

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

KAIRA THALIA DA ROSA NUNES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA ASR5 DE ARROZ EM
Arabidopsis thaliana E SUAS INTERAÇÕES EM ESTRESSES ABIÓTICOS**

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Pinheiro-Margis

Co-orientadora: Dr^a Fernanda Lazzarotto

Porto Alegre, RS
2018

KAIRA THALIA DA ROSA NUNES

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

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Porto Alegre, 28 de junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Marcia Pinheiro-Margis

Departamento de Genética – UFRGS

Prof. Andreia Carina Turchetto Zolet

Departamento de Genética – UFRGS

Prof. Fernanda Stanisçuaski

Centro de Biotecnologia – UFRGS

RESUMO

Um fator limitante para o crescimento das plantas é a constante ocorrência de condições ambientais rigorosas e estressantes como seca, contaminação por metais pesados, excesso de sal no solo, variações de temperatura e iluminação, assim como ataques de patógenos e herbívoros. Essas adversidades trazem grandes problemas para a o desenvolvimento da agricultura em todo o mundo. O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais consumidos no planeta, e devido a isso, a otimização de seu cultivo torna-se um importante alvo de pesquisas na atualidade. As proteínas ASR (do inglês, *Abscisic acid, Stress and Ripening*) são fatores de transcrição codificados por genes que respondem a variados estresses de natureza abiótica. Sabe-se atualmente que o arroz é a planta cultivada de maior tolerância ao alumínio (Al) e que esta característica é intrinsecamente relacionada à ação das proteínas ASR. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o silenciamento dos genes que compõem a família ASR de arroz acarreta em forte inibição do desenvolvimento da raiz sob altas concentrações de alumínio. Além disso, esse trabalho também evidenciou que a redução da expressão de uma isoforma específica desta família gênica, intitulada OsASR5 (LOC_Os11g06720), afeta plantas de arroz aumentando sua sensibilidade não apenas ao alumínio como também a diferentes estresses abióticos. Assim, especula-se que a superexpressão de OsASR5 possa conferir tolerância ao alumínio e a outros estresses em arroz e em diferentes espécies vegetais, hipótese que permanece por ser avaliada. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o papel de OsASR5 na modulação da resposta ao alumínio em um sistema heterólogo. Para isso, plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene de arroz OsASR5 foram analisadas quanto ao seu desempenho sob estresse por alumínio e baixo pH. Os resultados obtidos indicam que não é possível incrementar a tolerância de *Arabidopsis* a esses dois estresses pela superexpressão de OsASR5. Dados prévios do nosso grupo sugeriam possível interação de OsASR5 com OsART1, outro fator de transcrição envolvido nas respostas a este metal em arroz. Para testar esta hipótese, realizamos os ensaios de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) e transativação, onde verificamos que OsASR5 e OsART1 interagem *in vivo*, modulando as respostas ao estresse por alumínio em conjunto. Estes resultados permitiram aprofundar o entendimento das vias de sinalização envolvidas na resposta ao alumínio e possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias visando a obtenção de plantas mais tolerantes a este metal.

Palavras-chave: ASR, estresse abiótico, alumínio, arroz.

ABSTRACT

A limiting factor for plant growth is the constant occurrence of severe and stressful environmental conditions such as drought, heavy metal contamination, excessive salt in the soil, temperature and lighting variations, as well as pathogen and herbivore attacks. These adversities cause major problems to agriculture development around the world. Rice (*Oryza sativa*) is one of the most consumed cereals on the planet, and because of this, the optimization of its cultivation becomes an important research target today. ASR proteins (Abscisic acid, Stress and Ripening) are transcription factors encoded by genes that respond to a variety of abiotic stresses. It is known that rice is the cultivated plant with the highest tolerance to aluminum (Al) and that this characteristic is intrinsically related to ASR proteins. Our research group has demonstrated that ASR gene family silencing in rice leads to strong inhibition of root development under high concentrations of aluminum. In addition, this work also showed that downregulation of a specific isoform of this family, *OsASR5* (LOC_Os11g06720), affects rice plants increasing its sensitivity not only to aluminum but also to different abiotic stresses. Thus, it is speculated that the overexpression of *OsASR5* may confer tolerance to aluminum and other stresses in rice and in different plant species, a hypothesis that remains to be evaluated. Therefore, the objective of this work was to characterize the role of *OsASR5* in modulating the response to aluminum in a heterologous system. For this purpose, *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing *OsASR5* were evaluated under aluminum stress and low pH. The results indicate that it is not possible to increase the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to these stresses by the overexpression of *OsASR5*. Previous data from our group suggested a possible interaction of *OsASR5* with *OsART1*, another transcription factor involved in the responses to this metal in rice. In order to test this hypothesis, we performed BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) and transactivation assays. Our results indicate that *OsASR5* and *OsART1* interact *in vivo* to modulate responses to aluminum. These results allowed a better understanding of the signaling pathways involved in the response to aluminum and will enable the development of new strategies in order to obtain plants more tolerant to this metal.

Key words: ASR, abiotic stress, aluminum, rice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo dos genes envolvidos no mecanismo de defesa contra o alumínio em arroz e <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Figura 2 – Alinhamento das sequências de aminoácidos dos seis membros da família ASR de arroz.....	11
Figura 3 – Mapa dos vetores utilizados no ensaio de BiFC.....	18
Figura 4 – Modelo esquemático das 12 construções de <i>OsASR5</i> e <i>OsART1</i> utilizadas para transformar protoplastos de <i>A. thaliana</i> para o ensaio de BiFC.....	20
Figura 5 – Análise das plantas transgênicas em microscópio de fluorescência.....	21
Figura 6 – Comparação entre as plantas ASR5 e WT quanto suas razões de crescimento sob condições controle e tratadas.....	22
Figura 7 – Combinações de vetores pSAT.....	24
Figura 8 – Confirmação dos plasmídeos utilizados para a transformação de protoplastos para o BiFC.....	24
Figura 9 - Interação <i>in vivo</i> entre <i>OsASR5</i> e <i>OsART1</i> em protoplastos de <i>A. thaliana</i>	25
Figura 10 – Atividade dos fatores de transcrição <i>OsASR5</i> e <i>OsART1</i> sobre o promotor do gene <i>OsSTAR1</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Macronutrientes e Micronutrientes presentes no meio de cultura.....	17
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Estresse abiótico em plantas: o papel do metal Alumínio	8
1.2 Genes <i>ASR</i>	10
1.2.1 Gene <i>OsASR5</i>	12
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo e suas interações com alumínio	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.1.1 Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Obtenção das plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> expressando <i>OsASR5</i>	16
3.2 Análise das plantas transgênicas por fluorescência.....	16
3.3 Testes com Alumínio.....	16
3.4 Ensaio de interação entre os fatores <i>OsASR5</i> e <i>OsART1</i>	17
3.4.1 Obtenção das construções gênicas	17
3.4.2 Obtenção de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
3.4.3 Complementação bimolecular da fluorescência (BiFC)	19
3.4.4 Ensaio de Transativação	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Análise das plantas transgênicas.....	21
4.2 Análise da tolerância das plantas <i>ASR5</i> ao Al	22
4.3 Interação entre os fatores <i>ASR5</i> e <i>ART1</i>	24
4.3.1 BiFC.....	24
4.3.2 Ensaio de Transativação	26
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

Entre os desafios da agricultura atual, a definição de estratégias para lidar com as mudanças climáticas e suas conseqüentes alterações ambientais ocupa posição de grande relevância. Embora não seja fácil prever os efeitos dessas mudanças, a biotecnologia vem direcionando grandes esforços na tentativa de aprimorar o desempenho das plantas frente aos diversos estresses ambientais como seca, salinização do solo, temperaturas extremas, contaminação do solo por metais, alterações no pH e ataque por patógenos.

Ainda que existam limitações biológicas para a resposta das plantas aos estímulos proporcionados pelo ambiente, o acesso à vasta diversidade biológica do planeta mostra-se como uma potente ferramenta para o desenvolvimento de novas tecnologias que visam aumentar a resiliência desses organismos às mudanças que estão acontecendo no mundo.

1.1 Estresse abiótico em plantas: o papel do metal Alumínio

As plantas, de diversas maneiras, são capazes de adaptar-se às condições rigorosas as quais são submetidas por um longo período de tempo. Um exemplo disso é o arroz (*Oryza sativa* L.), que, entre os cereais cultivados, é considerado a espécie mais tolerante à presença do metal alumínio (Al) no solo. Esse metal possui elevada toxicidade quando presente em solos de pH ácido, os quais constituem aproximadamente 50% dos solos aráveis do mundo (Panda *et al.*, 2009).

Em sua forma elementar, o alumínio não representa riscos ao desenvolvimento das plantas e não constitui um problema para a agricultura, apesar de não configurar entre os nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos vegetais. Entretanto, em solos de pH inferior a 5,0, esse metal é ionizado e adquire uma forma catiônica (Al^{3+}) que é solúvel em água, tornando-se disponível e, por fim, tóxico para as plantas.

Os principais efeitos causados por esse metal, quando absorvido pelas plantas, são alterações na membrana das células da raiz, inibição da divisão celular e síntese de DNA, perturbações na captação e transporte de nutrientes, entre outros (Machado, 1997). Em laboratório, os efeitos do alumínio no metabolismo da planta

podem ser observados em poucos minutos após a aplicação do estresse e concentrações da ordem de 10^{-6} molar do cátion são suficientes para que isso aconteça, (Kochian, 1995).

O mecanismo de tolerância ao Al^{3+} pode se dar por meio de dois processos: a planta pode evitar que o metal penetre em suas estruturas radiculares por meio da exsudação de compostos orgânicos para quelar o Al^{3+} presente na rizosfera, ou pode sequestrar os cátions e promover a detoxificação do alumínio por meio de um mecanismo interno de tolerância (Ma *et al.*, 2001).

O estresse por alumínio desencadeia rotas de sinalização que levarão a planta a expressar genes relacionados ao mecanismo de tolerância mais adequado à sua natureza e condições. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, a presença de Al^{3+} induz a expressão do fator de transcrição *STOP1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*), que atua na modulação da expressão de outros genes envolvidos nessa cascata, como *ALMT1* e *MATE*.

Em arroz, o sistema de tolerância ao Al^{3+} é semelhante ao de *Arabidopsis*, sendo que *OsART1* e *OsSTAR1* ocupam papéis centrais nesse mecanismo. O fator de transcrição *OsART1*, homólogo a *STOP1* de *A. thaliana*, é responsável pela modulação da expressão do gene *OsSTAR1* e outras proteínas envolvidas mais diretamente com a detoxificação do alumínio na planta (figura 1).

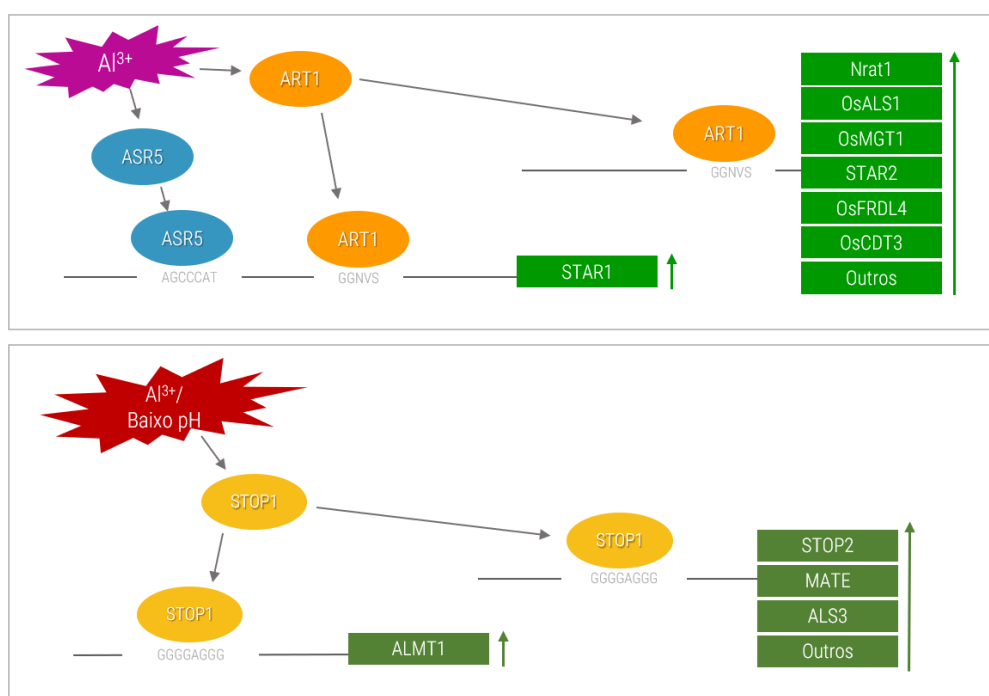


Figura 1. Esquema representativo dos genes envolvidos no mecanismo de defesa contra o alumínio em arroz (A) e *Arabidopsis thaliana* (B). Adaptado de *Aluminum Stress Tolerance in Plants* (Springer, 2015).

Apesar de ter um papel importante nesse aparato de tolerância ao Al^{3+} , curiosamente, o fator de transcrição *ART1* de arroz não é induzido pela presença deste metal, mas sim pelo aumento da concentração de prótons (H^+) no solo, condição intrinsecamente relacionada à ionização do Al. Assim, sugere-se que para haver uma regulação coordenada entre genes responsivos ao pH e à presença do alumínio, seja necessária a existência de um ou mais fatores atuando em conjunto com *ART1*.

1.2 Genes ASR

Os genes *ASR* (*Abscisic acid, Stress and Ripening*) são induzidos em resposta à exposição a variados estresses de natureza abiótica e codificam proteínas bifuncionais que podem atuar como chaperonas e fatores de transcrição. Esses genes já foram identificados e caracterizados em várias espécies vegetais como tomate (Iusem *et al.*, 1993), lírio (Yang *et al.*, 2005), milho (Riccardi *et al.*, 1998), cana de açúcar (Sugiharto *et al.*, 2002), arroz (Vaidyanathan *et al.*, 1999) e diversas outras plantas vasculares, mas, curiosamente, na planta modelo *Arabidopsis thaliana* essa família gênica está ausente.

As proteínas codificadas por esses genes possuem dois domínios altamente conservados: um domínio amino-terminal rico em resíduos de histidina, por meio do qual se liga ao DNA em um processo dependente do íon Zn^{2+} ; e um segundo domínio localizado na região carboxi-terminal denominado WDS (*Water, Deficit and Stress*), onde também está presente um sinal de localização nuclear (Yang *et al.*, 2008) (figura 2). As proteínas ASR são geralmente pequenas, contendo menos de trezentos resíduos de aminoácidos e são codificadas por genes, cuja estrutura conta com dois éxons e um íntron. Além disso, as proteínas ASR encontram-se desestruturadas na ausência de Zn^{2+} no interior da célula, uma vez que este metal influencia na estruturação do polipeptídeo e, conseqüentemente, na formação de homodímeros entre moléculas (Goldgur *et al.*, 2007).

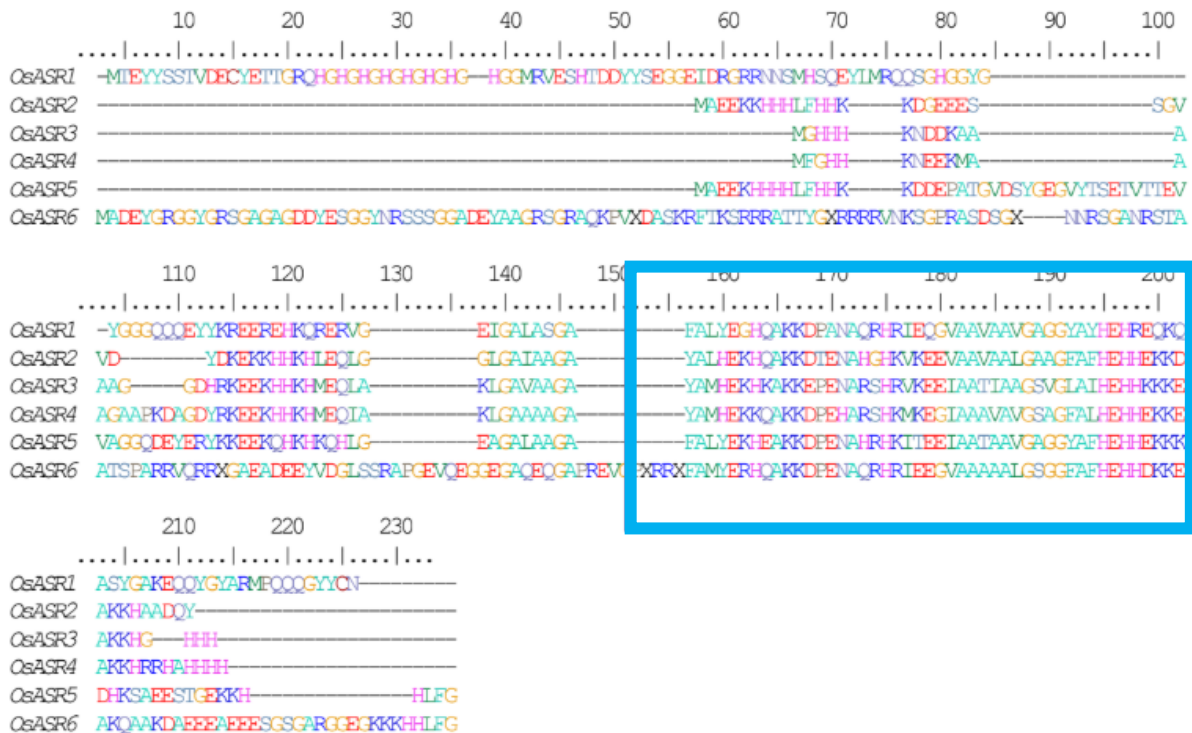


Figura 2. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos seis membros da família ASR de arroz. Em destaque no alinhamento, o domínio WDS, conservado entre as proteínas dessa família (conforme Arenhart *et al.*, 2008).

A atuação dessas proteínas tem se revelado diretamente associada aos mecanismos de defesa das plantas a estresses ambientais. Em tomate (*Solanum lycopersicum*), o gene *SIASR1* teve maiores níveis de expressão quando a planta foi submetida a estresse osmótico por polietilenoglicol (PEG) (Amitai-Zeigerson *et al.*, 1995). Em trigo (*Triticum aestivum*), estudos de proteômica mostraram que as proteínas ASR acumulam-se durante estresse hídrico (Bazargani *et al.*, 2011). Em arroz (*Oryza sativa*), os seis membros da família ASR têm sua expressão induzida na presença de Al^{3+} , entretanto, *OsASR1* e *OsASR5* são os genes que mais se destacam nessa condição, não apenas por apresentarem altos níveis de expressão basais, mas também por serem fortemente induzidos na presença deste metal (Arenhart *et al.*, 2013). Estudos anteriores também demonstraram que a expressão heteróloga do gene *lla23* de lírio (homólogo de *ASR5* de arroz) em *A. thaliana* confere à planta tolerância frente às condições de seca e salinidade, evidenciando a importância das proteínas ASR o mecanismo de tolerância aos mais variados estresses abióticos.

1.2.1 Gene OsASR5

O produto da expressão do gene *ASR5* de arroz é uma proteína de 138 aminoácidos que se localiza no citoplasma da célula vegetal, mas também já foi encontrada nos cloroplastos e no núcleo (Arenhart *et al.*, 2012). Quando está localizada no citoplasma, *ASR5* atua como chaperona (Li *et al.*, 2017). Quando presente no núcleo, esta proteína liga-se ao DNA, atuando como fator de transcrição e, assim, dirigindo a expressão de genes relacionados às respostas da planta frente a situações de estresse abiótico, como déficit hídrico, salinização do solo, entre outras.

Em arroz, *ASR5* possui um papel essencial na resposta da planta ao estresse por alumínio, por meio da indução de genes como *OsSTAR1* (Arenhart *et al.*, 2014), membro da família de transportadores ABC em arroz, o qual, juntamente com *STAR2*, forma um complexo transportador de UDP-glicose para a parede celular, auxiliando a mascarar os potenciais sítios onde Al^{3+} pode se ligar (Huang *et al.*, 2009). Além de *OsSTAR1*, *ASR5* também atua regulando a expressão de outros genes importantes para as respostas frente ao estresse por alumínio, como *OsNrat1*, que transporta íons de Al^{3+} (Xia *et al.*, 2010), e *FRDL4*, que é induzido por alumínio e atua na detoxificação externa do metal ao auxiliar na liberação de ácidos orgânicos (Yokosho *et al.*, 2011). A proteína *ASR5* é bastante expressa no tecido radicular, o qual está intimamente envolvido com o mecanismo de resposta ao estresse por alumínio. A exemplo disso, plantas de arroz silenciadas para *OsASR5* tiveram o crescimento de suas raízes inibido em altas concentrações de Al^{3+} , enquanto as plantas selvagens resistiram ao estresse e suas raízes se desenvolveram normalmente (Arenhart *et al.*, 2013).

Estudos anteriores demonstraram que *ASR5* é capaz de ligar-se ao promotor do gene *STAR1* em arroz para induzi-lo frente à presença de Al^{3+} (Arenhart *et al.*, 2014). Além de *ASR5*, sabe-se que outro fator de transcrição, denominado *ART1*, também é essencial para a indução do gene *STAR1* frente ao estresse por Al^{3+} . No entanto, como citado anteriormente, o gene codificador de *ART1* não é induzido em resposta ao alumínio, mas sim frente ao acúmulo de íons H^+ .

Diferente da maioria das proteínas *ASR*, *OsASR5* não é capaz de formar homodímeros, mesmo na presença de zinco (Arenhart *et al.*, 2014). Esse resultado

nos permitiu formular duas hipóteses: (a) ASR5 atua em monômeros em arroz; ou, (b) ASR5 está interagindo com outros fatores de transcrição, formando heterodímeros, como ocorre com as proteínas ASR de uva (Saumonneau *et al.*, 2008). No estudo de Arenhart (2014), foi sugerido que a regulação de genes como *OsSTAR1* pudesse ser realizada por meio da interação entre os fatores ASR5 e ART1. Os pesquisadores testaram a ocorrência dessa interação por meio de um ensaio de duplo-híbrido em levedura, mas o experimento não foi capaz de confirmar a hipótese levantada. Muito embora o ensaio de duplo-híbrido em levedura seja bastante utilizado para detecção de interações proteína-proteína, falsos negativos podem ocorrer em razão deste ser conduzido em um organismo muito diferente, onde fatores acessórios podem estar ausentes, por exemplo. Nesse ínterim, a validação desta interação proteica por meio de metodologias que se utilizem de um modelo vegetal pode ser de grande valia para que se possa confirmar ou refutar a hipótese levantada.

1.3 *Arabidopsis thaliana* como modelo e suas interações com alumínio

Há mais de trinta anos que *Arabidopsis thaliana* vem sendo uma das plantas mais utilizadas na pesquisa científica. Pertencendo à família Brassicaceae, comum ao brócolis e couve, *A. thaliana* oferece vantagens interessantes para a pesquisa, muito em mérito de características específicas de seu pequeno genoma que é bastante conhecido e explorado. O fato de ter um ciclo de vida rápido (cerca de seis semanas) e produzir um grande número de sementes facilita seu uso em pesquisa, além de ser uma planta facilmente transformável pelos métodos existentes. Também em virtude do vasto conhecimento do genoma de *A. thaliana*, existem mutantes para quase todos os seus genes, disponíveis em bancos de sementes, que podem ser explorados para os mais diversos fins acadêmicos (The Arabidopsis Information Resource, TAIR).

Apesar dos genes ASR não serem encontrados no genoma de *A. thaliana*, estudos recentes mostraram que a expressão heteróloga de *OsASR5* nesta espécie confere à planta maior tolerância à seca e estresse osmótico (Li *et al.*, 2017). Esse resultado sugere que ASR5 de arroz é capaz de atuar de forma a induzir mecanismos de defesa a estresses abióticos em *A. thaliana*, aumentando a

tolerância dessas plantas às condições analisadas. Esses dados, juntamente com os que serão apresentados neste trabalho, auxiliam a validar a importância biotecnológica de *OsASR5* na tolerância aos estresses abióticos e coloca esse gene como um forte candidato a ser utilizado pela engenharia genética no melhoramento de espécies vegetais, com o objetivo de prepará-las para o ambiente que vem sendo tão rapidamente modificado pelo homem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elucidar o mecanismo de ação de ASR5 na via de resposta ao alumínio em arroz (*Oryza sativa*) e analisar plantas transgênicas de *A. thaliana* expressando o gene *OsASR5* quanto ao seu desempenho frente ao estresse por alumínio.

2.1.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar o desempenho de plantas transgênicas de *A. thaliana* expressando o gene *OsASR5* em condições de estresse por alumínio;
2. Avaliar a formação de heterodímeros entre *OsASR5* e *OsART1* *in vivo* por meio da técnica de complementação bimolecular da fluorescência;
3. Caso a interação seja confirmada, analisar a atividade dos fatores de transcrição *OsASR5* e *OsART1*, sozinhos e combinados, sobre o promotor de um gene de resposta ao alumínio em arroz, por meio de um ensaio de transativação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando OsASR5

As plantas de *A. thaliana* expressando o gene OsASR5 (LOC_Os11g06720) foram obtidas previamente a este trabalho (Neto, 2014). Plantas selvagens do ecotipo Col-0 de *A. thaliana* foram crescidas em sala de cultivo na temperatura de 23 °C e fotoperíodo de 16h de luz/8h escuro até que entrassem no estágio de florescimento. A transformação foi feita pelo método *Floral Dip* (Clough e Bent, 1998), utilizando a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* da estirpe EHA105 carregando o plasmídeo pEarleyGate101 (Earley *et al.*, 2006) contendo a sequência codificadora do gene OsASR5 clonada de forma a permitir a expressão de um produto de fusão de ASR5 à proteína fluorescente amarela (YFP), sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Para este trabalho, foram utilizadas plantas na geração T4 após análise da expressão da proteína recombinante por meio de microscopia de fluorescência.

3.2 Análise das plantas transgênicas por fluorescência

Plantas cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente, com o meio de cultura acrescido do herbicida glufosinato de amônio, foram preparadas em lâminas para análise por microscopia de fluorescência. O filtro utilizado foi Spectrum Green (excitação 498 nm e emissão 522 nm).

3.3 Testes com Alumínio

Sementes de *A. thaliana* das linhagens selvagem (Col-0) e a expressão heteróloga de OsASR5 (fusionada à YFP), foram esterilizadas e semeadas em placas contendo o meio de cultura com os nutrientes descritos na tabela 1. O pH final foi ajustado para 5.8 e as placas foram deixadas por dois dias na temperatura de 4 °C.

Tabela 1. Composição do meio de cultura utilizado nos experimentos com *Arabidopsis thaliana**.

Macronutrientes		Micronutrientes	
KNO ₃	6 mM	H ₂ MoO ₄	0.1 uM
Ca(NO ₃) ₂	4 mM	NiSO ₄	0.1 uM
MgSO ₄	1 mM	ZnSO ₄	1 uM
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1 mM	H ₃ BO ₃	12.5 uM
FeSO ₄	10 mM	MnSO ₄	1 uM
Na ₂ -EDTA	10 mM	CuSO ₄	0.5 uM

*Adaptado de Wan *et al.*, 2018.

Após a estratificação, as placas foram transferidas para a sala de cultivo, com temperatura de 23 °C e fotoperíodo 16h luz/8h escuro, por mais 5 dias. Quando as raízes das plântulas apresentavam aproximadamente 1 cm, foram transferidas para outro meio nas condições controle (pH 5.8), baixo pH (pH 4.5) ou baixo pH + alumínio (pH 4.5, 100 µM AlCl₃). As placas foram fotografadas e deixadas na sala de cultivo por mais 6 dias. Ao final do experimento, as placas foram novamente fotografadas e os tamanhos das raízes foram mensurados no início e ao final dos tratamentos com ajuda do software ImageJ (NIH).

3.4 Ensaios de interação entre os fatores OsASR5 e OsART1

3.4.1 Obtenção das construções gênicas

Os vetores para utilização nos ensaios de interação entre ASR5 e ART1 foram obtidos por meio da recombinação dos vetores de entrada pENTR::ASR5 e pENTR::ART1 (obtidos previamente a este trabalho) com os vetores de destino pSAT4, pSAT4A, pSAT5 e pSAT5A (Lee *et al.*, 2008) (figura 3), de acordo com o protocolo do sistema Gateway® (*Thermo Fisher Scientific*).

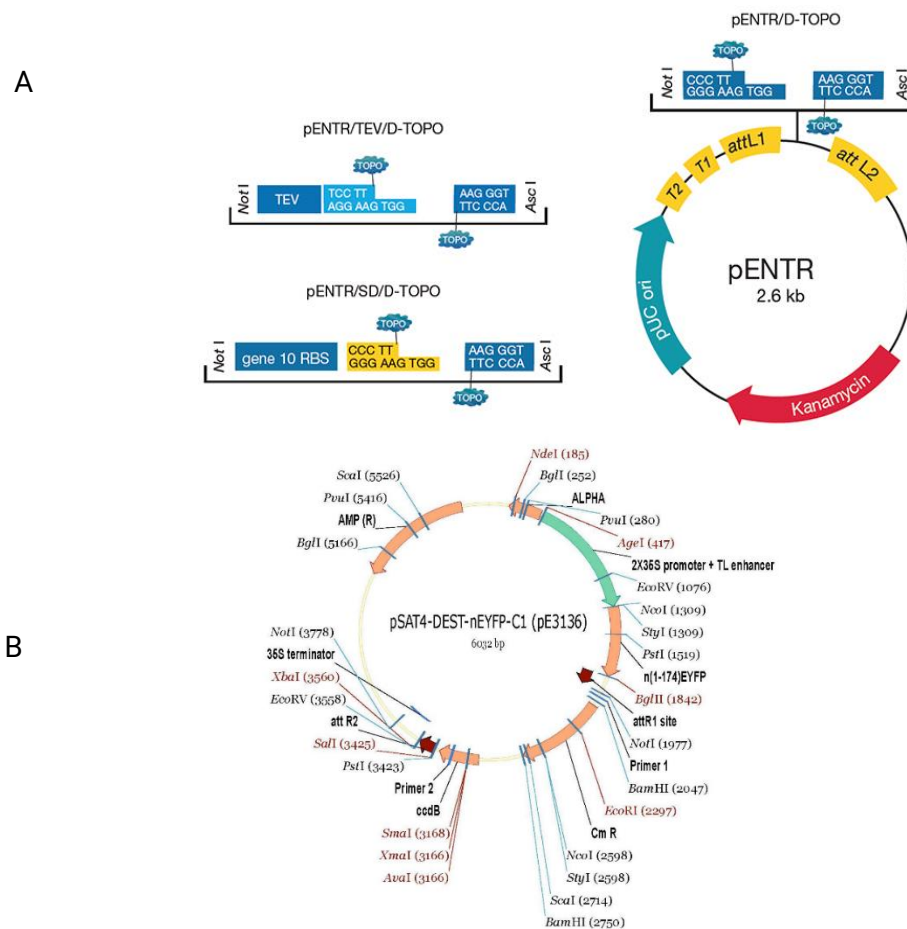


Figura 3. Mapa dos vetores utilizados no ensaio de BiFC. (A) pENTR/D-TOPO (*Thermo Fischer Scientific*) e (B) pSAT4 (TAIR). Os demais vetores pSAT se assemelham a este, com sua única diferença situada na localização da sequência codificadora do gene repórter YFP.

Posterior à reação de recombinação, os plasmídeos obtidos foram utilizados para transformação de *Escherichia coli* DH5a, que foi plaqueada em LB ágar contendo 150 mg/L de ampicilina (37 °C, *overnight*) e, em seguida, multiplicados em cultura líquida (LB Broth, 37 °C, 160 rpm, *overnight*). As transformações foram confirmadas por clivagem enzimática em reações contendo 5 unidades da enzima NotI (*New England BioLabs*), 2 µL de Tampão 3.1 10X (*New England BioLabs*), aproximadamente 500 ng de DNA plasmidial e H₂O Mili-Q para um volume final de 20 µL. As reações foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 2h e em seguida foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Após a etapa de confirmação, as bactérias transformadas foram crescidas em meio LB líquido contendo 150 mg/L de ampicilina para posterior extração de DNA plasmidial por meio de kit comercial de purificação (*Sigma-Aldrich*), conforme

instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e a integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8%.

3.4.2 Obtenção de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Para a obtenção dos protoplastos, plantas de *A. thaliana* do ecotipo Col-0 foram cultivadas durante três semanas e suas folhas foram excisadas para a remoção da epiderme, segundo o protocolo de Wu e colaboradores (2009). Os protoplastos foram extraídos do mesófilo das folhas por meio de digestão enzimática da parede celular vegetal com uma solução enzimática contendo 1% de celulase R-10 e 0,25% de macerozima R-10.

3.4.3 Complementação bimolecular da fluorescência (BiFC)

Para o ensaio de complementação bimolecular da fluorescência, as sequências codificadoras dos genes *OsASR5* (LOC_Os11g06720) e *OsART1* (LOC_Os12g0170400), em versões contendo ou não o códon de parada da tradução, foram clonadas nos vetores pSAT4, pSAT4A, pSAT5 e pSAT5A, descritos anteriormente. Assim, doze construções gênicas foram geradas e combinadas aos pares em seis diferentes combinações, como mostrado na figura 4. As combinações de plasmídeos foram utilizadas para a transformação de protoplastos de *A. thaliana*, que foram incubados por período de 16 a 24h a 25 °C e posteriormente analisados em microscópio confocal de varredura a laser Olympus Fluoview 1000.

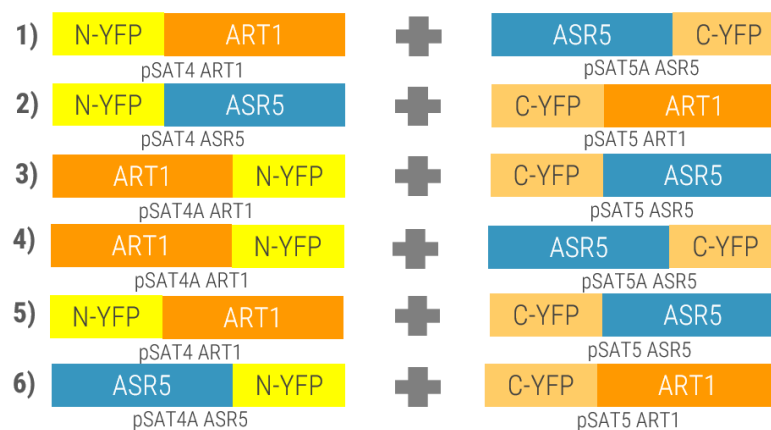


Figura 4. Modelo esquemático das 12 construções de *OsASR5* e *OsART1* utilizadas para transformar protoplastos de *A. thaliana* para o ensaio de BiFC.

3.4.4 Ensaio de Transativação

Para o ensaio de transativação foram utilizados os mesmos vetores gerados para o ensaio de BiFC, mais um plasmídeo contendo uma sequência de aproximadamente 518 pares de base do promotor do gene *STAR1* de arroz dirigindo a expressão do gene repórter *GUS* (pGUS518), obtido previamente a este trabalho. O fragmento do promotor utilizado neste ensaio foi selecionado com base em estudos prévios que identificaram cis-elementos de ligação de ASR5 e ART1 nesta região (Arenhart *et al.*, 2014). Os plasmídeos utilizados foram purificados e transformados em protoplastos de *A. thaliana*, conforme descrito anteriormente.

Para verificar as interações entre os fatores e sua influência na indução da expressão do gene *STAR1*, aproximadamente 10^5 protoplastos isolados do mesófilo das folhas de *A. thaliana* foram transfetados com 10 µg de cada plasmídeo (35S::*GUS* e 35S::*STAR1*prom_*GUS*, designado Gus518) mais 10 µg de 35S::*ASR5* e/ou 35S::*ART1* e incubados por 24h, a 25 °C, e posteriormente congelados com nitrogênio líquido e estocados sob temperatura de -80 °C para que fossem preservados para as análises posteriores.

Os protoplastos foram lisados em 100 µL de tampão de extração (10% de Na-fosfato/EDTA pH 7,0, β-mercaptoetanol 10 mM, 0,1% de triton X-100, 0,1% de lauril sarcosinato de sódio). A atividade de *GUS* foi medida usando MUG (4-metilumbeliferyl-β-D-glucoronide) como substrato e protoplastos transformados com construção 35S::*GUS* foram usados como controle positivo. A leitura da atividade de *GUS* foi feita em um fluorímetro (excitação: 365 nm, emissão: 444 nm) e o fluoróforo MU (4-methylumbelliferone) foi utilizado como referência para a medida da fluorescência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise das plantas transgênicas

Sementes provenientes de plantas de *A. thaliana* transformadas com o cassete 35S::OsASR5-YFP foram germinadas em meio de cultura contendo o herbicida glufosinato de amônio, marca de seleção do plasmídeo utilizado na transformação, para análise da segregação do transgene e, assim, seleção das linhagens homozigotas. Embora mais de uma linhagem transgênica tenha sido gerada na etapa de transformação das plantas de *A. thaliana*, somente uma linhagem foi selecionada para dar sequência aos experimentos em razão desta estar em homozigose e apresentar desenvolvimento mais uniforme quando comparada às demais linhagens obtidas. A linhagem selecionada (linhagem 12) foi analisada em microscópio de fluorescência, por meio do qual pode-se verificar a expressão do produto de fusão ASR5-YFP tanto nas folhas quanto nas raízes das plantas transgênicas (figura 5).

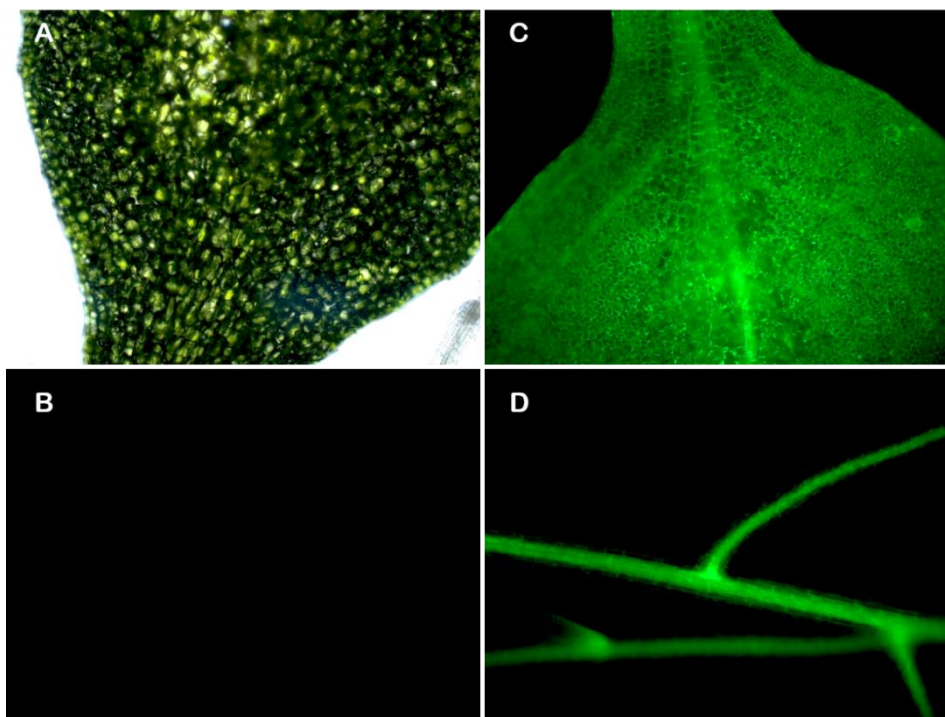


Figura 5. Análise das plantas transgênicas em microscópio de fluorescência. (A) Folha de planta não transformada (WT) em campo claro; (B) Folha de planta WT sob filtro YFP; (C) Folha de planta ASR5-YFP (Linhagem 12) sob filtro YFP; (D) Raiz de planta ASR5-YFP (Linhagem 12) sob filtro YFP. Filtro Spectrum Green (excitação 498 nm e emissão 522 nm).

4.2 Análise da tolerância das plantas expressando ASR5 ao Al

Plantas de *A. thaliana* expressando o gene heterólogo *OsASR5* foram cultivadas conforme descrito no item 3.2, em condições controle (pH 5,8), de baixo pH (pH 4,5) e na presença de Al^{3+} (pH 4,5). As raízes das plantas transgênicas e de plantas não transformadas (WT) foram aferidas no início e ao final do experimento, após seis dias de tratamento, e o crescimento relativo foi mensurado para posterior análise estatística (figura 6).

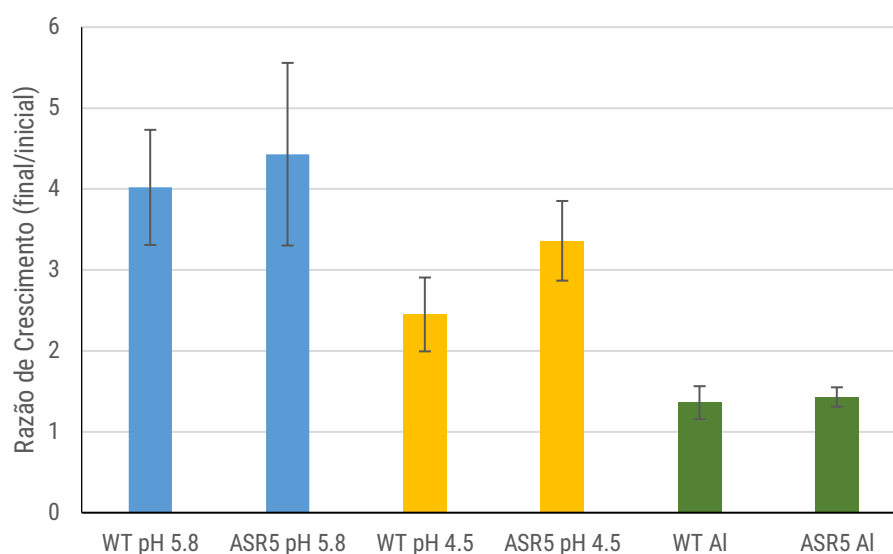


Figura 6. Crescimento relativo de raízes de planta ASR5 e WT ao final de 6 dias em condições controle (pH 5,8), de pH baixo (pH 4,5) e de pH baixo + Al^{3+} (pH 4,5). A análise estatística foi feita por meio do Teste t-Student, com n=30 plantas.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos analisados, o que indica que a proteína ASR5 de arroz não foi capaz de conferir tolerância ao estresse por Al^{3+} em *Arabidopsis*. Isso pode estar ocorrendo em virtude de *OsASR5* não ser uma proteína endógena de *A. thaliana*, que já possui um mecanismo de defesa próprio para as condições de estresse por alumínio e altas concentrações de prótons. Em outras palavras, o fator de transcrição *AtSTOP1* pode estar desempenhando seu papel sozinho, sem a necessidade da influência de *OsASR5*, como já o faz naturalmente. Além disso, para que *OsASR5* pudesse desempenhar a função que estávamos buscando, há a possibilidade de que em *A. thaliana* não existam outros fatores que podem estar envolvidos nessa via, ou seja, a

maquinaria para o correto funcionamento de OsASR5 não está presente nesta planta. Outra hipótese, é a de que a tag YFP possa estar influenciando na atuação de OsASR5 no mecanismo de resposta ao alumínio em *A. thaliana*.

Embora uma das hipóteses deste trabalho seja a interação física entre os fatores de transcrição OsASR5 e OsART1 (homólogo de AtSTOP1), existe também a possibilidade de não se aplicar na relação OsASR5 x AtSTOP1, por diferenças estruturais, e influenciar na atuação de OsASR5 na via em questão. Provavelmente, a estrutura proteica de AtSTOP1 não possibilita essa interação, como ocorre com OsART1. O alinhamento a seguir mostra que a estrutura primária das duas proteínas é diferente, o que pode estar influenciando na interação com outros fatores, como OsASR5 (figura 7).

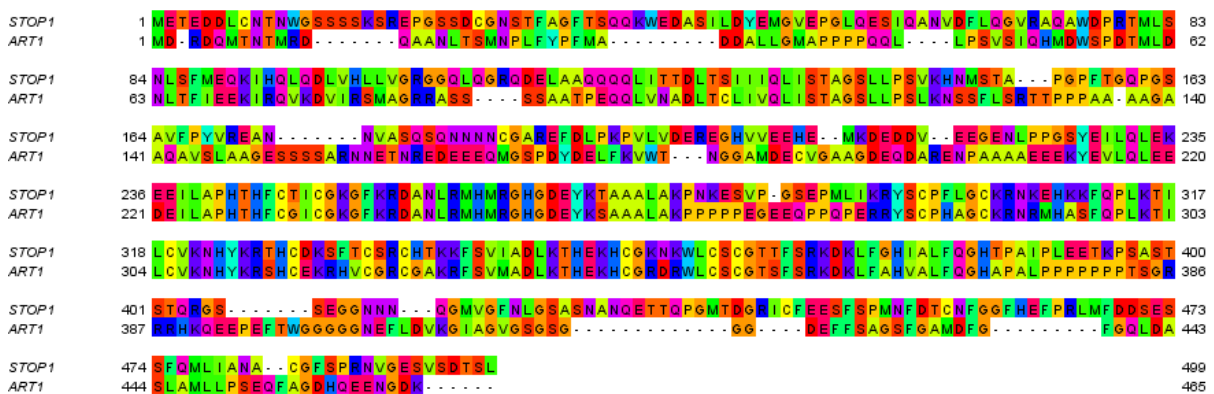


Figura 7. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos de AtSTOP1 e OsART1. Imagem obtida pelo software Jalview.

Estudos recentes também já propuseram a grande exclusividade de STOP1 no mecanismo de resposta aos estresses por alumínio e pH baixo em *A. thaliana*. Tentativas de expressar proteínas STOP1-like em mutantes *stop1* não obtiveram sucesso na recuperação do fenótipo de resistência ao alumínio e somente as respostas relacionadas ao baixo pH foram recuperadas (Ohyama *et al.*, 2013). Mesmo a complementação de mutantes *stop1* com o fator STOP2, o único ortólogo de STOP1 em *A. thaliana*, só foi capaz de recuperar a tolerância à H⁺ (Kobayashi *et al.*, 2014). Esses dados, juntamente com os obtidos neste trabalho, corroboram a fina e específica regulação do mecanismo de resposta ao alumínio e pH baixo em *A. thaliana*.

4.3 Interação entre os fatores ASR5 e ART1

4.3.1 BiFC

Para verificar a possível interação física entre os fatores de transcrição ASR5 e ART1 de arroz, protoplastos de *A. thaliana* foram transformados com as seis combinações de vetores descritos no item 3.3.2. Os protoplastos, depois de incubados durante 16h, foram observados por microscopia confocal. Dentre as combinações de vetores testadas, apenas foi possível observar a interação nas transformações feitas com duas das combinações, as quais encontram-se ilustradas na figura 8. A confirmação dessas construções, feita por clivagem enzimática, está apresentada na figura 9 e as bandas esperadas estão indicadas por setas laranjas. As bandas não sinalizadas por setas (as que se encontram acima das bandas indicadas) representam DNA não clivado na reação.

Como é possível ver nas imagens provenientes da microscopia confocal (figura 10), a interação entre os dois fatores parece estar ocorrendo no núcleo da célula vegetal e ao seu redor. Apesar de não ter sido possível confirmar a localização nuclear da interação por meio de coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), a interação entre fatores de transcrição é usualmente detectada nesta organela.



Figura 8. Combinações de vetores pSAT, contendo as sequências codificadoras de ASR5 ou ART1, que resultaram em interação dos fatores de transcrição *in vivo* nos protoplastos de *A. thaliana*.

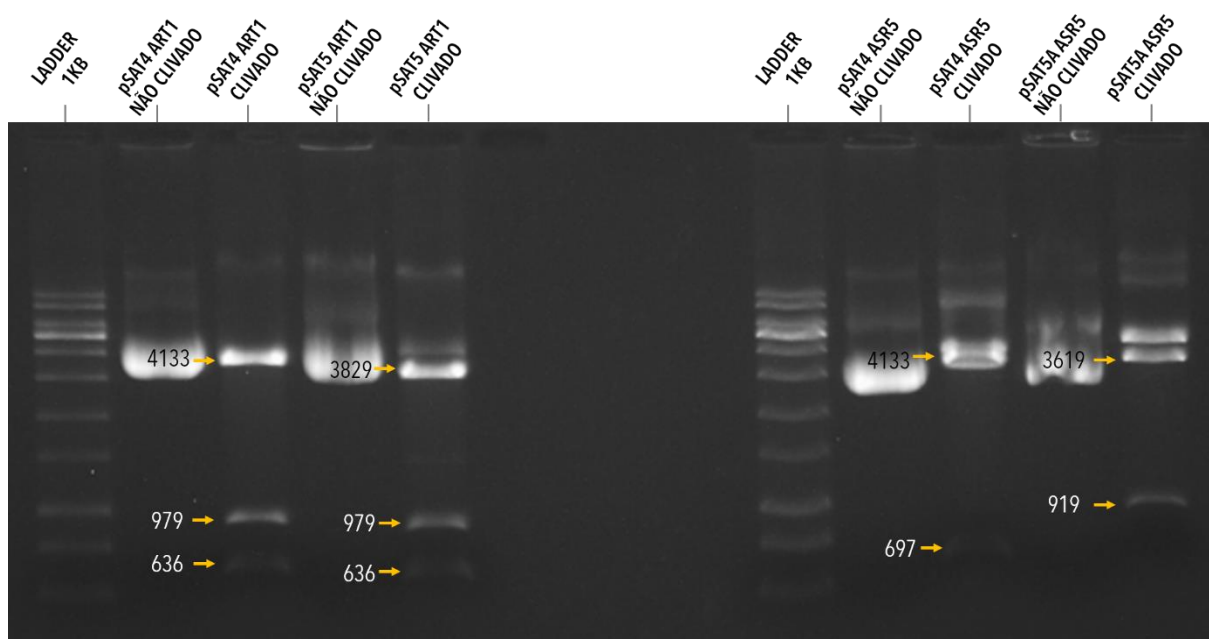


Figura 9. Confirmação dos plasmídeos utilizados na transformação de protoplastos de *A. thaliana*. As bandas esperadas estão indicadas na imagem, os números indicam o tamanho dos fragmentos em pares de base.

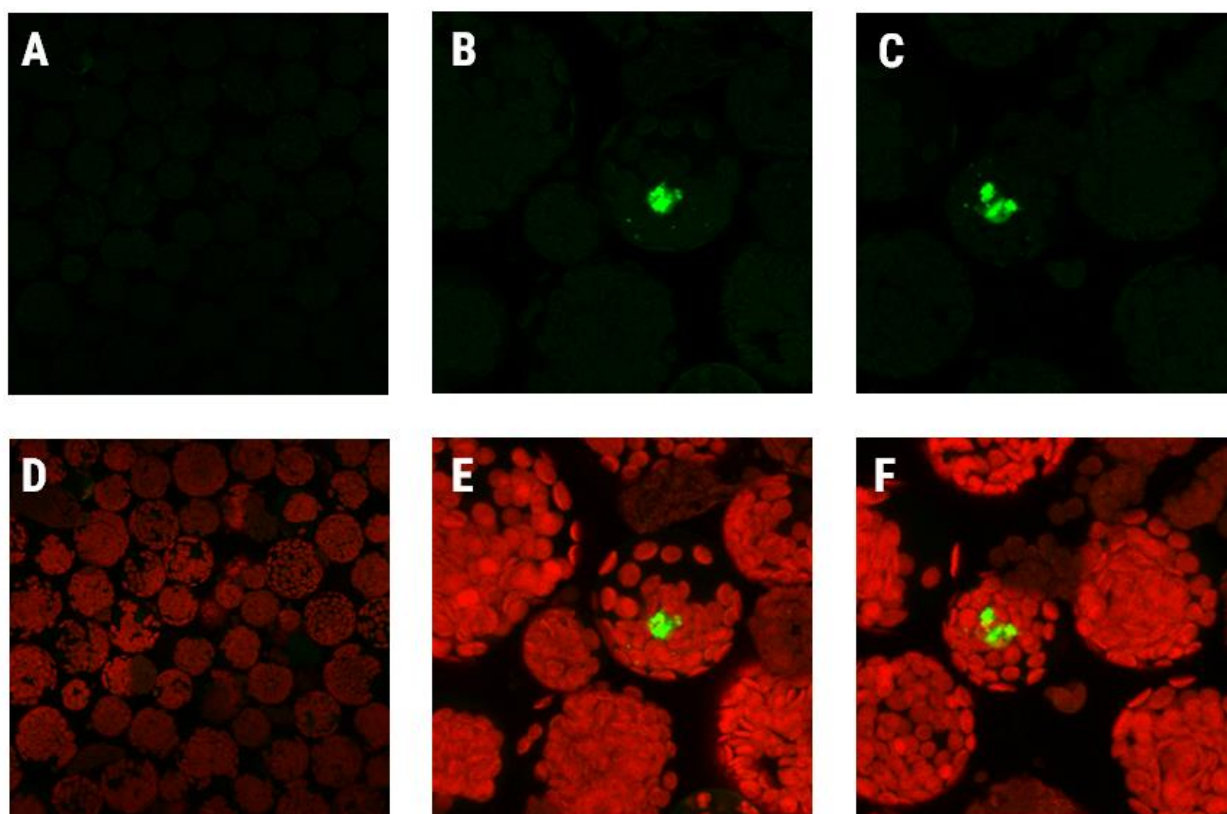


Figura 10. Interação *in vivo* entre OsASR5 e OsART1 em protoplastos de *A. thaliana*. A detecção da fluorescência da proteína YFP indica a interação entre os fatores avaliados no ensaio de

complementação bimolecular da fluorescência (BiFC). Superior: fluorescência de YFP. Inferior: sobreposição da fluorescência de YFP com a autofluorescência da clorofila. A e D, controle (não transformado). B e E, interação na orientação 1. C e F, interação na orientação 2. Imagens obtidas por microscopia confocal.

A localização de ASR5 na célula vegetal depende de seu estado conformacional, que está diretamente relacionado com sua função. Além de estar presente no núcleo e citoplasma, ASR5 de arroz já foi detectada nos cloroplastos, e a principal hipótese para explicar essa localização é de que essa proteína é sequestrada para os cloroplastos em uma forma inativa e só é transportada para o núcleo em situações de estresse (Arenhart *et al.*, 2012). Assim, a fluorescência que parece estar à margem do núcleo das células analisadas no ensaio de BiFC também pode ser decorrente de alguma outra atividade que as duas proteínas possam executar nestas células.

4.3.2 Ensaio de Transativação

Ainda no intuito de confirmar a atuação em conjunto dos fatores OsASR5 e OsART1 nas respostas ao Al³⁺, um ensaio de transativação em protoplastos de *A. thaliana* foi realizado, o qual se baseia na detecção fluorimétrica da atividade enzimática de beta-glucuronidase, produto da expressão do gene repórter GUS. Uma sequência de 518 pares de bases do promotor do gene *OsSTAR1*, dirigindo a expressão do gene repórter *GUS*, foi utilizado como alvo dos dois fatores de transcrição. Neste ensaio, foi possível verificar que a presença de ambos os fatores potencializa a ativação do promotor de *OsSTAR1* em comparação aos fatores isolados, como mostra a figura 11.

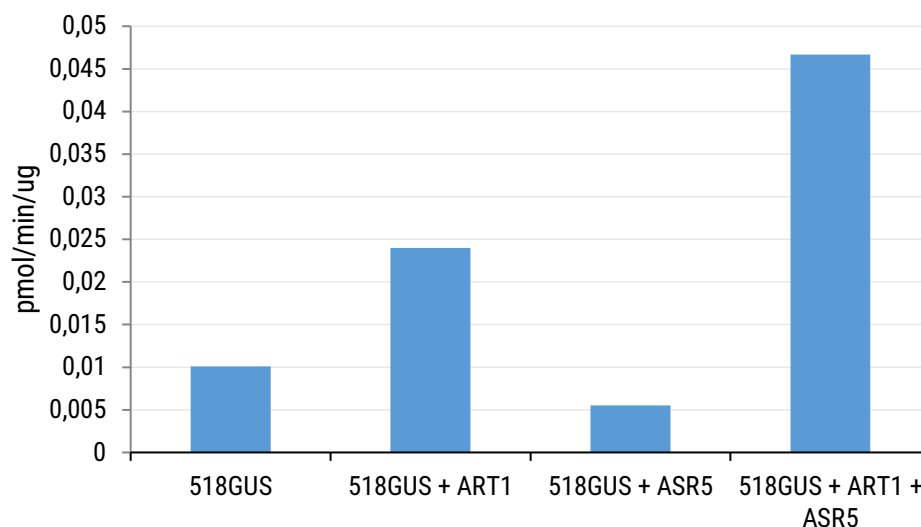


Figura 11. Atividade dos fatores de transcrição OsASR5 e OsART1 sobre o promotor do gene OsSTAR1, medida indiretamente por meio da atividade de beta-glucuronidase decorrente da expressão do gene repórter GUS, normalizada pelo conteúdo total de proteína do extrato celular.

Arenhart e colaboradores (2014) já haviam mostrado, por meio de um ensaio de transativação, que ASR5 liga-se ao promotor de *OsSTAR1* e é capaz de induzir sua expressão significativamente. No entanto, o ensaio realizado neste trabalho não foi capaz de detectar tal indução quando ASR5 foi expresso isoladamente. Algumas diferenças metodológicas podem explicar este resultado, tendo em vista que nosso ensaio foi realizado em menor tempo e com menor quantidade de DNA. Além disso, o gráfico acima não conta com análise estatística em virtude das poucas replicatas técnicas e biológicas que foram recuperadas. Em virtude do tempo, não foi possível repetir esse experimento para confirmação e análise estatística dos dados. Entretanto, os resultados parciais da transativação já mostram fortes indícios da atuação conjunta entre esses dois fatores de transcrição nas vias de resposta ao alumínio em arroz.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os genes *ASR* têm se tornado potenciais candidatos para o melhoramento de espécies vegetais a fim de torná-las resistentes aos estresses abióticos. O presente trabalho teve como objetivo compreender melhor a complexa regulação do mecanismo de tolerância ao alumínio nas plantas e gerar mais conhecimento acerca deste tema.

Anteriormente a este trabalho, sabia-se da atuação isolada de *OsARS5* em suas funções de chaperona e fator de transcrição. Agora, o ponto a ser acrescentado é que esse fator não só atua isoladamente, mas também desempenha seu papel ao associar-se a outras proteínas envolvidas nos mecanismos de resposta ao alumínio e, provavelmente, funcione desta maneira nos demais estresses abióticos.

Em relação aos dados obtidos com a utilização de um sistema heterólogo para estudar a toxicidade do alumínio em plantas, os resultados contrariando a hipótese de que *OsASR5* poderia conferir tolerância às plantas de *A. thaliana* nos levam a crer que outras abordagens possam permitir a melhor compreensão do mecanismo envolvido, pois esse resultado pode ter sido decorrente da ausência de fatores de transcrição do tipo *ASR* em *A. thaliana*.

Deste modo, as futuras ações para complementar os resultados deste trabalho compreendem, primeiramente, repetir os testes de toxicidade do Al^{3+} com linhagens de plantas contendo *OsASR5* sem a proteína de fusão YFP; complementar plantas de *A. thaliana* mutadas para gene *AtSTOP1* (*knock-out*) com *OsASR5*, para verificar a presença ou ausência de fenótipo de tolerância; e, por fim, repetir o experimento de transativação para obter dados com confiança estatisticamente significativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v. 110, n. 2, p. 205-213, 1995/09/15/ 1995. ISSN 0168-9452.

ARENHART R.A., BUCKER-NETO L., MARGIS R., WANG ZY., MARGIS-PINHEIRO M. Rice Arsenal Against Aluminum Toxicity. In: Panda S., Baluška F. (eds) Aluminum Stress Adaptation in Plants. Signaling and Communication in Plants, vol 24. 2015. Springer, Cham.

ARENHART, R. A. Análise funcional dos genes ASR - Abscisic acid, Stress and Ripening - de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta ao estresse por alumínio. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

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

ARENHART, R. A.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. The rice ASR5 protein: a putative role in the response to aluminum photosynthesis disturbance. **Plant Signal Behav**, v. 7, n. 10, p. 1263-6, Oct 2012. ISSN 1559-2324.

BAZARGANI, M. M. et al. A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. **J Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1959-73, Sep 2011. ISSN 1876-7737.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**, v. 16, n. 6, p. 735-43, Dec 1998. ISSN 0960-7412.

EARLEY, K. W. et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. **Plant J**, v. 45, n. 4, p. 616-29, Feb 2006. ISSN 0960-7412.

GOLDGUR, Y. et al. Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. **Plant Physiol**, v. 143, n. 2, p. 617-28, Feb 2007. ISSN 0032-0889.

HUANG, C. F. et al. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell**, v. 21, n. 2, p. 655-67, Feb 2009. ISSN 1040-4651.

IUSEM, N. D. et al. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. **Plant Physiol**, v. 102, n. 4, p. 1353-4, Aug 1993. ISSN 0032-0889.

KOBAYASHI, Y. et al. STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in Arabidopsis. **Mol Plant**, v. 7, n. 2, p. 311-22, Feb 2014. ISSN 1752-9867.

KOCHIAN, L. V. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

LEE, L. Y. et al. Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells. **Plant Methods**, v. 4, p. 24, Oct 2008. ISSN 1746-4811.

LI, J. et al. OsASR5 enhances drought tolerance through a stomatal closure pathway associated with ABA and H₂O₂ signalling in rice. **Plant Biotechnology Journal**, Hoboken, v. 15, n. 2, p. 183-196.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Sci**, v. 6, n. 6, p. 273-8, Jun 2001. ISSN 1360-1385.

MACHADO, P. L. O. D. A. **Consideracoes gerais sobre a toxicidade do aluminio nas plantas**. EMBRAPA-CNPS: Embrapa Solos (CNPS): 22 p. 1997.

NETO, L. B. Estudo do fator de transcrição ASR5 em plantas de arroz (*Oryza sativa*) e identificação de proteínas em resposta ao estresse por alumínio em *Arabidopsis thaliana*. Tese de Doutorado (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – UFRGS. Rio Grande do Sul, 2014.

OHYAMA, Y. et al. Characterization of AtSTOP1 orthologous genes in tobacco and other plant species. **Plant Physiol**, v. 162, n. 4, p. 1937-46, Aug 2013. ISSN 1532-2548.

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signal Behav**, v. 4, n. 7, p. 592-7, Jul 2009. ISSN 1559-2324.

RICCARDI, F. et al. Protein changes in response to progressive water deficit in maize . Quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiol**, v. 117, n. 4, p. 1253-63, Aug 1998. ISSN 1532-2548.

SAUMONNEAU, A. et al. Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. **FEBS Lett**, v. 582, n. 23-24, p. 3281-7, Oct 2008. ISSN 0014-5793.

SUGIHARTO, B. et al. Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. **Plant Cell Physiol**, v. 43, n. 3, p. 350-4, Mar 2002. ISSN 0032-0781.

VAIDYANATHAN, R.; KURUVILLA, S.; THOMAS, G. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. **Plant Science**, v. 140, n. 1, p. 21-30, 1999/01/04/ 1999. ISSN 0168-9452.

WAN, J. X. et al. Xyloglucan Fucosylation Modulates Arabidopsis Cell Wall Hemicellulose Aluminium binding Capacity. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 428, Jan 2018. ISSN 2045-2322.

WU, F. H. et al. Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. **Plant Methods**, v. 5, p. 16, Nov 2009. ISSN 1746-4811.

XIA, J. et al. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18381-18385, 10/11 2010. ISSN 0027-8424/1091-6490.

YANG, C. Y. et al. A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 139, n. 2, p. 836-46, Oct 2005. ISSN 0032-0889.

YANG, C. Y. et al. The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in Arabidopsis. **Protoplasma**, v. 233, n. 3-4, p. 241-54, Nov 2008. ISSN 0033-183X.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA JIAN, F. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. **The Plant Journal**, v. 68, n. 6, p. 1061-1069, 2011/12/01 2011. ISSN 0960-7412.