KALIFA et al., 2004a).

Konrad & Bar-Zvi (2008) propõem que a forma citosólica da proteína ASR1 desempenha um importante papel na proteção contra a desnaturação e agregação protéica causadas por estresses abióticos, sugerindo uma função semelhante a chaperonas.

Todos os dados disponíveis sugerem que as proteínas ASR são codificadas por pequenas famílias multigênicas (CAKIR et al., 2003). Em arroz, análises *in silico* revelaram seis cópias de genes *ASR*, dispersas em diferentes cromossomos (FRANKEL et al., 2006).

Os genes *ASR* de arroz possuem a mesma estrutura gênica, contendo dois éxons e um íntron. O gene *OsASR1* de arroz está localizado no cromossomo 2, e seu mRNA primário possui quatro diferentes sítios de *splicing*, originando quatro

proteínas diferentes. Os genes *OsASR3* e *OsASR4* estão localizados no cromossomo 1, com arranjo 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*, no mesmo cromossomo. Enquanto *OsASR5* localiza-se no cromossomo 11, *OsASR6* localiza-se no cromossomo 4 e possui grande divergência de outros genes *ASR* de arroz, mas se assemelha a *ASR4* de tomate (FRANKEL et al., 2006).

Recentemente, Takasaki et al. (2008) identificaram, através da técnica de *western blotting* de amostras de proteínas obtidas por fracionamento celular, a proteína ASR5 em frações nucleares e citosólicas de folhas de arroz, sugerindo que essa proteína possa estar localizada nesses dois compartimentos subcelulares.

Apesar dos dados de localização da proteína ASR5, a localização subcelular das demais proteínas ASR de arroz ainda não foi determinada. Os dados de localização celular das proteínas ASR servirão de base para inferir as possíveis funções que elas exercem.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de vetores de transformação de plantas visando a determinação da localização subcelular das proteínas ASR de arroz, através do rastreamento da proteína de fusão ASR/GFP.

Objetivos específicos:

- 1) Analisar a sequência de aminoácidos do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz;
- 2) Amplificar os genes *OsASR* de arroz por PCR;
- 3) Obter um vetor binário de super-expressão de proteínas de fusão com GFP, específico para monocotiledôneas, pela clonagem do promotor de ubiquitina de milho no vetor pH7FWG2, em substituição ao promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), presente neste plasmídeo;
- 4) Clonar os fragmentos amplificados em plasmídeo pENTR e, em seguida, nos vetores binários de transformação de plantas;
- 5) Obter calos de arroz transformados com as construções obtidas no item 4.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Análise da sequência de aminoácidos do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz

A busca de sequências de aminoácidos que compõem o provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz foi executada o programa BLASTP do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando como “*query*” a sequência do sinal de localização nuclear da proteína ASR de lírio – LLA23 (WANG et al., 2005). As sequências foram alinhadas através do programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

#### 3.2. Amplificação dos membros da família ASR através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se como molde cDNA obtido a partir de RNA de folhas de arroz, para os genes *OsASR1*, *OsASR2*, *OsASR3*, *OsASR4*, *OsASR5* e *OsASR6*. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 1.

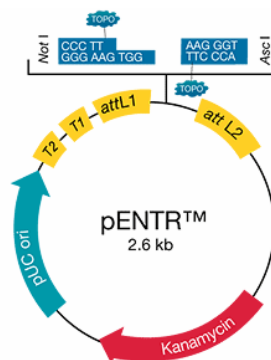
**Tabela 1.** *Primers* utilizados para a amplificação dos genes *OsASR* tendo como molde cDNA; e para a confirmação das clonagens dos genes *OsASR* nos vetores pENTR e pH7FWG2/UBI.

<i>Primers</i>	F/R	Sequência dos <i>primers</i>
<b><i>OsASR1</i></b>	F	5' CACCATGGCTGAGGAGAAGAAGCA
	R	5' CGAGTATTGGTCGGCGGCGT
<b><i>OsASR2</i></b>	F	5' CACCATGACGGAGTACTACTCCAG
	R	5' TGAGTTGCAGTAGTAGCCCT
<b><i>OsASR3</i></b>	F	5' CACCATGGGGCACCACCACAAGAA
	R	5' CGAATGGTGATGGCCATGCT
<b><i>OsASR4</i></b>	F	5' CACCATGTTTCGGCCACCACAAGAA
	R	5' TGAGTGGTGGTGGTGGGCAT
<b><i>OsASR5</i></b>	F	5' CACCATGGCGGAGGAGAAGCAC
	R	5' TGAGCGAAGAGGTGGTG
<b><i>OsASR6</i></b>	F	5' CACCATGGCTGAGGAGTAGGG
	R	5' TGAGCCGAAGAGGTGGTG

Para realização das reações de PCR, utilizou-se  $MgCl_2$  (2,5mM), tampão (1X), DNTP Mix (0,25 mM); Mix de *primer* “forward” e “reverse” (1 $\mu$ M), *Platinum*<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (1u) e cDNA (50ng). A mistura reacional foi submetida, durante 4 minutos, a temperatura de 94°C e a 30 ciclos de 30s a 94°C para desnaturação das fitas de DNA, 30 s a 58°C para anelamento dos *primers*, e 30 s a 72°C para a adição de nucleotídeos às fitas nascentes de DNA; seguido por um período de extensão final a 72°C durante 5 minutos. A amplificação e o tamanho dos produtos foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### 3.3. Clonagem no vetor de entrada pENTR

Os produtos de PCR amplificados a partir de cDNA de arroz foram clonados no vetor de entrada *Gateway* pENTR (Invitrogen, Figura 3) seguindo-se o protocolo do fabricante. Neste sistema, o produto de PCR é diretamente clonado, de maneira direcionada, 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. A clonagem foi realizada por ligação do produto de amplificação com o pENTR, numa reação catalizada pela T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto da clonagem foi inserido, por eletroporação, em *Escherichia coli*, linhagem Top 10, eletrocompetentes.



**Figura 3.** Vetor de entrada pENTR/D-TOPO. T1 e T2 – Sequências terminadoras de transcrição. attL1 e attL2 – Sítios de recombinação. Kanamicin – gene de resistência a canamicina. pUC ori – Origem de replicação.

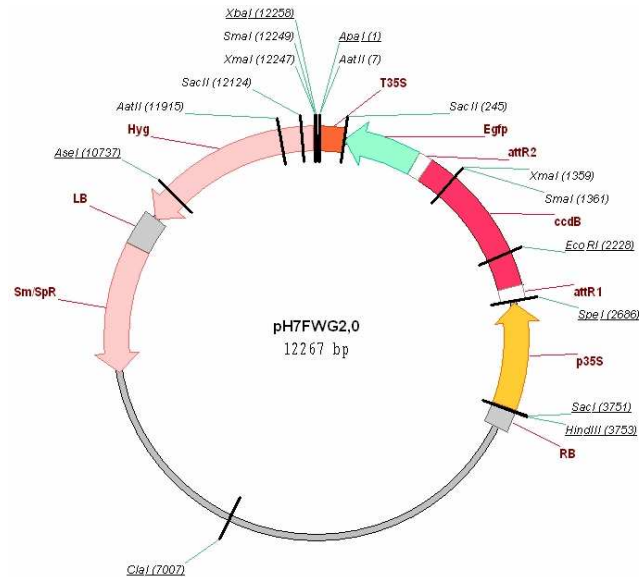
### 3.4. Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação

Para a transformação de *E. coli* por eletroporação, 2µl do produto da reação de ligação foi homogeneizado com 80µl de bactérias e eletroporado. Após a eletroporação, 400µl de meio de cultura LB (Luria-Broth) líquido foram acrescentados à cubeta de eletroporação. O material foi, então, transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e mantido a 37°C por 1 hora sob agitação, e, em seguida, a suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LB sólido contendo canamicina (50µg/ml) para seleção das bactérias transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 18 horas. As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio contendo o antibiótico de seleção foram incubadas, por 15 horas, em 5ml de meio LB líquido contendo canamicina (50µg/ml). Após este período de tempo, realizou-se a extração de plasmídeo utilizando o Kit *DNA Purification System SV Minipreps* (Promega). A transformação das colônias foi confirmada por PCR, com *primers* específicos para cada gene *OsASR* (Tabela 1), utilizando o mesmo procedimento descrito no item 3.2.

### 3.5. Substituição do promotor 35S do vírus do Mosaico da couve-flor pelo promotor da Ubiquitina (UBI) de milho no vetor de localização subcelular pH7FWG2

O vetor para estudo de localização subcelular pH7FWG2 (Figura 4) é um vetor binário e permite a fusão traducional da proteína de interesse na região N-terminal da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). A expressão da proteína de fusão é regulada pelo promotor 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.





**Figura 4.** Vetor pH7FWG2.0 (Karimi et al., 2002) para estudos de localização subcelular em tecidos vegetais. **RB** e **LB** – *Right Border* e *Left Border*, respectivamente, para transformação de plantas mediada por *A. tumefaciens*. **p35S** – promotor 35S. **attR1** e **attR2** – Sítios de recombinação. **ccdB** – gene que codifica uma proteína inibidora da proteína girase. **Egfp** – codifica uma proteína de fluorescência verde (GFP). **T35S** – Terminador 35S. **Hyg** – codifica a higromicina fosfotransferase (resistência à higromicina). **Sm/SpR** – Resistência a estreptomicina e espectinomicina.

Com o intuito de transformar arroz para estudo de localização subcelular, o promotor 35S foi substituído pelo promotor da ubiquitina de milho. Para realização deste experimento, a região do DNA correspondente ao promotor da ubiquitina foi amplificada utilizando como molde o vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004). Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 2. O fragmento obtido foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega), e utilizado para transformação de *E. coli*, linhagem Top 10, por eletroporação. Os transformantes foram selecionados em LB sólido contendo ampicilina (50µg/ml) e, posteriormente, multiplicados em LB líquido com o mesmo antibiótico. O vetor pGEM-T Easy portando o produto de PCR, assim como o vetor de localização subcelular pH7FWG2 foram clivados com as enzimas de restrição *SacI* (10u/µl) e *SpeI* (10u/µl). Para cada reação utilizou-se 2µl de tampão MULTI-CORE (10X), 0,2µl de BSA (10mg/ml), 1µl de *SpeI* (10u/µl), 1µl de *SacI* (10u/µl), 3µl de DNA e 12,8µl de água. As reações foram processadas por incubação a 37°C durante 4 horas. Os produtos das reações foram misturados, purificados com fenol-clorofórmio e ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega).

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para amplificação do promotor da ubiquitina de milho tendo como molde o vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004); e para a confirmação da ligação do promotor no vetor pH7FWG2 após a retirada do promotor 35S através da digestão com as enzimas de restrição SacI e SpeI. Os *primers Hpt* foram utilizados também, para confirmação da clonagem dos genes *OsASR* no vetor de localização pH7FWG2/UBI.

<b>Primers</b>	<b>F/R</b>	<b>Sequência dos primers</b>
<i>Ubi</i>	F	5' GGTACGAGCTCGTGCAGCGTGACC
	R	5' GGTACACTAGTTGCAGAAGTAACA
<i>Hpt</i>	F	5' GAGCCTGACCTATTGCATCTCC
	R	5' GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG

Para a ligação dos produtos digeridos, utilizou-se 5 µl de DNA, 1µl de tampão de ligase (10X), 1 µl de T4 DNA Ligase (3u/µl) e 3µl de água. A reação foi processada por incubação a 22°C durante 4 horas. A enzima foi inativada por incubação a 65°C durante 10 minutos.

Desta reação, foram utilizados 3µl para transformação de *E. coli* por eletroporação conforme descrito. Os transformantes foram selecionados em LB sólido contendo espectinomicina (75µg/ml). As colônias obtidas foram multiplicadas por 16 horas em LB líquido contendo este antibiótico, e submetidas à extração de plasmídeos utilizando o Kit *DNA Purification System SV Minipreps* (Promega). A transformação foi confirmada por PCR utilizando os *primers* específicos para o promotor da ubiquitina (*Ubi*) e para o gene *Hpt* (Tabela 2). O vetor de localização subcelular portando o promotor da ubiquitina de milho foi denominado pH7FWG2/UBI.

### **3.6. Clonagem no vetor binário para estudo de localização subcelular pH7FWG2/UBI**

Os plasmídeos pENTR portando o produto de PCR clonado foram utilizados para recombinação com o vetor de localização subcelular pH7FWG2/UBI .

Para a recombinação, 50ng de pENTR portando o produto de PCR clonado foram adicionadas a 100ng do vetor pH7FWG2/UBI, 1µl de tampão (*LR Reaction Buffer 5X*), 1µl de *Clonase Enzyme Mix* e água em quantidade final de 8µl. A reação foi incubada por 1h a 25°C. Em seguida, foram adicionados 2µl de proteinase K (2µg/µl) e a reação foi incubada a 37°C durante 10 min para finalização. Após a

recombinação, 2µl da reação foram utilizados na transformação de *E. coli* (Top 10), por eletroporação, conforme descrito no item 3.4. Os transformantes foram selecionados em placas contendo espectinomicina (75µg/ml) e, a seguir, incubados em LB líquido com este mesmo antibiótico. Os plasmídeos foram extraídos e as clonagens foram confirmadas por PCR com *primers* específicos para cada gene *OsASR* (Tabela 1) e para o gene *Hpt* (Tabela 2); e analisadas em eletroforese em gel de agarose 1%.

### **3.7. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens***

Os plasmídeos pH7FWG2/UBI portando o cDNA dos diferentes genes *OsASR* foram utilizados para transformação de *A. tumefaciens* através de eletroporação. Para realização deste procedimento, 2µl da reação foi homogeneizado com 80µl de bactérias e a suspensão foi submetida a eletroporação. Em seguida, 400µl de LB líquido foram acrescentados à cubeta de eletroporação. O material foi, então, transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e mantido a 28°C por 1 hora sob agitação e, após, plaqueado em meio LB sólido contendo espectinomicina (100µg/ml) e rifampicina (80µg/ml) para seleção das bactérias transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 2 dias. As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio de seleção foram incubadas por 2 dias em 5ml de meio LB líquido contendo espectinomicina (100µg/ml) e rifampicina (80µg/ml), e a transformação foi confirmada por PCR.

### **3.8. Transformação genética de calos embriogênicos de arroz (*Oryza sativa* L. Subespécie *japonica* cultivar Nipponbare)**

Sementes de arroz foram descascadas e, então, esterilizadas com etanol 70% por 1 minuto, seguido por lavagem com água esterilizada por 3 vezes, e incubação com hipoclorito de sódio 2,5% durante 30 minutos. Após este período, as sementes foram lavadas novamente com água estéril, plaqueadas em meio de cultura N<sub>6</sub>D (Anexo 2.1) e mantidas sob condição de luminosidade durante 6 a 7 semanas até a produção de calos. Os calos produzidos foram transferidos para

placas contendo meio NB (Anexo 2.2) e mantidos no escuro a 28°C, com repicagens a cada 4 semanas.

Para a transformação genética das plantas, foram plaqueados em meio NB, para cada construção, cerca de 60 calos divididos em duas placas, cinco dias antes da transformação. Além disso, foram incubadas, para cada construção, colônias de *A. tumefaciens* em 5ml de LB líquido contendo rifampicina (80µg/ml) e espectinomicina (100µg/ml), cultivadas por 2 dias a 28°C sob agitação constante. Após o crescimento, 1ml de suspensão de bactérias foi plaqueado em LB sólido (4 placas por construção) contendo rifampicina (80µg/ml) e espectinomicina (100µg/ml) e cultivadas em estufa a 28°C por 2 dias.

*A. tumefaciens* contendo o vetor de localização pH7FWG2/UBI portando o produto de PCR de interesse foi incubada com calos embriogênicos de arroz em 50ml de NB líquido contendo 100µM de acetoseringona durante 15 minutos. Os calos de arroz foram co-cultivados com *A. tumefaciens*, por 3 dias a 28°C, em meio NB contendo acetoseringona (100µM) – NBA (Anexo 2.3). Após este período, os calos de arroz foram lavados 4 vezes em água estéril contendo timentina (150µg/ml). Os calos foram plaqueados em meio HTC (Anexo 2.3) e incubados a 28°C durante 30 dias no escuro.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise da sequência de aminoácidos do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz

As proteínas ASR de arroz, com exceção de ASR2, possuem resíduos do aminoácido básico lisina (K), característico dos sinais de localização nuclear, relativamente conservados em relação a ASR de lírio – LLA23 (Figura 5). Estes resíduos estão separados em dois conjuntos representados pelas letras A e B, sendo este último encontrado somente na proteína ASR5 (Figura 5).

		<u>A</u>	<u>B</u>		
LLA-23	113	GGYTFHEHHEKKT	TLKKENEEVEG	-KKHHFFG	142 142
ASR1	84	AGFAPHEHHEK	DKK-----		99 105
ASR2	146	GGYAYHEHRE	QKQAS-----		160 182
ASR3	77	-GLAIHEHHK	KKKEAKK-----		91 96
ASR4	81	AGFALHEHHEK	KEAKK-----		96 105
ASR5	108	GGYAFHEHHEK	KKDKHSAEEST	GEKKHHLFG	138 138
ASR6	184	GGFAPHEHHD	KKKEAKQA	AKDAE-----	205 229

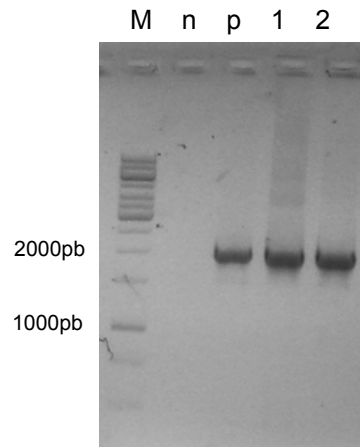
**Figura 5.** Comparação do provável sinal de localização nuclear das proteínas ASR de arroz com a proteína ASR de lírio – LLA23. As letras sublinhadas indicam os aminoácidos básicos do suposto sinal de localização nuclear, com os dois conjuntos representados pelas regiões A e B. Os aminoácidos idênticos a ASR de lírio estão sombreados. O tamanho de cada proteína, em número de aminoácidos, está indicado à direita.

### 4.2. Obtenção do vetor de localização subcelular pH7FWG2/UBI

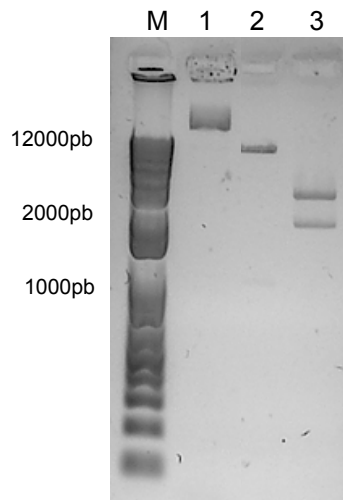
Embora o sucesso na obtenção de plantas transgênicas dependa de vários fatores, tais como a otimização da cultura e escolha de um método adequado de transformação, o uso de um promotor adequado é crucial para assegurar a produção de plantas transgênicas que expressem a proteína de interesse. O promotor 35S é largamente empregado na transformação de monocotiledôneas e dicotiledôneas, porém, sua atividade é relativamente baixa em monocotiledôneas (WANG & OARD, 2003).

Assim, para a transformação de calos embriogênicos de arroz foi utilizado o vetor pH7FWG2/UBI. Para a obtenção desse vetor, a região do DNA correspondente ao promotor da ubiquitina foi amplificada por PCR utilizando como molde o vetor

pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004). O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). A clonagem do fragmento foi confirmada por PCR (Figura 6). Em seguida, o promotor UBI foi retirado desse vetor pela digestão com as enzimas de restrição *SacI* e *SpeI*. O plasmídeo binário para estudo de localização subcelular, pH7FWG2, foi igualmente digerido com as mesmas enzimas de restrição (Figura 7).

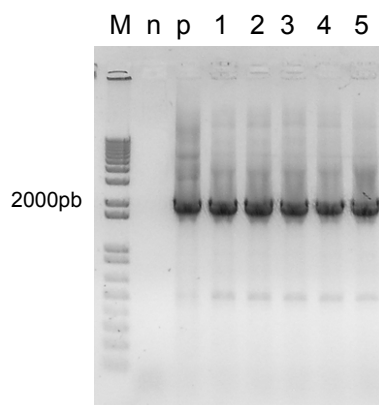


**Figura 6.** Confirmação da clonagem do promotor da ubiquitina de milho no vetor pGEM-T Easy. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones pGEM-T Easy contendo o DNA de promotor da ubiquitina de milho. Os *primers Ubi* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 1900pb. **M** = marcador 1Kb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **p** = controle positivo (vetor pANDA); **1, 2** = plasmídeos portando o promotor da ubiquitina clonado em pGEM-T Easy.



**Figura 7.** Digestão do vetor de localização subcelular pH7FWG2 e do vetor pGEM-T Easy portando o promotor da ubiquitina. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *SacI* e *SpeI*. **M** = marcador 1Kb *Plus ladder* (Invitrogen); **1** = plasmídeo pH7FWG2 não digerido (controle); **2** = plasmídeo pH7FWG2 foi digerido produzindo um fragmento de 1027pb correspondente ao promotor 35S, e um fragmento de 11240pb correspondente ao restante do vetor. **3** = plasmídeo pGEM-T Easy portando o promotor da ubiquitina foi digerido produzindo um fragmento de 3016pb correspondente ao vetor, e um fragmento de 1900pb correspondente ao promotor da ubiquitina de milho.

Os produtos digeridos foram misturados e ligados. O produto da ligação foi utilizado para transformação de *E. coli* e as colônias transformadas foram selecionadas em LB sólido contendo espectinomicina (75µg/ml). A transformação das colônias e a clonagem foram confirmadas por PCR com *primers Ubi* (Tabela 2) produzindo um fragmento de 1900pb (Figura 8) e *primers Hpt* (Tabela 2) produzindo um fragmento de 500pb (dados não mostrados), respectivamente.



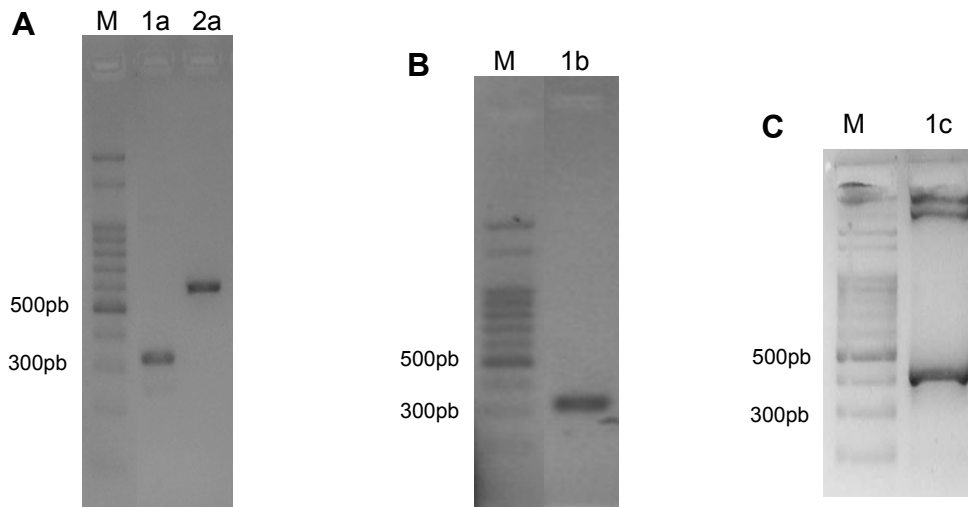
**Figura 8.** Confirmação da ligação do promotor da ubiquitina de milho no vetor de localização subcelular pH7FWG2. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o promotor da ubiquitina de milho extraídos de *E. coli*. Os *primers Ubi* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 1900pb. **M** = marcador 1Kb *Plus ladder* (Invitrogen); **n** = controle negativo (amostra sem DNA); **p** = controle positivo (plasmídeo pANDA); **1, 2, 3, 4, 5** = plasmídeos pH7FWG2 portando o promotor de ubiquitina de milho.

#### 4.3. Obtenção dos vetores binários contendo a fusão ASR-GFP

Tendo por objetivo a localização subcelular das diferentes proteínas ASR de arroz, os cDNAs dos genes *OsASR* foram clonados 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 dos cDNAs foi modificado de modo a substituir o códon UGA por UCA (serina), permitindo que a proteína de interesse seja expressa na extremidade N-terminal da proteína GFP.

A primeira etapa para a obtenção do vetor portando o cDNA dos genes *OsASR* foi a amplificação, através da técnica de PCR, da região codificante de cada gene *OsASR*, tendo como molde cDNA obtido através de RNA extraído de folhas (Figura 9). Através desta reação, foi possível amplificar somente os genes *OsASR1*,

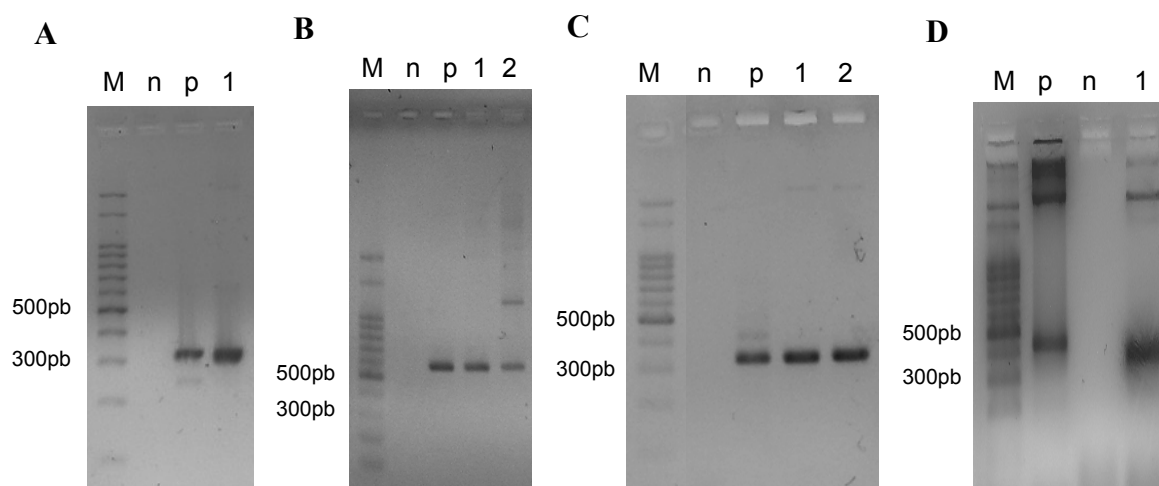
*OsASR2*, *OsASR4* e *OsASR5*. Portanto, a clonagem dos genes *OsASR3* e *OsASR6* não teve continuidade neste trabalho.



**Figura 9.** Obtenção dos produtos de PCR para clonagem no vetor de entrada pENTR. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, utilizando como molde cDNA de folhas de arroz. **A.** M = Marcador 100pb *ladder* (Promega); 1a = *OsASR1* amplificado com *primers OsASR1* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 318pb; 2a = *OsASR2* amplificado com *primers OsASR2* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 549 pb. **B.** M = Marcador 100pb *ladder* (Promega); 1b = *OsASR4* amplificado com *primers OsASR4* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 318pb; **C.** M = Marcador 100pb *ladder* (Promega); 1c = *OsASR5* amplificado com *primers OsASR5* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 417pb.

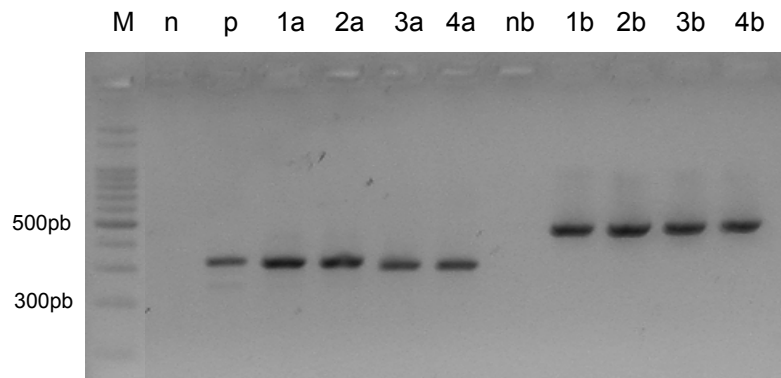
Os produtos de PCR assim obtidos foram clonados, de maneira orientada, no vetor de entrada pENTR (Invitrogen). A clonagem do fragmento correspondente aos genes *OsASR1* (Figura 10A), *OsASR2* (Figura 10B), *OsASR4* (Figura 10C) e *OsASR5* (Figura 10D) foi confirmada por PCR utilizando *primers* específicos para cada gene *OsASR* (Tabela 1) e análise em eletroforese em gel de agarose a 1%.



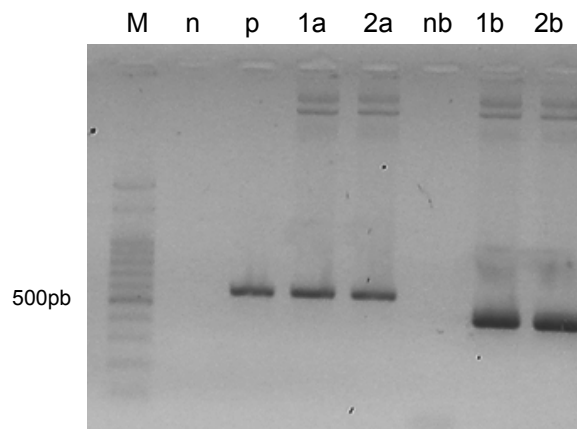


**Figura 10.** Confirmação da clonagem do cDNA de *OsASR1*, *OsASR2*, *OsASR4* e *OsASR5* no vetor de entrada pENTR. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones pENTR contendo o cDNA de *OsASR1*, *OsASR2*, *OsASR4* e *OsASR5* extraídos de *E. coli*. **A.** Os *primers OsASR1* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 318 pb. M = marcador 100pb *ladder* (Promega); n = controle negativo (sem DNA); p = controle positivo (cDNA produzido a partir de RNA de folhas de arroz); 1 = plasmídeos portando o cDNA de *OsASR1*. **B.** Os *primers OsASR2* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 549 pb. M = marcador 100pb *ladder* (Promega); n = controle negativo (sem DNA); p = controle positivo (cDNA produzido a partir de RNA de folhas de arroz); 1, 2 = plasmídeos portando o cDNA de *OsASR2*. **C.** Os *primers OsASR4* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 318pb. M = marcador 100pb *ladder* (Promega); n = controle negativo (sem DNA); p = controle positivo (cDNA produzido a partir de RNA de folhas de arroz); 1, 2 = plasmídeos portando o cDNA de *OsASR4*. **D.** Os *primers OsASR5* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 417pb. M = marcador 100pb *ladder* (Promega); p = controle positivo (cDNA produzido a partir de RNA de folhas de arroz); n = controle negativo (sem DNA); 1 = plasmídeos portando o cDNA de *OsASR5*.

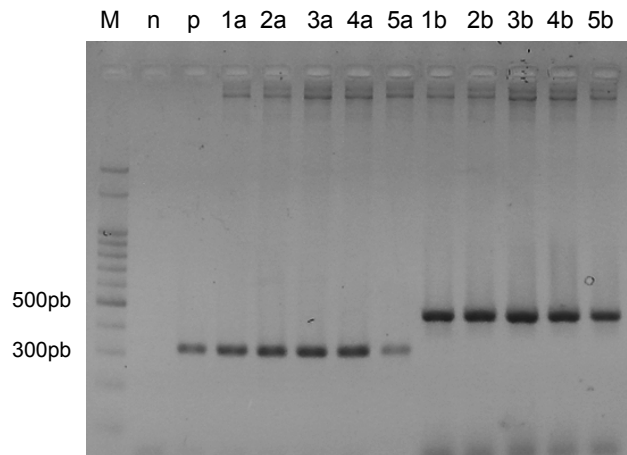
Na segunda etapa, o inserto foi transferido para o vetor binário de localização subcelular pH7FWG2/UBI que permite a fusão traducional da proteína de interesse na região N-terminal da proteína GFP. Para o processo de recombinação, foi utilizado o clone número 1 da clonagem em pENTR para cada gene *OsASR*. As clonagens foram confirmadas através de PCR e análise em eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando *primers OsASR1* e *Hpt*, para o gene *OsASR1* produzindo um fragmento de 318pb e 500pb, respectivamente (Figura 11); *OsASR2* e *Hpt*, para o gene *OsASR2* produzindo um fragmento de 549pb e 500pb, respectivamente (Figura 12); *OsASR4* e *Hpt*, para o gene *OsASR4* produzindo um fragmento de 318pb e 500pb, respectivamente (Figura 13); e *OsASR5* e *Hpt*, para o gene *OsASR5* produzindo um fragmento de 417pb e 500pb, respectivamente (Figura 14).



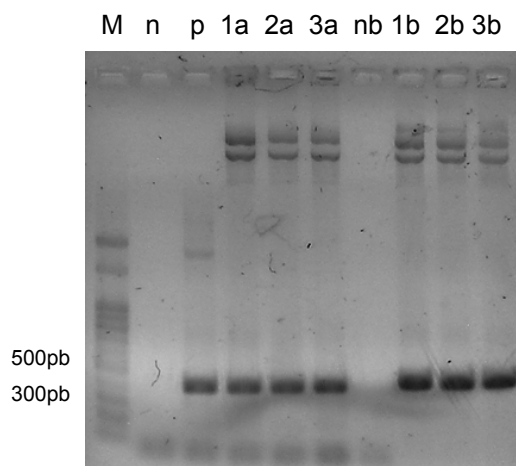
**Figura 11.** Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da clonagem de *OsASR1* no plasmídeo pH7FWG2/UBI para o estudo de localização subcelular do produto gênico, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR1* extraídos de *E. coli*. Os *primers OsASR1* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 318pb; e os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 500pb. **M** = marcador 100pb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **p** = controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **1a, 2a, 3a, 4a** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR1* (*primers OsASR1*); **nb** = controle negativo (*primers Hpt*); **1b, 2b, 3b, 4b** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR1* (*primers Hpt*).



**Figura 12.** Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da clonagem de *OsASR2* no plasmídeo pH7FWG2/UBI para o estudo de localização subcelular do produto gênico, utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones contendo o cDNA de *OsASR2* extraídos de *E. coli*. Os *primers OsASR2* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 549pb; e os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 500pb. **M** = marcador 100pb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **p** = controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **1a, 2a** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR2* (*primers OsASR2*); **nb** = controle negativo (*primers Hpt*); **1b, 2b** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR2* (*primers Hpt*);



**Figura 13.** Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da clonagem de *OsASR4* no plasmídeo pH7FWG2/UBI para o estudo de localização subcelular do produto gênico. Os *primers OsASR4* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 318pb; e os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 500pb. **M** = marcador 100pb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **p** = controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **1a, 2a, 3a, 4a, 5a** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR4* (*primers OsASR4*); **1b, 2b, 3b, 4b, 5b** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR4* (*primers Hpt*);



**Figura 14.** Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da clonagem de *OsASR5* no plasmídeo pH7FWG2/UBI. Os *primers OsASR5* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 417pb; e os *primers Hpt* (*forward* e *reverse*) produzindo um fragmento de 500pb. **M** = marcador 100pb *ladder* (Promega); **n** = controle negativo (plasmídeo vazio); **p** = controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **1a, 2a, 3a** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR5* (*primers OsASR5*); **nb** = controle negativo (*primers Hpt*); **1b, 2b, 3b** = plasmídeos portando o cDNA do gene *OsASR5* (*primers Hpt*).

#### 4.4. Transformação de calos embriogênicos de arroz

Após a clonagem dos genes *OsASR* no vetor de localização subcelular pH7FWG2/UBI e transformação de *E. coli*, os plasmídeos foram utilizados para transformação de *A. tumefaciens*. Para isso, foram utilizados os clones derivados da colônia 1 de *E.coli*, para cada gene *OsASR*. A transformação de *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR (dados não mostrados).

Os calos de arroz obtidos foram co-cultivados com *A. tumefaciens* portando os plasmídeos pH7FWG2/UBI contendo os cDNAs dos genes *OsASR*, conforme descrito na seção 3.8 (Material e métodos).

Os calos estão sendo selecionados em meio HTC (Anexo 2.3), uma vez que o vetor pH7FWG2/UBI contém o gene *Hpt* que confere resistência a higromicina.

## 5. DISCUSSÃO

Devido à sua natureza sésil, as plantas freqüentemente enfrentam condições adversas ou estresses bióticos e abióticos (MAHAJAN & TUTEJA, 2006). Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos que permitem perceber essas condições adversas, ativando cascatas de tradução de sinais que, por conseqüência, ativam genes de resposta ao estresse e levam a mudanças fisiológicas e bioquímicas (GAO et al., 2007). 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 reguladoras como o hormônio ácido abscísico (ABA; GRENNAN, 2006).

A necessidade de plantas resistentes a diversos estresses torna as proteínas ASR alvos interessantes para estudo, uma vez que exercem um importante papel no aumento da tolerância de plantas contra estresses abióticos (KALIFA et al., 2004b; YANG et al., 2005).

Dados de localização subcelular demonstraram a localização nuclear da proteína ASR de uva – VvMSA (CAKIR et al., 2003); e nuclear e citoplasmática das proteínas ASR de lírio - LLA23 (WANG et al., 2004), ASR5 de arroz (TAKASAKI et al., 2008) e ASR 1 de tomate (KALIFA et al., 2004a). Konrad & Bar-Zvi (2008) sugerem que a forma citosólica de ASR1 de tomate tem papel semelhante a chaperonas. Além disso, foi demonstrado que diferentes proteínas ASR são capazes de se ligar a sequências específicas de DNA e modular a expressão de diversos genes; sugerindo que possam atuar como fatores de transcrição (CAKIR et al., 2003; YANG et al., 2008).

As proteínas ASR de lírio – LLA23, apesar de possuírem um sinal de localização nuclear, apresentam distribuição nuclear e citoplasmática podendo exercer diferentes funções em ambos os compartimentos celulares (WANG et al., 2004).

Dentre as proteínas ASR de arroz, o suposto sinal de localização nuclear da proteína ASR5 é o único que contém os dois resíduos de lisina que compõe o conjunto B (Figura 5), e é o que apresenta maior semelhança à ASR de lírio. Da

mesma maneira que LLA-23, a proteína ASR5 foi detectada na porção nuclear e citoplasmática em folhas de arroz (TAKASAKI et al., 2008).

Com exceção de ASR2, todas as demais proteínas ASR de arroz possuem os dois primeiros resíduos de lisina do conjunto A conservados (Figura 5). Wang et al. (2005) demonstraram que o conjunto A é mais importante na determinação da localização nuclear da proteína ASR de lírio em relação ao conjunto B; e que a substituição dos dois primeiros resíduos de lisina por alanina, representa a mutação que mais severamente afeta a translocação para o núcleo.

O quarto resíduo de lisina do conjunto A da proteína ASR de lírio é substituído por um resíduo de glutamina na proteína ASR6 de arroz. Apesar disso, ASR6 possui um resíduo de lisina na posição 202 que pode exercer algum papel na localização subcelular e eleva a possibilidade de localização nuclear dessa proteína.

ASR1, ASR3 e ASR4 possuem todos os resíduos de lisina, representantes do conjunto A, idênticos a ASR de lírio. Em decorrência da grande importância desse conjunto para a localização nuclear da proteína ASR de lírio (WANG et al., 2005), é provável que estas proteínas apresentem comportamento semelhante.

A proteína ASR2 possui somente o segundo resíduo de lisina do conjunto A conservado, faltando três dos resíduos de lisina pertencentes a esse agrupamento, assim como, os dois resíduos do conjunto B. Em vista da importância desses resíduos para a localização nuclear (WANG et al., 2005), estes dados elevam a possibilidade de localização de ASR2 em outros compartimentos celulares, que não o núcleo

Dong et al. (2005) demonstraram o comportamento diferencial dos membros da família NAP1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*) de arroz e tabaco. Enquanto NAP1-1 de ambas as espécies são capazes de translocar-se entre o citoplasma e o núcleo e tem como função ligarem-se as histonas H2A e H2B e transportá-las para o núcleo para a formação do nucleossomo; as proteínas NAP1 – 2, NAP1 – 3, NAP1 – 4 de tabaco e NAP1 – 2 de arroz, apesar de possuírem sinal de localização nuclear, são encontradas exclusivamente no citoplasma, desempenhando um papel na dinâmica dos microtúbulos durante a divisão celular. Isto demonstra que diferentes membros de uma mesma família gênica podem ter papéis diferentes em compartimentos celulares distintos; e que a presença do sinal de localização nuclear não é o único fator determinante para a localização das proteínas, embora tenha um importante papel.

Chehab et al. (2004) observaram que a proteína McCPK1 de *Mesembryanthemum crystallinum*, uma proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e induzida por estresses abióticos, sofre uma mudança reversível na localização subcelular da membrana plasmática em direção ao núcleo, retículo endoplasmático rugoso e microfilamentos de actina do citoesqueleto em resposta a redução de umidade de 80% (controle) para 40%. Previamente, Patharkar & Cushman (2000) demonstraram que McCPK1-sGFP sofre uma mudança na localização subcelular da membrana plasmática para o núcleo e outras estruturas não identificadas, seguindo 4 horas de tratamento com NaCl 0.5M. A localização de McCPK1 na membrana plasmática sob condições controle e realocação para o núcleo, microfilamentos de actina e retículo endoplasmático sob condições de estresse sugerem que McCPK1 regula uma via de resposta a estresse. Da mesma forma que McCPK1, é possível que as proteínas ASR sofram realocação para diferentes compartimentos celulares sobre condições de estresse.

Nesse trabalho, o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor foi substituído pelo promotor da ubiquitina de milho. Vários genes de ubiquitina foram isolados e seus promotores testados em transformação de plantas que inclui milho (CHRISTENSEN et al., 1992), *Arabidopsis* (NORRIS et al., 1993) e arroz (WANG & OARD, 2003). Todos os promotores de ubiquitina avaliados, exceto de *Arabidopsis* (NORRIS et al., 1993), exibiram maior atividade que o promotor 35S. Chen et al. (1998) relataram que a maioria da progênie R1 de trigo transgênico mostraram pouca ou nenhuma expressão do gene da quitinase sob o controle do promotor 35S, enquanto o gene PAT sob o controle do gene da ubiquitina do milho foi expresso. Tem sido proposto que o processo de vigilância genômica pode reconhecer o promotor 35S como uma sequência viral intrusiva, iniciando um mecanismo de inativação (KUMPATLA & HALL, 1999).

Em vista da importância do promotor na expressão gênica, a utilização do vetor pH7FWG2/UBI poderá ser decisivo para a localização subcelular das proteínas ASR em arroz. Obter plantas transgênicas de arroz expressando as proteínas de fusão ASR/GFP e determinar a localização subcelular dessas proteínas em condições controle de crescimento e em resposta a estresses ambientais será o propósito de futuros trabalhos de nosso grupo de pesquisa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BENNETZEN, J. Opening the door to comparative plant biology. *Science*, 296: 60 – 63, 2002.

CAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DEIROT, S.; ATANASSOVA, R. A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 15: 2165 - 2180, 2003.

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.

CHEHAB, E.W.; PATHARKAR, O.R.; HEGEMAN, A.D.; TAYBI, T.; CUSHMAN, J.C. Autophosphorylation and Subcellular Localization Dynamics of a Salt- and Water Deficit-Induced Calcium-Dependent Protein Kinase from Ice Plant. *Plant Physiology*, 135: 1430 – 1446, 2004.

CHEN, W.P.; GU, X.; LIANG, G.H.; MUTHUKRISHNAN, S.; CHEN, P.D.; LIU, D.J.; GILL, B.S. Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1296 – 1396, 1998.

CHRISTENSEN, A.H.; SHARROK, R.A.; QUAIL, P.H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675 – 689, 1992.

DONG, A.; LIU, Z.; ZHU, Y.; YU, F.; LI, Z.; CAO, K.; SHEN, W-H. Interacting Proteins and Differences in Nuclear Transport Reveal Specific Functions for the NAP1 Family Proteins in Plants. *Plant Physiology*, 138: 1446 – 1456, 2005.

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



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

FRANKEL, N.; NUNES-NESE, A.; BALBO, I.; MAZUCH, J.; CENTENO, D.; IUSEM, N. D.; FERNIE, A. R.; CARRARI, F. *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Molecular Biology*, 63: 719 – 730, 2007.

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.

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.

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.

GOOF, S. A.; RICKE, D. & LAN, T. H. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science*, 296: 92 – 100, 2002.

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.

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: 271 – 282, 1994.

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.

International Rice Genome Sequencing Project. The map – based sequence o the rice genome. *Nature*, 436: 793 – 800, 2005.

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.

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

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.

KARIMI, M.; INZE, D.; DEPCKER, A. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Science*, 7: 193 – 195, 2002.

KONRAD, Z.; BAR-ZVI, D. Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated *ASR1* protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta*, 227: 1213 - 1219, 2008.

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.

KUMPATLA, S.P.; HALL, T.C. Organizational complexity of a rice transgene locus susceptible to methylation-based silencing. *IUBMB Life*, 48: 459 – 467, 1999.

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

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

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, T.; WING, R. A.; HAN, B.; SASAKI, T. Rice Genome Sequence: The Foundation for Understanding the Genetic System. In: UPADHYAYA, N. M. *Rice Functional Genomics: Challenges, Progress and Prospects*. Austrália, p. 5 - 20, 2007.

MIKI, D.; SHIMAMOTO, K. Simple RNAi Vectors for Stable and Transient Suppression of Gene Function in Rice. *Plant & Cell Physiology*, 45: 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.

NORRIS, S.R.; MEYER, S.E.; CALLIS, J. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*, 895 – 906, 1993.

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.

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.

PATHARKAR, O.R.; CUSHMAN, J.C. A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant Journal*, 24: 679 – 692, 2000.

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.

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.

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.

TAKASAKI, H.; MAHMOOD, T.; MATSUOKA, M.; MATSUMOTO, H.; KOMATSU, S. Identification and characterization of a gibberellin-regulated protein, which is ASR5, in the basal region of rice leaf sheaths. *Molecular Genetics Genomics*, 279: 359 - 370, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596 – 1599, 2007.

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.

UPADHYAYA, N. M. *Rice Functional Genomics: Challenges, Progress and Prospects*. Austrália, p. 1 – 4, 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.

WANG, J.; OARD, J. H. Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Report*, 22: 129 - 134, 2003.

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.

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, C. Y.; WU, C. H.; JAUH, G. Y.; HUANG, J. C.; LIN, C. C.; WANG, C. S. The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in *Arabidopsis*. *Protoplasma*, 233: 241 – 254, 2008.

YU, J.; HU, S.; WANG, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science*, 296: 79 – 92, 2002.

## ANEXO 1 - Sequencias de cDNA dos genes OsASR

### **OsASR 1**

Sequência do cDNA completa TIGR: LOC\_Os02g33820.1

ATGGCTGAGGAGAAGAAGCACCACCACCTGTTCCACCACAAGAAGGACGGGGAGGAGGAGAGC  
TCCGGCGTGGTGGACTACGACAAGGAGAAGAAGCACCACAAGCACCTCGAGCAGCTCGGCGGC  
CTCGGCGCCATCGCCGCCGGCGCCTACGCTCTCCACGAGAAGCACCAGGCGAAGAAGGACACG  
GAGAACGCGCACGGGCACAAGGTGAAGGAGGAGGTGGCGGCGGTGGCCGCGCTGGGCGCCG  
CGGGTTTCGCTTCCACGAGCACCACGAGAAGAAGGACGCCAAGAAGCACGCCGCCGACCAAT  
ACTAG

### **OsASR 2**

Sequência do cDNA completa TIGR: LOC\_Os01g73250.1

ATGACGGAGTACTACTCCAGCACCGTGGACGAGTGCTACGAGACCACCGGCAGGCAGCACGGC  
CACGGGCACGGCCACGGTCACGGGCACGGGCACGGGCATGGTGGCATGAGGGTGGAGTCCCA  
CACCGACGACTACTACAGCGAGGGCGGCGAGATCGACCGTGGGAGGAGGAACAACCTCCATGCA  
CTCGCAGGAGTACCTGATGAGGCAGCAGAGCGGCCATGGCGGCTACGGCTACGGCGGCGGCC  
AGCAGCAGGAGTACTACAAGCGGGAGGAGCGCGAGCACAAGCAGCGCGAGCGCGTTCGGCGAG  
ATCGGCGCCCTCGCCAGCGGCGCCTTCGCTCTCTATGAGGGGCACCAGGCGAAGAAGGACCCG  
GCGAACGCGCAGAGGCACAGGATCGAGCAGGGCGTGGCGGCGGTGGCGGCGGTGGGCGCCG  
GCGGCTACGCCTACCACGAGCACCAGCGAGCAGAAGCAGGCCAGCTACGGCGCCAAGGAGCAG  
CAGTACGGCTACGCCAGGATGCCGCGAGCAGGCGTACTACTGCAACTGA

### **OsASR 3**

Sequência do cDNA completa TIGR: LOC\_Os01g72900.1

ATGGGGCACCACCACAAGAACGACGACAAGGCCGCGGCGGCGGCCGGCGGCGACCACCGCAA  
GGAGGAGAAGCACCACAAGCACATGGAGCAGCTTGCCAAGCTCGGCGCCGTCGCCGCCGGAGC  
ATACGCCATGCACGAGAAGCACAAGGCGAAGAAGGAACCGGAGAATGCGCGGTTCGCACAGGGT  
GAAGGAGGAGATCGCCGCCACCATCGCCGCCGGCAGCGTCCGGCCTCGCCATCCACGAGCATCA  
CAAGAAGAAGGAAGCTAAGAAGCATGGCCATCACCATTAG

### **OsASR 4**

Sequência do cDNA completa TIGR: LOC\_Os01g72910.1

ATGTTTCGGCCACCACAAGAACGAGGAGAAGATGGCAGCAGCCGGGGCGGCGCCCAAGGACGC  
CGGCGACTATCGCAAGGAGGAGAAGCACCACAAGCACATGGAGCAGATCGCCAAGCTCGGCGC  
CGCCGCCCGCGGAGCATACGCCATGCATGAGAAGAAGCAGGCGAAGAAGGACCCGGAGCACG  
CGCGGTTCGCACAAGATGAAGGAAGGATCGCCGCCGCGTTCGCGTTCGGCAGCGCCGATTTC  
GCCCTCCACGAGCACCACGAGAAGAAGGAAGCCAAGAAGCACCGCGGCCATGCCACCACCAC  
CACTAA

**OsASR 5**

Sequência do cDNA completa TIGR: LOC\_Os11g06720.1

```
ATGGCGGAGGAGAAGCACCACCACCACCTGTTCCACCACAAGAAGGACGACGAGCCGGCCACC
GGAGTAGACTCCTACGGCGAGGGCGTCTACACGTCGGAGACGGTGACCACCGAGGTGGTCGCC
GGCGGCCAGGACGAGTACGAGAGGTACAAGAAGGAGGAGAAGCAGCACAAGCACAAGCAGCAC
CTCGGCGAGGCCGGCGCCCTCGCCGCCGGCGCCTTCGCCCTGTATGAGAAGCACGAGGCGAA
GAAGGACCCGGAGAACGCGCACAGGCACAAGATCACGGAGGAGATCGCGGCCACGGCGGGCGG
TCGGCGCCGGCGGCTACGCCTTCACGAGCACCACGAGAAGAAGAAGGACCACAAGAGCGCCG
AGGAGTCCACCGGCGAGAAGAAGCACCACCTCTTCGGCTGA
```

**OsASR 6**

Sequência do cDNA completa TIGR: LOC\_Os04g34600.1

```
ATGGCTGACGAGTACGGCCGCGGGCGGCTACGGCAGGTCCGGCGCCGGCGCCGGCGACGACTA
CGAGAGCGGCGGCTACAACAGGTCCAGCTCCGGCGGCGCCGACGAGTACGCCGCCGGCCGGA
GCGGTCGTGCTCAAAGCCGGTGNACGACGCTTCGAAACGCTTCACAAAGTCNCGCGGCGCG
CGACGACTTACGGCGNACGGCGGCGGGTCAACAAGTCCGGACCGCGCGCTTCCGACAGC
GGCTNCAACAACAGGTCAGGGGCTAACAGAAGTACGGCCGCAACAAGTCCGGCGCGACGAGTA
CAGCGGCGGNGCGGCGCCGAAGCCGACGAGGAGTACGTGACGGGTTGTCGTCCCGGGCGCC
CGGAGAAGTACAGGAAGGAGGAGAAGGAGCACAAGAACAAGGAGCGCCTCGCGAGGTGGGGC
CCNTCCGCCGNCNCTTCGCCATGTACGAGAGGCACCAGGCGAAGAAGGACCCGGAGAACGCGC
AGCGGCACAGGATCGAGGAGGGCGTGGCGGCGGCGGCGGCGCTGGGGAGCGGCGGGTTCGC
GTTCCACGAGCACCACGACAAGAAGGAGGCCAAGCAGGCGGCGAAGGACGCCGAGGAGGAGG
CGGAGGAGGAGTCCGGCTCCGGCGCCCGCGGCGGCGGAGGGGAAGAAGAAGCACCACCTTTC
GGCTGA
```

**ANEXO 2** - Meios de cultura utilizados na obtenção e transformação de calos embriogênicos de arroz

	<b>Componentes</b>	<b>Concentração mg/L</b>
<b>Macroelementos N<sub>6</sub></b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463
	KNO <sub>3</sub>	2830
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	165
<b>FeEDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
<b>Microelementos N<sub>6</sub></b>	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3,3
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6
	KI	0,8
<b>Vitaminas N6</b>	Glicina	0,2
	Tiamina-HCl	0,1
	Piridoxina-HCl	0,05
	Ácido Nicotínico	0,05
	Mio Inositol	100
	Caseína Hidrolisada	300
	Prolina	2900
	2,4-D	2
	Sacarose	30000
	pH	5,8
	Fitigel	3000
	Completar com água destilada para 1L	

Anexo 2.1. Meio de cultura de tecidos de arroz - *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cv. Nipponbare: indução de calos – N<sub>6</sub>D



	<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
<b>N6</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463
	KNO <sub>3</sub>	2830
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	165
<b>Fe EDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.25
<b>B5</b>	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
	KI	0,75
<b>VIT B5</b>	Tiamina	10
	Piridoxina	1
	Ácido Nicotínico	1
	Mio Inositol	100
	Caseína Hidrolisada	300
	Prolina	500
	Glutamina	500
	Sacarose	30000
	Fitigel	3000
	pH	5,8
	Completar com água destilada para 1 L	
	Autoclavar 15', 1atm, 121°C	

Anexo 2.2. Apêndice 2.1. Meio de cultura de tecidos de arroz - *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cv. Nipponbare: proliferação de calos – NB.

	<b>NB sólido</b>	<b>NB líquido</b>	<b>NBA</b>	<b>HTC</b>
	NB	NB	NB	NB
2,4 D	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
Fitigel	3 g/l	-	3 g/l	3 g/l
H <sub>2</sub> O destilada	1L	1L	1L	1L
pH	5,8	5,8	5,8	5,8
Autoclavar	15'	15'	15'	15'
Acetoseríngona	-	-	19,62 mg/l	-
Higromicina	-	-	-	50 mg/l
Timentina	-	-	-	150 mg/l
Cefotaxima	-	-	-	200 mg/l

Anexo 2.3. Meios de cultura de tecidos de arroz – *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cv. Nipponbare.