

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *OsbHLH35* E DOS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DE SUA EXPRESSÃO

LEILA SPAGNOLO FONINI

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências – Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia M. A. N. P. Margis.

PORTO ALEGRE
SETEMBRO DE 2017

CIP - Catalogação na Publicação

FONINI, LEILA SPAGNOLO
Caracterização do gene Osbhlh35 e dos fatores de
transcrição envolvidos na regulação de sua expressão /
LEILA SPAGNOLO FONINI. -- 2017.
188 f.
Orientadora: Márcia Maria Auxiliadora Nashenveng
Pinheiro Margis.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Biologia Molecular. I. Nashenveng Pinheiro
Margis, Márcia Maria Auxiliadora, orient. II. Título.

INSTITUIÇÕES

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Porto Alegre, Brasil), no “*Plant Gene Regulation Laboratory - Genomics of Plant Stress (GPlantS) Unit*” do Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier (ITQB), da Universidade Nova de Lisboa (Oeiras, Portugal), e no Instituto Gulbenkian de Ciência - *Calouste Gulbenkian Foundation* (Oeiras, Portugal).

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brasil) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (Portugal).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
1. As Espécies Reativas de Oxigênio	11
1.1. As Espécies Reativas de Oxigênio como agentes causadores de estresses	12
1.1.1. As EROs e os danos aos ácidos nucleicos	13
1.1.2. As EROs e os danos aos lipídios	14
1.1.3. As ERO e os danos às proteínas	15
1.1.4. As ERO e os danos aos carboidratos	15
1.2. O papel das Espécies Reativas de Oxigênio na sinalização celular	16
2. Fatores de transcrição nas respostas a ERO	18
3. Mecanismos de controle dos níveis de ERO	20
3.1. As Peroxidases	22
3.1.1. As Ascorbato Peroxidases	22
OBJETIVOS	26
MATERIAIS E MÉTODOS	28
1. Análise de expressão do gene <i>OshHLH35</i>	28
1.1. Material vegetal e tratamentos	28
1.2. Extração de RNA, síntese de cDNA e experimentos de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	29
1.3. Análise de experimentos de microarranjo	30
2. Clonagem dos fatores de transcrição	31
3. Obtenção de plantas superexpressando <i>OshHLH35</i> e <i>OsgRF11</i>	32
3.1. Obtenção dos plasmídeos e transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	32
3.2. Indução e subcultivo de calos embriogênicos	33
3.3. Transformação de calos embriogênicos de arroz	34
4. Análise de plantas mutantes e silenciadas via RNAi	35
5. Experimentos de mono-híbrido em levedura	36
6. Experimentos de transativação em protoplastos	39
CAPÍTULO 1 - Caracterização do fator de transcrição <i>OshHLH35</i>	45
1. Os Fatores de Transcrição bHLH	46
2. Resultados	52
2.1. Padrão de expressão do gene <i>OshHLH35</i>	52
2.1.1. Variação da expressão relativa de <i>OshHLH35</i> ao longo do dia	52
2.1.2. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta à salinidade	54
2.1.3. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta à dessecação	56
2.1.4. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta à exposição ao ABA	58
2.1.5. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta ao frio	60
2.1.6. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta ao estresse mecânico ...	62
2.1.7. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta à exposição à luz UV-B	63
2.1.8. Expressão relativa de <i>OshHLH35</i> em resposta à aplicação de peróxido de hidrogênio exógeno.....	64
2.1.9. Avaliação da expressão do gene <i>OshHLH35</i> em experimentos de microarranjo, em resposta à dessecação, salinidade elevada e frio	65
2.2. Geração de plantas de arroz superexpressando <i>OshHLH35</i>	66
2.3. Análise de plantas <i>nocaut</i> para o gene <i>OshHLH35</i>	69
3. Discussão	72

CAPÍTULO 2 - Caracterização dos fatores de transcrição reguladores da expressão de <i>OsbHLH35</i> em arroz	75
1. Os fatores de transcrição GRF	76
2. O fator de transcrição IDEF1	81
3. Resultados	84
3.1. Identificação de <i>cis</i> -elementos no promotor de <i>OsbHLH35</i>	84
3.2. Confirmação da ligação dos Fatores de Transcrição GRF ao promotor de <i>OsbHLH35</i>	85
3.3. Análise da ação dos FTs na transcrição de <i>OsbHLH35</i> por meio de ensaios de transativação em protoplastos	89
3.4. Análise de plantas de arroz duplamente silenciadas nos genes <i>OsGRF3</i> e <i>OsGRF4</i>	91
3.5. Geração de plantas de arroz superexpressando <i>OsGRF11</i>	94
4. Discussão	97
4.1. GRF	97
4.2. IDEF1	99
CAPÍTULO 3 - Caracterização evolutiva da família de fatores de transcrição GRF	101
1. Introdução	102
2. Artigo: "Molecular evolution and diversification of GRF transcription factor family"	104
DISCUSSÃO GERAL	158
BIBLIOGRAFIA	162
Anexo 1 - Lista de primers	182
Anexo 2 - Soluções e meios de cultura para arroz	183
CURRÍCULO	185

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI - Ácidos graxos poli-insaturados
AP2/EREBP - Apetala 2/Ethylene-responsive element binding protein
APX - Ascorbato peroxidase
Asc - ascorbato
ASH - ácido ascórbico
bHLH - Basic helix-loop-helix
bZIP - Basic Leucine Zipper
CAT - Catalase
CM - Complete minimal (meio de cultura)
DHA - Dehidroascorbato
DHAR - Deidroascorbato redutase
DREB1/CBF - Dehydration-responsive element-binding protein / C-repeat binding factors
ERO - Espécies reativas de oxigênio
FT - Fator de transcrição
GOPX - Guaiacol peroxidase
GPX - Glutathione peroxidase
GR - Glutathione reductase
GRF - Growth regulating factor
GRX - Glutathione reductase
GSH - glutathione
GSSG - dissulfeto de glutathione
GST - Glutathione-S-transferase
HB - homeobox
HD - Homeodomain
HSF - Heat shock factors
IDEF1 - Iron Deficiency-responsive Element-binding Factor 1
MAPK - Mitogen-activated protein kinase
MDHA - monodehidroascorbato
MDHAR - Monodeidroascorbato redutase
MDHAR - monodehidroascorbato redutase
MYB - Myeloblastosis
NPR1 - Non-Expresser of Pathogenesis Related Gene 1
OXI1 - Oxidative signal-inducible1
PA - Ácido fosfatídico
RNAi - RNA de interferência ou interferente
SOD - Superóxido dismutase
SWI2/SNF2 - SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TCP - TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PROLIFERATING CELL FACTOR1
TRX - Tiorredoxina
WRKY - WRKY transcription factor family

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 - Esquema das transformações nos experimentos de transativação

Figura 1 - Formação de diferentes Espécies Reativas de Oxigênio a partir do oxigênio atmosférico.

Figura 2 - O ciclo ascorbato-glutationa.

Figura 3 - Obtenção de plantas de arroz ssp. Japonica cv. Nipponbare a partir de calos embriogênicos.

Figura 4 - Representação tridimensional do dímero bHLH ligado ao DNA

Figura 5 - Conservação dos domínios bHLH em animais, plantas e fungos.

Figura 6 - Variação da expressão do gene *OsHLH035* durante o dia em condições normais.

Figura 7 - Expressão relativa do gene *bHLH035* sob estresse salino.

Figura 8 - Expressão relativa do gene *OsHLH035* sob estresse de dessecação.

Figura 9 - Expressão relativa do gene *OsHLH035* após tratamento com ABA.

Figura 10 - Expressão relativa do gene *OsHLH035* em plantas mantidas a 10° C.

Figura 11 - Expressão relativa do gene *OsHLH035* em plântulas submetidas a estresse mecânico.

Figura 12 - Expressão relativa do gene *OsHLH35* após exposição à luz UV-B.

Figura 13 - Expressão relativa do gene *bHLH35* em resposta à aplicação de peróxido de hidrogênio exógeno.

Figura 14 - Expressão do gene *OsHLH35* em resposta à dessecação, à salinidade e ao frio.

Figura 15 - Plantas representativas em diferentes estágios de desenvolvimento

Figura 16 - Plantas representativas em diferentes momentos de desenvolvimento

Figura 17 - Plantas superexpressando *OsHLH35*

Figura 18 - Plantas PFG_2D-10137.L e WT

Figura 19 - Plantas PFG_2D-10137.L e WT

Figura 20 - Região de 1600pb da sequência promotora de *OsHLH35*

Figura 21 - Teste de interação da isca F1.2 com GRFs

Figura 22 - Teste de interação da isca F2 com GRFs

Figura 23 - Ensaio de titulação da interação de GRFs com a isca F2.

Figura 24 - Experimento de transativação do promotor do gene *bHLH035* pelo fator de transcrição GRF11

Figura 25 - Experimento de transativação do promotor do gene *bHLH035* pelo fator de transcrição IDEF1

Figura 26 - Produção de panículas nas plantas RNAi *OsGRF3-OsGRF4* e WT.

Figura 27 - Sementes de plantas de arroz RNAi *OsGRF3-GRF4* e Nipponbare WT.

Figura 28 - Panículas das plantas WT e RNAi *OsGRF3-OsGRF4*

Figura 29 - Plantas superexpressando *OsGRF11*

Figura 30 - Plantas superexpressando *OsGRF11*

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são subprodutos usuais do metabolismo aeróbico e estão envolvidas em rotas de transdução de sinal, porém, podem reagir com macromoléculas biológicas causando danos celulares. Portanto, seus níveis devem ser estritamente controlados. Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que plantas silenciadas nas ascorbato peroxidases citosólicas, APX1 e APX2, possuem níveis aumentados de H₂O₂, entretanto, essas plantas não apresentam fenótipos de estresse, sugerindo que existe um mecanismo de compensação à diminuição da atividade de APX. Análises de transcriptoma mostraram a expressão diferencial de 58 genes, entre eles, o gene *Os**b**H**L**H35* teve sua expressão induzida nessas plantas. A caracterização funcional dos genes diferencialmente expressos nessas plantas contendo níveis alterados de peróxido de hidrogênio pode revelar os mecanismos compensatórios induzidos nessas plantas que permitem que as mesmas se desenvolvam normalmente. Além disso, o estudo da regulação da expressão desses genes diferencialmente expressos pode permitir entender como a alteração do estado redox da célula é percebido e transduzido. Dessa maneira, o gene *Os**b**H**L**H35* foi caracterizado funcionalmente, assim como os fatores de transcrição que regulam a sua expressão, visando a contribuir para a elucidação dos mecanismos de defesa sinalizados pelo peróxido de hidrogênio. A expressão do gene *Os**b**H**L**H35* foi avaliada em resposta a diferentes estresses, tendo sido demonstrada a modulação de sua expressão em resposta à salinidade, à dessecação, ao ABA, à luz UV-B, ao H₂O₂, e ao frio. No intuito de identificar os fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão do gene *Os**b**H**L**H35*, um fragmento do promotor foi submetido a experimentos de mono-híbrido em levedura e foram identificados quatro fatores de transcrição como reguladores putativos da sua expressão, OsGRF3, OsGRF4, OsGRF11 e IDEF1. A ligação dos fatores de transcrição ao promotor de *Os**b**H**L**H35* foi confirmada em ensaios de mono-híbrido, e OsGRF11 foi capaz de reprimir a transcrição do gene repórter em ensaios de transativação. A análise de plantas silenciadas via RNAi nos genes OsGRF3 e OsGRF4 revelou que, além de tamanho reduzido, essas plantas produzem menor número de panículas que as plantas WT. Além disso, plantas superexpressando *Os**b**H**L**H35* e *OsGRF11* foram geradas. Até o momento, as plantas atingiram a fase de florescimento, no entanto, não produziram sementes. O estudo da história evolutiva da família GRF em Viridiplantae revelou que essa família existe pelo menos desde as algas carófitas, tendo sofrido uma expansão nas plantas terrestres, principalmente com duplicações nos ancestrais das monocotiledôneas e das eudicotiledôneas, e que eventos de WGD tiveram importância na expansão dessa família. Além disso, sugerimos a origem do GRF ancestral a partir da subunidade SNF2 do complexo de remodelamento da cromatina SWI2/SNF2, provavelmente em uma duplicação no ancestral das carófitas.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are common byproducts of aerobic metabolism and are involved in signal transduction pathways; however, they may react with biological macromolecules causing cellular damage. Therefore, their levels should be strictly controlled. Previous studies of our group have shown that plants silenced in the ascorbate cytosolic peroxidases, APX1 and APX2, have increased levels of H₂O₂. However, these plants do not present stress phenotypes, suggesting that there is a mechanism of compensation for the decrease in APX activity. Transcriptome analyses showed the differential expression of 58 genes, among them, the *OsbHLH35* gene had its expression induced in these plants. The functional characterization of genes differentially expressed in these plants, containing altered levels of hydrogen peroxide, may reveal the compensatory mechanisms induced in the plants that allow them to develop normally. Also, the study of the regulation of the expression of these differentially expressed genes may allow understanding how alteration of the redox state of the cell is perceived and transduced. In this way, the *OsbHLH35* gene was functionally characterized, as well as the transcription factors that regulate its expression, aiming to contribute to the elucidation of the defense mechanisms signaled by hydrogen peroxide. Expression of the *OsbHLH35* gene was evaluated in response to different stresses, modulating its expression in response to salinity, desiccation, ABA, UV-B light, H₂O₂, and cold. To identify the transcription factors responsible for the regulation of *OsbHLH35* expression, a fragment of its promoter was used in yeast one-hybrid assays. Four transcription factors were identified as putative regulators of its expression, OsGRF3, OsGRF4, OsGRF11, and IDEF1. Binding of the transcription factors to the *OsbHLH35* promoter was confirmed in yeast one-hybrid assays, and OsGRF11 was able to repress the transcription of the reporter gene in transactivation assays. The analysis of plants silenced by RNAi in the genes *OsGRF3* and *OsGRF4* revealed that, in addition to reduced size, these plants produce fewer panicles than WT plants. Also, we generated plants overexpressing *OsbHLH35* and *OsGRF11*. So far, the plants have reached the flowering stage; however, they have not produced seeds. The study of the evolutionary history of the GRF family in Viridiplantae revealed that this family existed at least since charophyte algae, having undergone an expansion in land plants, mainly with duplications in the ancestors of monocots and eudicots, and that events of WGD were important for the expansion of this family. In addition, we suggested the origin of the ancestral GRF from the SNF2 subunit of the remodeling complex SWI2/SNF2, probably in a duplication in the ancestor of the charophytes.

INTRODUÇÃO

1. As Espécies Reativas de Oxigênio

A introdução do oxigênio molecular (O_2) na atmosfera terrestre conferiu uma vantagem adaptativa aos organismos aeróbios, que utilizam O_2 como aceptor final de elétrons, proporcionando uma maior produção de energia em comparação com outros processos como a fermentação e a respiração anaeróbia. Porém, junto com o oxigênio atmosférico, surgiram formas parcialmente reduzidas ou oxidadas, conhecidas como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (SCANDALIOS, 1993, 2005).

As ERO são subprodutos do metabolismo aeróbico; entretanto, possuem a capacidade de reagir com macromoléculas biológicas tais como os ácidos nucleicos, as proteínas, os lipídios e os carboidratos. Por se tratarem de compostos extremamente reativos, sua concentração nas células deve permanecer controlada a fim de evitar danos às macromoléculas biológicas (GECHEV *et al.*, 2006).

As ERO apresentam diferentes formas de produção e de reatividade com compostos biológicos. O oxigênio atmosférico (O_2) é excitado ou reduzido, formando o oxigênio singleto (1O_2) e o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), respectivamente. O superóxido pode sofrer dismutação, formando o íon peróxido (O_2^{2-}) ou pode ser protonado, formando o radical peridroxil (HO_2^{\cdot}). O peróxido é protonado formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, por meio da reação de Fenton, pode reagir com o ferro (Fe^{2+}) dando origem ao radical hidroxil (OH^{\cdot}) (Figura 1). Por essa razão, o ferro livre na forma Fe^{2+} é considerado determinante na toxicidade derivada das ERO (FOYER & NOCTOR, 2013; MITTLER, 2017).

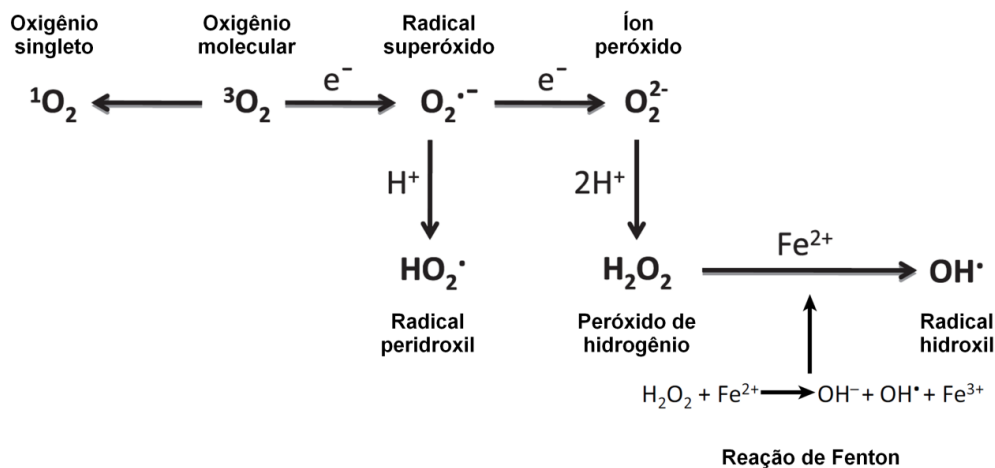


Figura 1 - Formação de diferentes Espécies Reativas de Oxigênio a partir do oxigênio atmosférico. Adaptado de (GILL & TUTEJA, 2010; MITTLER, 2017).

Quanto às propriedades reativas, esses compostos apresentam diferentes tempos de meia-vida e se deslocam de forma desigual. O radical superóxido e o oxigênio singlete possuem tempo de meia-vida de 1 a 4 μs e são capazes de migrar à distância de 30nm. Enquanto o superóxido reage principalmente com proteínas, o oxigênio singlete é capaz de oxidar lipídios, proteínas e resíduos de Guanina no DNA. O tempo de meia vida do radical hidroxil é de 1ns. Ele pode se deslocar por 1nm e é extremamente reativo com todas as biomoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, possui um tempo de vida maior que 1 ms, e pode se deslocar a distâncias maiores que 1 μm , reagindo com proteínas e com o DNA (GECHEV *et al.*, 2006; MITTLER, 2017).

1.1. As Espécies Reativas de Oxigênio como agentes causadores de estresses

As ERO são continuamente produzidas pelo metabolismo aeróbico normal; porém, sabe-se que a produção desses compostos é acelerada em resposta a condições ambientais adversas, como a exposição a altas doses de radiação ultravioleta, a herbicidas, a toxinas, a temperaturas extremas, e também durante o processo de senescência, em fermentos, e na defesa contra

o ataque de patógenos (MACH & GREENBERG, 2004; MITTLER *et al.*, 2004; SCANDALIOS, 2005).

As ERO são geradas principalmente nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nos peroxissomos das plantas, sendo que seus níveis precisam ser estritamente controlados para evitar o acúmulo excessivo desses compostos nas células. Esse controle é desempenhado por uma grande rede que envolve a detecção das ERO, a ativação de cascatas de sinalização e a modulação de processos de desenvolvimento e de crescimento. Portanto, é necessário um equilíbrio adequado entre a produção, a percepção e a remoção de ERO nos diferentes compartimentos celulares das plantas, evitando que essas moléculas causem danos ao DNA, ao RNA, às proteínas e às membranas, conhecidos coletivamente como estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006; MITTLER, 2017; MITTLER *et al.*, 2004, 2011).

1.1.1. As ERO e os danos aos ácidos nucleicos

A reação das ERO com nucleosídeos, nucleotídeos e nucleobases livres ou com oligonucleotídeos pode gerar diversas modificações aos ácidos nucleicos, podendo reagir diretamente ou de forma indireta, por meio de subprodutos de outras reações de oxidação (FIMOGNARI, 2015; HALLIWELL, 2006).

O radical hidroxil é a espécie mais reativa e a conversão de guanina a 8-hidroxi-guanosina é a modificação mais comum (FLEMING *et al.*, 2015; MØLLER *et al.*, 2007; WISEMAN & HALLIWELL, 1996). A formação de 8-hidroxi-guanosina pode alterar a informação genética, na medida em que realiza pareamento incorreto com adenina, a uma eficiência similar ao pareamento com citosina, podendo causar erros a nível transcricional (NEELEY & ESSIGMANN, 2006). O $^1\text{O}_2$ também ataca principalmente a guanina, já o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ não reagem com ácidos nucleicos (MØLLER *et al.* 2007). Outras modificações envolvem alterações em riboses, excisão de bases e quebra de fitas de RNA (FIMOGNARI, 2015) e de DNA, geração de sítios AP e modificação de purinas ou pirimidinas (WISEMAN & HALLIWELL, 1996). As modificações indiretas envolvem a conjugação da guanina com o malondialdeído, produto da peroxidação dos AGPI. Além disso, pode haver

mudanças na metilação de citosinas, o que leva a modificações na regulação da expressão gênica (HALLIWELL, 2006).

O dano oxidativo ao DNA mitocondrial foi detectado em níveis superiores àqueles encontrados no DNA nuclear. As ERO são produzidas em grande quantidade pelas mitocôndrias, sendo assim, é de se esperar que seu DNA seja danificado. Além da proximidade da fonte geradora de ERO, a falta de histonas para proteger o DNA e o reparo ineficiente também podem explicar a incidência elevada de danos ao DNA mitocondrial (WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

1.1.2. As ERO e os danos aos lipídios

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) compreendem os principais componentes das membranas celulares e são suscetíveis à ação das ERO, já que possuem múltiplas duplas ligações (NORDBERG & ARNÉR, 2001). A peroxidação lipídica é considerada um dos processos mais danosos às células, sendo que o efeito principal dessa reação é o aumento da fluidez das membranas – permitindo a passagem de substâncias que, em condições normais, somente a atravessariam através de canais específicos –, além de causar danos secundários a proteínas, a receptores e a canais iônicos (GILL & TUTTEJA, 2010).

O processo de peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que envolve três diferentes estágios: a iniciação; a propagação; e a terminação. A iniciação pode acontecer por meio da reação com o superóxido, o peróxido de hidrogênio ou o radical hidroxil, e ocorre com a retirada de um átomo de hidrogênio de um AGPI, originando um radical lipídico (R^{\cdot}). O radical formado irá reagir com o oxigênio molecular na fase de propagação, formando o radical peroxil lipídico (ROO^{\cdot}). O radical peroxil lipídico pode iniciar uma reação em cadeia de peroxidação lipídica, retirando átomos de hidrogênio de cadeias adjacentes de AGPI, ou se decompor formando espécies reativas, tais como os radicais alcóxil lipídicos, os malondialdeídos, os alcanos, os epóxidos lipídicos e os álcoois. Esses produtos secundários da peroxidação lipídica são capazes de reagir com outras moléculas como DNA e proteínas, propagando os danos celulares. No passo de terminação, os radicais lipídicos formados reagem entre

si originando dímeros não reativos (GILL & TUTEJA, 2010; MØLLER *et al.*, 2007).

1.1.3. As ERO e os danos às proteínas

Os danos decorrentes da ação de ERO ou de seus subprodutos envolvem a oxidação das proteínas, definida pelas modificações covalentes na sua estrutura. Essas modificações podem ter sérias consequências, tais como a perda do sítio catalítico, a inibição de determinada atividade enzimática, a agregação proteica e a proteólise (SHACTER, 2000).

Uma decorrência direta da oxidação das cadeias de aminoácidos é a carbonilação proteica (SHRINGARPURE & DAVIES, 2002), sendo a modificação mais comum nas proteínas (MØLLER *et al.*, 2007), ocorrendo particularmente com os resíduos Arginina, Histidina, Lisina, Prolina, Treonina e Triptofano (MØLLER *et al.*, 2007).

A oxidação das proteínas pode ocorrer de diversas formas, sendo que, de maneira geral, esse mecanismo é irreversível (GHEZZI & BONETTO, 2003). Sabe-se que determinados aminoácidos aumentam a suscetibilidade ao ataque proteolítico, particularmente aqueles com a presença de enxofre e de grupamentos tiol. Especificamente, demonstrou-se que o radical $\cdot\text{OH}$ reage rapidamente com aminoácidos, sendo que os mais reativos são Cisteína, Metionina, Triptofano, Tirosina, e Fenilalanina. O $^1\text{O}_2$, por sua vez, reage com os aminoácidos Triptofano, Histidina, Tirosina, Metionina e Cisteína (XU & CHANCE, 2005). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ interage com os centros Fe-S, e o H_2O_2 com cisteínas (HALLIWELL, 2006). Além disso, as proteínas podem ser danificadas pela reação com subprodutos da peroxidação lipídica (MILLAR & LEAVER, 2000; WINGER *et al.*, 2007).

1.1.4. As ERO e os danos aos carboidratos

As ERO são conhecidas por atuarem na despolimerização de polissacarídeos, alterando as funções dessas moléculas (DUAN & KASPER, 2011). O acúmulo de espécies como o radical hidroxil, assim como a combinação de ascorbato e H_2O_2 pode levar à quebra de polissacarídeos,

enquanto que os radicais O_2^- , HO_2^- e 1O_2 não reagem com carboidratos. Além disso, demonstrou-se que o radical $\cdot OH$ reage com carboidratos, retirando um átomo de hidrogênio antes ligado a um carbono e levando à quebra de ligações glicosídicas (FRY, 1998; MUELLER *et al.*, 2009).

Em plantas, carboidratos como a celulose, as hemiceluloses e a pectina são os principais formadores da parede celular durante o crescimento. Portanto, a manutenção desses carboidratos é um importante requisito para a integridade dessa estrutura (HERRON *et al.*, 2000). Porém, a hidrólise dos polissacarídeos leva ao afrouxamento da parede celular, que é um processo crucial para a germinação, para o crescimento e para o amadurecimento do fruto. Sendo assim, a despeito do efeito danoso das ERO elas podem ser importantes em processos de crescimento e de desenvolvimento vegetal (DUAN & KASPER, 2011; MÜLLER *et al.*, 2009; PRASANNA *et al.*, 2007).

1.2. O papel das Espécies Reativas de Oxigênio na sinalização celular

Devido a sua presença durante o estresse, as ERO já foram consideradas unicamente como moléculas prejudiciais; porém, atualmente existe um consenso de que esses compostos são vitais para o crescimento e para o desenvolvimento das plantas e que participam de complexas cascatas de sinalização na célula, atuando em resposta a estresses e durante a interação com outros organismos, garantindo respostas adequadas às mudanças ambientais (FOYER & NOCTOR, 2013, 2016; GILROY *et al.*, 2016; KÖNIG *et al.*, 2012; MIGNOLETA-PRUYT *et al.*, 2016; MITTLER *et al.*, 2004, 2011; NOCTOR & FOYER, 2016; SUZUKI *et al.*, 2011, 2012; VAAHTERA *et al.*, 2014).

Sabe-se que diferentes estresses levam ao aumento da produção de ERO e que o balanço entre a produção e a remoção desses compostos é essencial à homeostase redox. A resposta a esses compostos é iniciada quando uma planta reconhece o estresse em nível celular por meio de receptores específicos, fatores de transcrição sensíveis a ERO, quinases e fosfatases. A detecção por receptores resulta na geração de sinais de Ca^{2+} e na ativação das fosfolipases, que geram ácido fosfatídico (PA). Ca^{2+} e PA ativam a proteína quinase OXI1, resultando na ativação da cascata das

proteínas quinases (MAPK) e na regulação de fatores de transcrição que atuam na produção ou na remoção de ERO. A inibição de fosfatases pelas ERO também pode ativar as quinases OXI1 e MAPK3 e 6. Por sua vez, as MAPK atuam na regulação de fatores de transcrição que ativam a expressão de elementos que atuam na remoção de ERO. De forma geral, o processo pode levar à amplificação do sinal para potencialização da defesa ou para a supressão das ERO (MITTLER, 2017; MITTLER *et al.*, 2004).

Estudos conduzidos em plantas e em animais indicam que as ERO regulam processos celulares normais. No passado, o processo de morte celular foi entendido como resultado do dano oxidativo, porém, a teoria mais aceita atualmente é de que a morte celular programada é uma consequência fisiológica dos processos de sinalização influenciados por ERO, tendo atuação no desenvolvimento, na diferenciação celular e em respostas imunes, por exemplo (VAN DOORN *et al.*, 2011; VAN HAUTEGEM *et al.*, 2015; VANDEN BERGHE *et al.*, 2014).

Em plantas, a morte celular programada é crucial em processos de desenvolvimento, como a fertilização, a embriogênese e a formação das folhas (BOLLHÖNER *et al.*, 2012; CHOI, 2013; DREWS & KOLTUNOW, 2011; GUNAWARDENA *et al.*, 2004). Entretanto, certas condições de estresse possuem a capacidade de induzir outro tipo de morte celular, como a necrose, em casos de estresses severos e prolongados como a alta salinidade, a seca, as deficiências nutricionais e os estresses bióticos (LIU *et al.*, 2009; MUSHEGIAN, 2017).

Há também outro tipo de morte celular, inicialmente descrito em células de mamíferos, conhecido como ferroptose. Este processo compreende uma forma de morte celular programada oxidativa, não apoptótica, dependente de ferro (DIXON *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2016). A produção de ERO na peroxidação lipídica e na Reação de Fenton, facilitada pelo ferro, são reconhecidos como mediadores centrais da ferroptose (DIXON *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2016). Em animais, esse processo é devido à perda de atividade da glutatona peroxidase 4 (GPX4) pela depleção de glutatona, o que leva ao acúmulo de ERO provenientes da peroxidação lipídica (XIE *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016).

Recentemente, foi demonstrado que esse processo também ocorre em plantas, sendo caracterizado pela depleção da glutathiona e do ácido ascórbico, além do acúmulo de ERO. Estudos funcionais mostram que esse processo pode ser desencadeado por choque térmico. Além disso, demonstrou-se que as ERO acumulam-se nas plântulas submetidas a esse estresse, e que o uso de inibidores da ferroptose previne o acúmulo dessas espécies reativas (CONLON & DIXON, 2017; DISTÉFANO *et al.*, 2017; MUSHEGIAN, 2017).

Nesse contexto, uma teoria recente sugere que as ERO são, na verdade, predominantemente benéficas, ativando vias de resposta a variações ambientais e promovendo processos biológicos, e que o estresse oxidativo seria resultado da ativação de vias de morte celular como a necrose e a ferroptose (MITTLER, 2017).

2. Fatores de transcrição nas respostas a ERO

Os genomas vegetais possuem uma grande proporção de genes que codificam proteínas associadas à regulação transcricional, como os fatores de transcrição gerais, que atuam na formação do complexo de pré-iniciação nos promotores; os cofatores, como os coativadores e os correpressores; as proteínas associadas à estrutura da cromatina; e os fatores de transcrição específicos, que podem ser ativadores ou repressores. Os fatores de transcrição específicos reconhecem elementos de controle da transcrição e são indiscriminadamente referidos como “*fatores de transcrição*” (GONZALEZ, 2016).

Atualmente, estão descritas 58 famílias de fatores de transcrição no reino Viridiplantae. De maneira geral, esses fatores são proteínas capazes de interagir com sequências específicas localizadas na região promotora dos genes, e podem ser classificados em diferentes famílias de acordo com a estrutura de seus domínios de ligação ao DNA (GONZALEZ, 2016). Além do domínio de ligação ao DNA, os fatores de transcrição podem possuir outros domínios responsáveis pela ativação ou pela repressão da transcrição, pela localização subcelular, e também pela interação com proteínas (GONZALEZ, 2016; HANNAPEL, 2016).

O controle transcricional de genes responsivos a estresses é crucial para garantir respostas adequadas a condições adversas. Por isso, a atividade dos fatores de transcrição deve ser rigorosamente controlada para regular a expressão gênica em um momento adequado de desenvolvimento e em resposta a estímulos ambientais (IWATA & KOIZUMI, 2016). De modo geral, a ação dos fatores de transcrição é regulada por mecanismos que envolvem a síntese, a localização subcelular e a atividade, que usualmente ocorre por meio da interação com outras proteínas ou devido a modificações pós-traducionais (GONZALEZ, 2016).

Diversas famílias de fatores de transcrição já foram caracterizadas e sabe-se que a atividade de algumas delas é diretamente regulada pelo estado redox. Um exemplo é a proteína NPR1 (Non-Expresser of Pathogenesis Related Gene 1), reguladora chave da resposta imune a patógenos dependente de Ácido salicílico (LOAKE & GRANT, 2007). Certos resíduos de cisteína, presentes em posições específicas nessa proteína, formam pontes dissulfeto entre si, resultando na criação de um oligômero citosólico, o que inibe o direcionamento de NPR1 ao núcleo. Porém, durante o ataque de patógenos, o oligômero é reduzido a monômeros pela ação de uma tiorredoxina, permitindo a translocação de NPR1 ao núcleo, onde atua como fator de transcrição (FT) (MOU *et al.*, 2003).

Alguns fatores da família bZIP também respondem a modificações redox. Já foi demonstrado que o peróxido de hidrogênio diminui a afinidade dos fatores bZIP16, bZIP68 e GBF1 pelos *cis*-elementos alvo (LI & LOAKE, 2016; SHAIKHALI *et al.*, 2012). Em animais, um resíduo de cisteína conservado em fatores de transcrição da família MYB atua como sensor redox e, em plantas, dois resíduos de cisteína em posições específicas nas proteínas MYB R2R3, Cys-49 e Cys-53, formam pontes dissulfeto em condições normais, impedindo a ligação ao DNA, o que é revertido em condições redutoras, indicando que essas proteínas são sensíveis a modificações redox (HEINE *et al.*, 2004).

Algumas proteínas da família Homeodomain (HD) também possuem cisteínas conservadas que, neste caso, atuam na dimerização dos domínios. Assim como os fatores MYB, os fatores HD necessitam de um ambiente redutor para que ocorra a ligação ao DNA (TRON *et al.*, 2002). O mesmo ocorre com membros da família TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA,

and PROLIFERATING CELL FACTOR1), cuja atividade de ligação é alterada pelo estado redox. Além disso, sabe-se que o resíduo de cisteína encontrado na posição 20 dos TCPs de classe I atuam como sensores redox (VIOLA *et al.*, 2013).

Além dos fatores de transcrição diretamente responsivos ao estado redox, existem diversas famílias que participam indiretamente de vias de sinalização em resposta a alterações redox (DIETZ, 2014). Entre essas famílias, AREB/ABF, MYB, AP2/EREBP, bZIP, MYC, HSF, DREB1/CBF, NAC, HB, NF-Y, WRKY, DREB e bHLH possuem membros bem caracterizadas quanto às respostas a estresses em plantas (BALDONI *et al.*, 2015; CASTILHOS *et al.*, 2014; DOSSA *et al.*, 2016; GIRI *et al.*, 2014; LIU & HOWELL, 2010; MA *et al.*, 2015; NAIKA *et al.*, 2013; SATO *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2016). Porém, certas famílias codificam uma infinidade de proteínas, muitas delas ainda não caracterizadas. Além do estudo funcional de fatores de transcrição responsivos a estresses, a identificação de motivos de ligação ao DNA se faz necessária para identificar os possíveis alvos transcricionais dessas importantes proteínas regulatórias.

3. Mecanismos de controle dos níveis de ERO

Os organismos aeróbicos desenvolveram dois meios principais de controle dos níveis de ERO: os mecanismos enzimáticos e os não enzimáticos. As plantas possuem quase todos os componentes que medeiam a homeostase redox e a sinalização de ERO em animais, além de enzimas adicionais. Entre os compostos enzimáticos presentes em plantas encontram-se a ascorbato peroxidase (APX); a catalase (CAT); a glutaciona peroxidase (GPX); a superóxido dismutase, (SOD); a glutaciona redutase (GR); a monodeidroascorbato redutase (MDHAR); a deidroascorbato redutase (DHAR); a guaiacol peroxidase (GOPX); a glutaciona-s-transferase (GST); as tioredoxinas (TRX); e as glutarredoxinas (GRX). Entre os compostos não enzimáticos estão o ácido ascórbico (ASH) ou, na forma ionizada, o ascorbato; a glutaciona (GSH); a prolina; os flavonoides; os carotenoides; e os α -tocoferóis (GILL & TUTEJA, 2010; HARRISON, 2017). Além desses compostos, também existem mecanismos de absorção e de armazenamento de ferro que podem

exercer controle sobre a disponibilidade de ferro livre para Reação de Fenton (MITTLER, 2017).

O ciclo ascorbato-glutationa é um mecanismo muito importante para a homeostase de ERO em plantas e compreende uma série de reações com o envolvimento de grande parte das enzimas antioxidantes. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser reduzido pela Ascorbato peroxidase (APX). Nesta reação, a forma reduzida do ascorbato (Asc) é oxidada a monodehidroascorbato (MDHA), que pode ser reduzido pela monodehidroascorbato redutase (MDHAR) a ascorbato ou, devido à sua instabilidade, pode gerar dehidroascorbato (DHA). O DHA é reduzido a ascorbato pela dehidroascorbato redutase (DHAR). Nesta reação, a forma reduzida da glutathiona (GSH) é oxidada a dissulfeto de glutathiona (GSSG). O GSSG é então reduzido pela glutathiona redutase (GR) à glutathiona (GSH). O aceptor de elétrons NADP é regenerado durante a redução de MDHA e GSSG. Portanto, além da concentração de ascorbato e de glutathiona, seus estados redox também são importantes para a homeostase redox (Figura 2) (ASADA, 1999; GILL & TUTEJA, 2010; NOCTOR & FOYER, 1998; SHIGEOKA *et al.*, 2002; ZECHMANN, 2014).

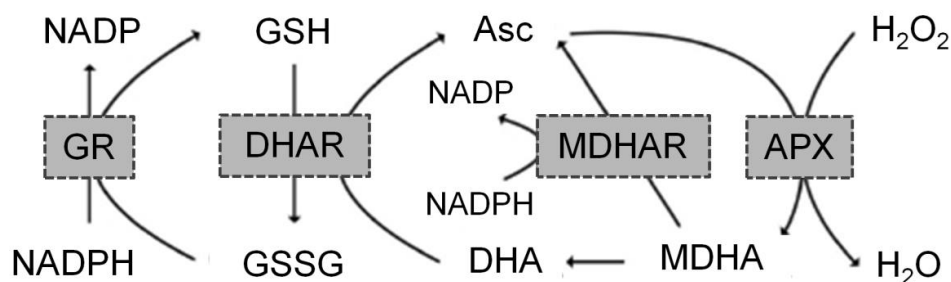


Figura 2 - O ciclo ascorbato-glutationa

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; APX – Ascorbato peroxidase; Asc - ascorbato; MDHA – monodehidroascorbato; MDHAR – monodehidroascorbato redutase; DHA – dehidroascorbato; DHAR – dehidroascorbato redutase; GSH – glutathiona reduzida; GSSG – dissulfeto de glutathiona; GR – glutathiona redutase; GSH - glutathiona (GSH); NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH - NADP reduzido. Adaptado de: (ZECHMANN, 2014).

3.1. As peroxidases

Peroxidases (EC 1.11.1.x) representam um grupo de enzimas codificadas por famílias multigênicas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio, oxidando uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. Essas enzimas são classificadas em peroxidases heme e peroxidases não-heme e estão envolvidas principalmente em vias de defesa e de desenvolvimento. Pelo seu papel multifuncional, sua atividade pode ser detectada em todas as etapas da vida de diversas plantas, desde a germinação da semente, até a senescência (FAWAL *et al.*, 2013; PASSARDI *et al.*, 2005).

Dentro do grupo das peroxidases heme existe um grupo de peroxidases não animais, divididas em quatro classes. A classe I compreende APX, citocromo – c peroxidase (CcP), catalase-peroxidase (CP), APX-CcP; a classe II, lignina-peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), peroxidase híbrida ou versátil (VP), e outras peroxidases de classe 2 (CII); a classe III compreende as peroxirredoxinas (Prx). Além dessas classes, há um quarto grupo contendo outras peroxidases não animais (NAnPrx) (FAWAL *et al.*, 2013).

3.1.1. As ascorbato peroxidases

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo funcional de diferentes enzimas da família das peroxidases, em especial as ascorbato peroxidases (APX) (CAVERZAN *et al.*, 2012, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

As ascorbato peroxidases (APX; RC 1.11.1.11) são heme peroxidases de Classe I, consideradas importantes enzimas detoxificadoras de ERO em plantas, algas, e outros organismos. Essas enzimas estão envolvidas na redução do peróxido de hidrogênio à água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons (ANJUM *et al.*, 2016; GILL & TUTEJA, 2010; LI *et al.*, 2007; MIYAKE & ASADA, 1996).

Diversas isoformas de APX já foram descritas em plantas como *Arabidopsis* (KUBO *et al.*, 1993), arroz (SATO *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2004, 2006), soja (CALDWELL *et al.*, 1998), ervilha (MITTLER & ZILINSKAS, 1992, 1994), espinafre (ISHIKAWA *et al.*, 1995), feijão-frade (D'ARCY-LAMETA

et al., 2006), eucalipto (TEIXEIRA *et al.*, 2005), tomate (NAJAMI *et al.*, 2008), entre outras. Essas diferentes isoformas de APX são classificadas de acordo com a sua localização subcelular, determinada pela presença de peptídeos sinal ou de domínios transmembrana. As formas solúveis são encontradas no citosol, na mitocôndria e nos estromas dos cloroplastos, enquanto que as isoformas ligadas a membranas localizam-se nos peroxissomos, nos glioxissomos e nos tilacoides cloroplastídicos (CAVERZAN *et al.*, 2012; SHIGEOKA *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2004, 2006).

O genoma do arroz codifica duas APX citosólicas, OsAPX1 e OsAPX2. Estudos funcionais demonstraram que o silenciamento de OsAPX1 ou de OsAPX2 individualmente, via RNA de interferência (RNAi), desencadeia alterações no desenvolvimento, enquanto que o duplo silenciamento dá origem a plantas com desenvolvimento normal, e que apresentam tolerância a concentrações tóxicas de alumínio (ROSA *et al.*, 2010).

O silenciamento via RNAi, utilizado nesses experimentos, requer uma região de pelo menos 21 nucleotídeos de correspondência entre o hairpin e o gene alvo para possibilitar o silenciamento (EAMENS *et al.*, 2008). Para o silenciamento de APX1 isoladamente foi utilizado um fragmento de 309 pb do gene, correspondendo a 15% de identidade com OsAPX2, enquanto que o silenciamento isolado de OsAPX2 foi obtido com um fragmento de 255 pb do gene, com 53% de identidade com OsAPX1. Quando comparados a outros membros de OsAPX, a identidade não ultrapassou 37% ou 8 bases idênticas. O silenciamento de OsAPX1 levou à redução da expressão de OsAPX4, OsAPX5 e OsAPX8, enquanto que o silenciamento de OsAPX2 levou à redução de expressão de OsAPX1 e OsAPX7. Análises bioquímicas mostraram uma redução na atividade total de APX tanto nas plantas silenciadas em OsAPX1 quanto nas plantas silenciadas em OsAXP2. Foram obtidas quatro linhagens independentes para cada construção, sendo que para ambas construções as plantas apresentaram atividade de SOD aumentada e atividade diminuída de CAT, o que sugere que o metabolismo antioxidante foi perturbado pelo silenciamento dos genes que codificam essas enzimas (ROSA *et al.*, 2010).

Para o silenciamento duplo de OsAPX1 e OsAPX2 foi utilizado um fragmento de 250 pb de OsAPX2, que apresenta 82% de similaridade com

OsAPX1. Esse fragmento contém uma região de 26 nt idêntica entre ambos os genes, o que permitiu o duplo silenciamento. Quando comparado às demais *OsAPX*, esse fragmento possui similaridade máxima de 60%, não ultrapassando 14 nucleotídeos idênticos contínuos. Para essa construção, foram obtidas 23 linhagens independentes. Nessas plantas, os níveis de mRNA de *OsAPX3* e *OsAPX5*, analisados por RT-qPCR, quase não foram detectados. *OsAPX4*, *OsAPX7* e *OsAPX8* tiveram uma redução de 20 a 70% na expressão, enquanto que *OsAPX6* foi a única isoforma cuja expressão parece não ter sido alterada em função do duplo silenciamento (ROSA *et al.*, 2010).

Análises bioquímicas mostraram uma redução da atividade de APX em torno de 40% nas plantas duplamente silenciadas; entretanto, não foi observado nenhum fenótipo de alteração de desenvolvimento. Isso poderia ser explicado pela ativação de um mecanismo de compensação, já que os níveis de SOD, CAT e AOX estavam aumentados nessas plantas. Além disso, foi observado um conteúdo mais elevado de ASA reduzido, além da diminuição nos níveis de subprodutos de oxidação lipídica, analisados por meio do ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), indicando que as plantas duplamente silenciadas possuíam níveis menores de oxidação lipídica do que as plantas não transformadas. Esses dados sugerem que existe um mecanismo compensatório sendo ativado nas plantas duplamente silenciadas nas APX citosólicas (ROSA *et al.*, 2010). Ainda, essas plantas se comportaram de maneira semelhante às plantas não transformadas frente a diferentes estresses como salinidade, calor, alta luminosidade e exposição ao metilviologênio. Análises bioquímicas mostraram que essas plantas possuem parâmetros de fixação fotossintética do CO₂ e de eficiência fotoquímica similares às plantas não transformadas, além de um aumento na atividade de GPX, CAT e guaiacol peroxidase. Esses dados reforçam a hipótese da existência de um mecanismo de compensação ao aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio (BONIFACIO *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos nesses estudos anteriores demonstram que essas plantas representam um importante instrumento para o estudo das rotas controladas pelas ERO. Baseado nisso, nosso grupo iniciou uma nova linha de pesquisa, em colaboração com pesquisadores do grupo *Genomics of Plant Stress* (GPlantS) do Instituto de Tecnologia Química e Biológica António

Xavier, em Portugal, visando ao estudo das rotas reguladas pelas ERO, assim como a interação entre essas diferentes vias durante o metabolismo normal e em resposta a estresses ambientais em monocotiledôneas.

No intuito de identificar as vias alteradas nas plantas duplamente silenciadas nas OsAPX1 e OsAPX2, nosso grupo realizou análises de expressão global por meio de experimentos de microarranjo e de proteômica. Nesses ensaios, foram identificados 58 genes diferencialmente expressos, dentre os quais 44 estavam sendo regulados positivamente, enquanto que os outros 14 estavam sendo regulados negativamente em resposta ao silenciamento das APX citosólicas. As principais vias afetadas foram a fotossíntese, o metabolismo antioxidante, e o metabolismo de carboidratos e de proteínas (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Uma das estratégias adotadas para o estudo de como o sinal produzido pelo aumento das ERO é percebido pela célula é a identificação e caracterização dos fatores de transcrição regulados por variações no estado redox na planta. Dentre os 58 genes diferencialmente expressos nas plantas duplamente silenciadas nas OsAPX1 e OsAPX2, alguns fatores de transcrição das famílias MYB, bHLH, NAM e WRKY tiveram sua expressão modulada. O gene que codifica a proteína OsbHLH35 (LOC_Os01g06640) apresentou-se bastante induzido nessas plantas (RIBEIRO *et al.*, 2012). Pelo fato de se tratar de um gene da família bHLH, sabidamente envolvida em respostas a estresses, e de ainda não ter sido caracterizado na literatura, esse gene foi selecionado para estudos posteriores. Além da caracterização do gene *OsbHLH35*, o projeto tem como objetivo a identificação e a caracterização de fatores de transcrição que regulam a expressão desse gene, pois esses também podem estar sendo modulados pelo estado redox.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a caracterização do fator de transcrição bHLH35 de arroz e dos fatores de transcrição responsáveis pela regulação da sua expressão.

Objetivos específicos:

- a. Avaliar os mecanismos de regulação da expressão de *OsbHLH35*.
- b. Caracterizar funcionalmente o fator de transcrição *OsbHLH35*.
- c. Confirmar o papel dos fatores de transcrição GRF3, GRF4, GRF11 e IDEF1 na regulação da expressão do gene *OsbHLH35*.
- d. Caracterizar funcionalmente os genes *GRF3*, *GRF4* e *GRF11*.
- e. Caracterizar evolutivamente a família de fatores de transcrição GRF.

Os resultados desta tese serão apresentados em três capítulos, abrangendo os objetivos específicos descritos anteriormente:

Capítulo 1 - Caracterização do fator de transcrição *OsbHLH35*

- a. Análise do padrão de expressão de *OsbHLH35* em condições de estresse abiótico.
- b. Análise de plantas *nocaut* para o gene *OsbHLH35*.
- c. Geração de plantas de arroz superexpressando *OsbHLH35*.

Capítulo 2 - Caracterização dos fatores de transcrição reguladores da expressão de *OsbHLH35*

- a. Identificação de possíveis *cis*-elementos alvo dos FTs previamente identificados no promotor do gene *OsbHLH35*.
- b. Confirmação da ligação de GRFs ao promotor de *OsbHLH35* por meio de mono-híbrido direto em levedura.

- c. Estudo da ação dos FTs na transcrição de *OsbHLH35* por meio de ensaios de transativação em protoplastos.
- d. Análise de plantas de arroz duplamente silenciadas nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4*.
- e. Geração de plantas de arroz superexpressando *OsGRF11*.

Capítulo 3 - Caracterização evolutiva da família de fatores de transcrição GRF

Capítulo redigido em formato de artigo científico.

- a. Identificação de genes em diferentes espécies de plantas.
- b. Análise filogenética da divergência entre GRF e SNF2.
- c. Avaliação da composição dos genes quanto aos domínios existentes.
- d. Avaliação da diversificação da família em Viridiplantae por meio de abordagem filogenética.
- e. Análise da estrutura gênica em arábida, arroz e *Physcomitrella patens*.
- f. Análise da conservação das sequências dos domínios.
- g. Busca por genes ortólogos e avaliação de duplicações.
- h. Predição *in silico* de genes alvos e identificação de processos biológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Análise de expressão do gene *OsbHLH35*

1.1. Material vegetal e tratamentos

Para os experimentos de exposição à luz UV-B, foram utilizadas plantas de arroz cv. Nipponbare, cultivadas a 28° C com fotoperíodo de 12/12h em potes com terra e permanentemente submersos em bandejas com água. Para o estresse de exposição à luz UV-B, as plantas foram irradiadas duas vezes durante 4 horas, com um intervalo de 20 horas entre as exposições. Após a segunda irradiação, as amostras foram coletadas imediatamente, e também após 6 e 24 horas. As plantas controle foram mantidas em condições normais, sem exposição à luz UV-B (RAUBER, 2012).

Para o estresse de exposição a H₂O₂ exógeno, as plantas foram cultivadas em meio MS e, após 4 semanas, transferidas para meio MS contendo 10 µM de H₂O₂ e incubadas durante 2, 4 e 8 horas, enquanto que as plantas controle permaneceram em meio MS sem adição de peróxido de hidrogênio (PASSAIA *et al.*, 2013).

Para os experimentos de estresse salino, mecânico, frio, exposição ao ABA, dessecação, plântulas de arroz foram cultivadas em meio hidropônico (YOSHIDA *et al.*, 1976) a 28° C, 700 µmol fótons m⁻²s⁻¹, 70% de umidade e fotoperíodo de 12 h / 12 h durante 14 dias. Um grupo de 10 plantas foi submetido a uma situação de estresse 4 horas após o amanhecer, enquanto que 10 plantas do grupo controle foram transferidas para novo meio de cultura em condições normais. Os tratamentos de frio foram realizados pela transferência das plantas para meio de cultura a 10° C e cultivadas a essa temperatura em câmara de crescimento. Para os tratamentos com sal e ABA, foram utilizados meios contendo 200 mM de NaCl ou 100 mM de ABA. O tratamento de dessecação consistiu em manter as plântulas sobre papel absorvente. O estresse mecânico consistiu em danificar as folhas e caules por dobramento e quebra (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

1.2. Extração de RNA, síntese de cDNA e experimentos de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Para os experimentos de luz UV-B e H₂O₂, as amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e estocadas a -80° C até a extração de RNA. Para cada amostra, foram utilizados 100 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído com 1 ml de Trizol (Invitrogen). Após misturar o material sob agitação vigorosa em vórtex, as amostras foram deixadas por 5 minutos à temperatura ambiente sem agitação. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas novamente em vórtex por 15 segundos. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos a 4° C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 500 µL de isopropanol e incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. O RNA total foi coletado por centrifugação a 12.000 g durante 10 minutos a 4° C, e lavado com 1 ml de etanol 70 %. Após a secagem do álcool, o RNA foi ressuspensionado em 40 µL de água MilliQ autoclavada.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit M-MLV Reserve Transcriptase (Promega). O RNA total foi tratado com DNase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A um mix contendo 1 µL de oligonucleotídeos Poli 24vt (0,5 µM) e 1 µL dNTP (10 µM), foi adicionado 1 µg de RNA tratado com DNase. A reação foi incubada a 65° C durante 5 minutos e então transferida para o gelo, onde permaneceu por mais 5 minutos. Em outro passo, foram adicionados 10 µl do tampão M-MLV 5x Reaction Buffer. As amostras foram homogeneizadas e foi adicionado 1 µl da enzima transcriptase reversa (M-MLV RT, 200 U/µl). Após incubação a 37° C durante 2 horas, o material foi transferido para banho a 70° C por 15 minutos. A reação foi diluída 10 vezes a um volume final de 500µl.

Para as reações de RT-qPCR, o cDNA foi diluído 10 vezes novamente, e as reações foram conduzidas com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene analisado. Os genes normalizadores utilizados foram FDH (formate dehydrogenase), EF1α (Elongation factor 1α) e Ubi (Ubiquitin fusion protein). As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando 2,5 ng/µL cDNA, 0,2 µM

de oligonucleotídeos direto e reverso, 0,1 mM of dNTPs, 1x PCR Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,1x Sybr Green e 0,25 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação a 94° C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94° C, 10 segundos a 60° C e 15 segundos a 72 ° C. A curva de *melting* foi realizada por desnaturação a 95° C durante 15 segundos, anelamento a 60° C durante 1 minuto, e leituras a cada aumento de 0,4° C até os 95° C. A avaliação da expressão relativa foi realizada de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e a análise estatística empregada foi o teste T de Student.

Para os experimentos de estresse salino, mecânico, frio, exposição ao ABA e dessecação, as amostras foram coletadas em nitrogênio líquido, estocadas a -80° C e o RNA total foi purificado utilizando o kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (FIGUEIREDO *et al.*, 2012). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) de acordo com as instruções do fabricante, com volume final de 100µl em água ultrapura autoclavada. As reações de RT-qPCR foram conduzidas no equipamento LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland), utilizando 10 µl de SyBr Green I Master mix (Roche, Basel, Switzerland), 0,4 µl de oligonucleotídeos direto e reverso a 25 µM, e 9,2 µl de cDNA para cada reação. As condições da PCR consistiram em um ciclo a 95° C por 5 minutos, 45 ciclos de amplificação de 95° C por 10 segundos, 60° C por 10 segundos e 72° C por 10 segundos. A avaliação da expressão relativa foi realizada de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e a análise estatística empregada foi o teste T de Student.

1.3. Análise de experimentos de microarranjo

A expressão do gene *OsbHLH35* foi avaliada em resposta a estresses (dessecação, salinidade e frio) a partir de dados provenientes de um experimento de microarranjo previamente publicado (JAIN *et al.*, 2007), disponibilizado pelo banco de dados Rice eFP Browser no sítio eletrônico <http://bar.utoronto.ca/efprice/cgi-bin/efpWeb.cgi> (PATEL *et al.*, 2012). Esses dados foram gerados a partir de experimentos de estresse nos quais foram

utilizadas sementes de arroz da subespécie Indica cv. IR64. As plântulas foram mantidas em água e cultivadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro. Para o tratamento com sal, plântulas de 7 dias foram mantidas em uma solução de 200 mM de NaCl durante 3 horas. Para a dessecação, plântulas de 7 dias foram dispostas entre duas folhas de papel absorvente por 3 horas. Como controle, plântulas foram mantidas em água por 3 horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para cada experimento, foram utilizadas três replicatas biológicas e as hibridizações foram conduzidas utilizando a tecnologia Affymetrix. Os resultados foram normalizados pelos métodos de RMA e MAS 5.0 (JAIN *et al.*, 2007).

2. Clonagem dos fatores de transcrição

As sequências codificadoras de bHLH35 e de IDEF1 foram amplificadas a partir de cDNA sintetizado utilizando RNA de raízes de plantas de arroz cv. Nipponbare com a enzima Phusion (Thermo Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. A sequência codificante de GRF11 foi amplificada a partir da biblioteca utilizada para os *screenings* de mono-híbrido em levedura com a enzima Phusion (Thermo Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. As amplificações foram verificadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos resultantes foram ligados no vetor pJET1.2 (Thermo Scientific) seguindo o protocolo padrão do fabricante e transformados em *E. coli* DH5 α por meio de choque térmico. Os plasmídeos foram extraídos utilizando kit de miniprep (NZYTech) de acordo com o protocolo do fabricante e confirmados por sequenciamento. Os fragmentos foram amplificados novamente a partir dos plasmídeos pJET1.2, com a enzima Phusion (Thermo Scientific) e clonados em pENTR SD/D-TOPO (Invitrogen) com o protocolo padrão do fabricante, utilizando de 0,5 a 2 μl de produto de PCR. Após confirmação por PCR, os clones positivos tiveram seus plasmídeos extraídos com kit de *miniprep* (NZYTech) e confirmados por sequenciamento.

Inúmeras tentativas de clonagem de *OsGRF3* e *OsGRF4* foram realizadas. A sequência de *GRF3* foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNA de plantas da cultivar Hazawi submetidas ao estresse de seca; porém, o sequenciamento de diferentes clones mostrou que o gene possuía mutações e,

portanto, não foi utilizado nos experimentos posteriores. Após o teste dos *primers* em gDNA, foram utilizadas amostras de cDNA provenientes de diversos tecidos tais como raízes, folhas, base da planta (contendo meristema), embriões embebidos em água, *pools* contendo amostras de tecidos variados, e de diferentes experimentos, tais como estresse salino, frio, germinação a baixas temperaturas, seca, assim como a utilização de diferentes bibliotecas de cDNA (frio, seca e salinidade). No entanto, essas tentativas não tiveram sucesso, e os experimentos seguintes foram realizados com os fatores de transcrição já clonados.

3. Obtenção de plantas superexpressando *Os*bHLH35 e *Os*GRF11

Diversos protocolos para obtenção de plantas de arroz geneticamente modificadas já foram descritos na literatura (HIEI & KOMARI, 2008; HIEI *et al.*, 1994; NISHIMURA *et al.*, 2006; OZAWA, 2009, 2012); porém, a cultura de tecidos é muito suscetível a variações ambientais e à presença de contaminantes, por isso, é necessário que o protocolo seja constantemente revisado, adequando-o às condições laboratoriais. O protocolo utilizado rotineiramente em nosso laboratório apresentou problemas; portanto, foi necessária uma avaliação criteriosa do protocolo em uso e de outros protocolos, no intuito de propor uma metodologia adequada às condições atuais do laboratório. Para isso, neste trabalho, foi realizada uma avaliação de três protocolos para transformação e para regeneração de plantas de arroz a partir de calos embriogênicos já publicados (HIEI & KOMARI, 2008; NISHIMURA *et al.*, 2006; OZAWA, 2009). A partir dessa revisão, foram realizadas modificações em nosso protocolo e, desta forma, foi possível obter diferentes linhagens de plantas de arroz transformadas, conforme os protocolos descritos a seguir descritos.

3.1. Obtenção dos plasmídeos e transformação de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

Os plasmídeos pENTR-GRF11 e pENTR-bHLH35 foram linearizados com a enzima Alw44i (Promega), purificados com o Plasmid mini purification kit

Kit (Ludwig) e clonados nos vetores de superexpressão pANIC6A e pANIC6B (MANN *et al.*, 2012) utilizando o kit Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A escolha dos vetores pANIC foi devido à expressão do gene de interesse sob controle do promotor do gene *ZmUBI*, adequado à superexpressão de genes em plantas monocotiledôneas. Para todas as transformações, foi utilizada a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, gentilmente cedida pela EMBRAPA-CENARGEN. As bactérias foram transformadas com os plasmídeos de interesse em cada experimento, evitando o uso de estoques congelados. Os plasmídeos pANIC foram diluídos 100 vezes em água autoclavada e transformados em *A. tumefaciens* AGL1 em eletroporador (BTX) a 2500V. Após incubação em meio LB líquido a 28° C sob agitação, as bactérias foram cultivadas a 28° C em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de Rifampicina e 25 µg/ml de Canamicina até o aparecimento de colônias. Três dias antes da transformação dos calos de arroz, uma colônia positiva resultante de cada transformação foi inoculada em 10 ml LB líquido contendo 100 µg/ml de Rifampicina e 25 µg/ml de Canamicina e cultivada a 28° C no escuro sob agitação. No dia anterior à transformação dos calos, 1 ml do pré-inóculo saturado foi reinoculado em 50 ml de LB líquido contendo 100 µg/ml de Rifampicina e 25 µg/ml de Canamicina e cultivadas a 28° C no escuro sob agitação até o dia da transformação dos calos.

3.2. Indução e subcultivo de calos embriogênicos

Primeiramente foi removida a casca de sementes de arroz da cv. Nipponbare, que foram lavadas com etanol 70% durante 1 minuto e esterilizadas em hipoclorito de sódio 4% por 30 minutos, misturando por inversão. Em seguida, as sementes foram lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada em ambiente estéril, e secas em papel absorvente. As sementes foram plaqueadas em meio N6D (Anexo 2), com o embrião voltado para cima. As placas foram seladas com filme plástico ou com fita Micropore 3M™ e incubadas a 25° C sob fotoperíodo (12h claro/12h escuro) durante 6 a 8 semanas. Após esse período de indução, os calos foram repicados e transferidos para meio NB (Anexo 2). Não tendo sido observadas diferenças

entre a selagem das placas com fita Micropore 3M™ ou com filme plástico, passamos a utilizar somente filme plástico para esse fim. As placas seladas foram incubadas a 28° C no escuro. A cada 4 semanas foi feito o subcultivo dos calos em novo meio NB. Para as transformações, foram escolhidos calos saudáveis, que apresentavam divisão e possuíam coloração clara. Foi evitado o uso de calos esbranquiçados, transparentes, de cor escura ou muito pequenos (menores de 1mm). Cinco dias antes da transformação, calos saudáveis foram transferidos para novos meios NB (25 a 30 calos por placa de 9 cm de diâmetro) e cultivados nas mesmas condições até o momento da transformação (Figura 3).

3.3. Transformação de calos embriogênicos de arroz

No momento da transformação, 50 ml de cultura previamente preparada de *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos de interesse foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 ml de meio NBA líquido. Os calos do subcultivo de 5 dias foram submersos nessa solução e incubados a 28° C sob agitação leve durante 10 minutos. A solução foi descartada e os calos foram secos levemente em papel absorvente autoclavado. Os calos foram plaqueados em meio NBA sólido e incubados a 28° C no escuro por 2 dias. Após o co-cultivo, os calos foram lavados quatro vezes com água destilada autoclavada, contendo 150 mg/l de timentina. Os calos foram secos em papel absorvente autoclavado e plaqueados em meio HTC50 (Anexo 2). As placas foram incubadas a 28° C no escuro por 3 a 5 semanas. Durante esse período de seleção, os calos resistentes à higromicina foram transferidos para novas placas de meio HTC50 e incubadas no escuro a 28° C por 3 a 4 semanas. Após essa etapa de proliferação, os calos saudáveis foram transferidos para meio de regeneração (MS-Reg) descrito por Ozawa (2009) (Anexo 2) e incubados a 25° C em fotoperíodo de 12/12 horas por, no mínimo, 30 dias. As plântulas com parte aérea verde e raízes em desenvolvimento foram transferidas para meio MS+Hig (Anexo 2) e incubados a 25° C sob fotoperíodo 12/12 horas por 10 a 14 dias (Figura 3). As plântulas regeneradas foram transferidas para o solo e protegidas com saco plástico transparente durante 7

dias a 28° C. Após o período de aclimação, o saco plástico foi removido e as plantas foram cultivadas com água em abundância a 28° C, com fotoperíodo de 14h/10h. Nessa fase, foi obtido DNA genômico a partir de folhas e as transformações foram confirmadas por meio de PCR utilizando *primers* específicos para o gene da higromicina fosfotransferase.

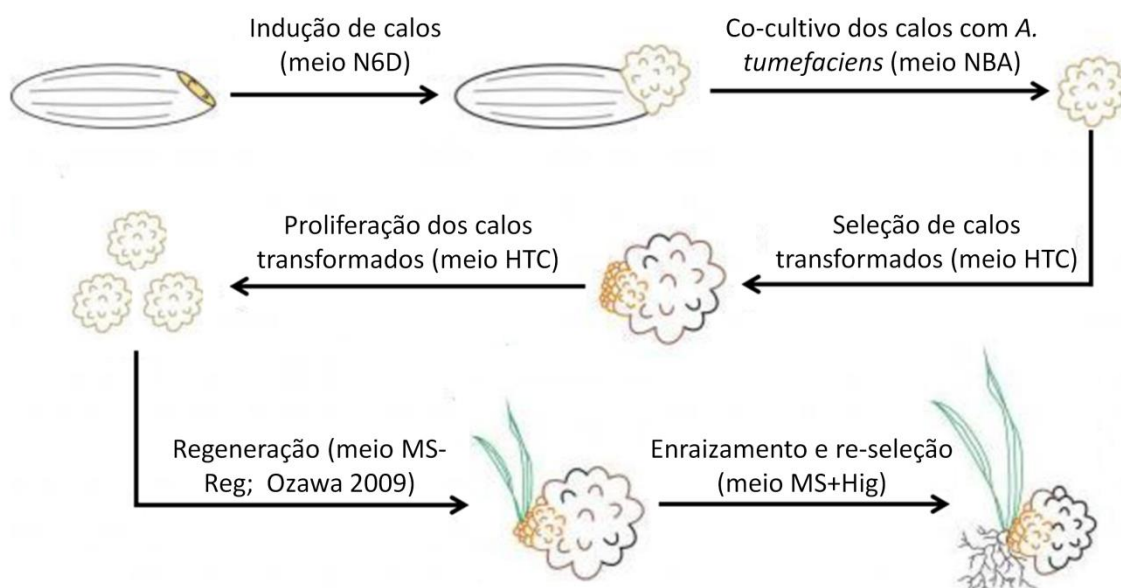


Figura 3 - Obtenção de plantas de arroz *ssp.* Japonica cv. Nipponbare a partir de calos embriogênicos.

Principais etapas do protocolo de transformação de calos de arroz. Adaptado de: <http://www.plantlab.sssup.it/RiceTransformation>.

4. Análise de plantas mutantes e silenciadas *via* RNAi

Foram avaliadas plantas supostamente nocaute para *bHLH35* (cv. Dondjin; PFG_2D-10137.L – POSTECH) (YI & AN, 2013) e plantas silenciadas *via* RNAi nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4* (cv. Nipponbare), gentilmente cedidas pelo Dr. Pieter B. Ouwkerk. Este silenciamento foi conduzido com uma construção que tinha como alvo o gene *GRF1* de cevada; em arroz, foi obtido o silenciamento nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4* conforme o experimento de RT-qPCR realizado por KUIJT e colaboradores (KUIJT *et al.*, 2014).

As sementes foram lavadas com etanol 70 % durante 1 minuto e esterilizadas em hipoclorito de sódio 4% por 30 minutos, misturando por inversão. Após isso, as sementes foram lavadas 5 vezes em água destilada autoclavada em ambiente estéril e secas em papel absorvente. A germinação das linhagens *nocaut* foi realizada em placas de petri contendo papel filtro e água destilada autoclavados, acondicionadas a 28° C no escuro. A germinação das plantas silenciadas via RNAi nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4* foi realizada em meio MS contendo 100 mg/l de geneticina. As plantas foram cultivadas em terra preta, em sala de cultivo a 28° C e fotoperíodo de 14 h / 10 h. As plantas *nocaut* foram triadas quanto à presença do T-DNA na região 5' UTR por meio de PCR com primers específicos (Anexo 1) e observadas fenotipicamente. As plantas silenciadas via RNAi foram observadas fenotipicamente e a geração de panículas foi avaliada por contagem do número de panículas produzidas por planta em comparação com o controle WT (cv. Nipponbare).

5. Experimentos de mono-híbrido em levedura

O mono-híbrido em levedura é uma técnica que permite a identificação de fatores de transcrição que interagem com fragmentos específicos de uma sequência de DNA reguladora. Essa técnica foi elaborada a partir do sistema de duplo-híbrido, e se baseia na interação entre um fator de transcrição (presa) e uma sequência de DNA (isca), ativando a transcrição de um gene repórter. Para garantir que a ligação ao DNA resulte em uma ativação do gene repórter, a biblioteca de expressão de cDNA utilizada para produzir os híbridos codifica um forte domínio de transativação, que é expresso fusionado à proteína codificada pelo cDNA presente em cada clone. A identificação da interação entre fator de transcrição e DNA ocorre por meio da ativação do marcador de seleção HIS3, que permite o crescimento da levedura mutante em meio seletivo não suplementado com histidina (OUWERKERK & MEIJER, 2001).

As iscas foram construídas a partir do sistema de vetores pHIS3/pINT1 utilizando o protocolo padrão descrito anteriormente (HOGE, 1998; OUWERKERK & MEIJER, 2001). Primeiramente, cada sequência isca foi clonada no vetor pHIS3 e posteriormente recombinada para o vetor pINT1, gerando um plasmídeo que foi utilizado para transformação e integração ao

genoma da estirpe de levedura Y187 (*MAT α ura3-52 his3- Δ 200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 met⁻ gal4 Δ gal80 Δ URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ MEL1*) (HARPER *et al.*, 1993; Clontech) (CASTILHOS, 2014). Em colaboração com o grupo GPlantS (Genomics of Plant Stress - ITQB-NOVA, Portugal), nosso grupo realizou *screenings* de duas bibliotecas de cDNA (CASTILHOS, 2014; CASTILHOS & LAZZAROTTO, dados não publicados). Essas bibliotecas foram construídas pelo grupo português a partir de plântulas de arroz submetidas a baixas temperaturas (5° C e 10° C) e à salinidade elevada (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

A fim de confirmar as interações identificadas, foram realizados experimentos de mono-híbrido direto, segundo protocolo descrito anteriormente (OUWERKERK & MEIJER, 2001). Para isso, as leveduras contendo os clones de interesse foram cultivadas em meio líquido CM suplementado com histidina (CM-L) para possibilitar a obtenção do DNA plasmidial. Foram utilizados 3 ml de cultura, centrifugados por 30 segundos à velocidade máxima em um tubo de 1,5ml em duas etapas. O sobrenadante foi removido e as células foram agitadas e ressuspendidas em 200 μ l de *breaking buffer* (2%v/v Triton X-100, 1% v/v SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,0) à temperatura ambiente. Foram adicionados 0,3 g de *glass beads* e 200 μ l de uma solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico em partes iguais. Essa suspensão foi agitada em vórtex por 2 minutos e então centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos à velocidade máxima. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e estocada a -20° C.

Os plasmídeos contendo as presas (pAD-GAL4-2.1/Hybrizap 2.1, Stratagene) foram transformados em células de *Escherichia coli* TOP10 termocompetentes para obtenção de uma quantidade maior de plasmídeo, visto que a obtenção de DNA plasmidial a partir de células de levedura tem uma eficiência muito baixa, o que impede análises posteriores. Para a transformação de células de *E. coli* foram utilizados de 1 a 2 μ l das soluções aquosas contendo os plasmídeos. As células de *E. coli* foram transformadas por choque térmico (5 minutos no gelo, 45 segundos a 42° C, 2 minutos no gelo). A seguir, foi adicionado meio LB líquido (10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl, 5 g/l de extrato de levedura, pH 7,0 ajustado com NaOH 5M) e as células foram incubadas a 37° C durante uma hora, sob agitação, e posteriormente

plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina. As células foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 37° C e as colônias resultantes foram submetidas a reações de PCR para confirmação da transformação, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o vetor (Anexo 1). As colônias positivas foram inoculadas em LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37° C sob agitação por aproximadamente 16 horas.

Os plasmídeos foram extraídos de *E. coli* utilizando o kit de preparo de DNA plasmidial NZYMiniprep (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante. A extração foi confirmada por visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As amostras foram enviadas para sequenciamento (Beckman Coulter Genomics, UK) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o vetor (Anexo 1), visando a confirmar a identidade dos fatores de transcrição isolados. Após a confirmação, os plasmídeos foram transformados nas leveduras contendo as iscas F1.2 e F2.

Anteriormente à transformação, as células de levedura passaram por um processo a fim de adquirir competência. Para isso, as leveduras contendo os plasmídeos isca já integrados no genoma foram cultivadas em 50 ml de meio YPDA líquido (10 g/l de extrato de levedura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de glicose, 20 mg/l de hemissulfato de adenina) a 30° C por 16 horas sob agitação de 180 rpm. Para aumentar a eficiência de transformação, as culturas foram diluídas a OD₆₀₀ em torno de 0,2 e cultivadas por aproximadamente 3 horas até a OD₆₀₀ atingir de 0,4 a 0,6, a 180 rpm. As culturas foram então centrifugadas à temperatura ambiente durante 5 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas em água destilada autoclavada. O processo de centrifugação foi repetido, o sobrenadante foi descartado e as leveduras foram ressuspensas em 1 ml de uma solução estéril contendo Tris-EDTA e Acetato de lítio (TE 1x/LiAc 1x), feita a partir de soluções estoque concentradas (10xTE: 100mM Tris-Cl pH7,5, 10mM EDTA; 10xLiAc: Acetato de lítio 1M, pH7,5). A suspensão foi novamente centrifugada em tubos de 1,5 ml durante 30 segundos à velocidade máxima e as células foram ressuspensas em 250 µl da solução 1xTE/1xLiAc (modificado a partir de GIETZ *et al.*, 1992; OUWERKERK & MEIJER, 2001).

Para cada transformação, foram adicionados 300 µl de mix de transformação (8 vol PEG 50%, 1 vol 1xTE, 1 vol 1xLiAc), 1 µg de plasmídeo presa e 50 µl da suspensão contendo leveduras competentes. As células foram mantidas sob agitação de 100 rpm por 30 minutos a 30° C e após, a 42° C durante 15 minutos sem agitação. As células foram centrifugadas por 10 segundos à temperatura ambiente, ressuspensas em 100 µl de TE 1x e plaqueadas em meio mínimo seletivo CM-L (1,7g/l Difco YNB-AA/AS; 5 g/l (NH₄)₂SO₄; 20 g/l dextrose; 10 ml/l de solução de histidina a 2 g/l; 1,3 g/l de mix de nutrientes em pó, preparado com 2,5 g hemissulfato de adenina, 1,2 g L-arginina, 6 g L-ácido aspártico, 6 g L-ácido glutâmico sal monossódico, 1,8 g L-lisina mono-HCl, 1,2 g L-metionina, 3 g L-fenilalanina, 22,5 g L-serina, 12 g L-treonina, 2,4 g L-triptofano, 1,8 g L-tirosina, 9 g L-valina, 1,2 g uracila), estando ausente a leucina, marcador auxotrófico indicador da presença do plasmídeo presa. As leveduras foram cultivadas a 30° C até o aparecimento de colônias em tamanho suficiente (3 a 5 dias). Foram selecionadas 8 colônias de cada transformação para confirmação das interações. Essas colônias foram ressuspensas em 150 µl de água destilada estéril, plaqueadas em forma de gota (5 µl) e estriadas em dois meios seletivos diferentes: meio mínimo sem leucina (CM-L), para confirmação da presença do plasmídeo e controle de viabilidade celular, e meio mínimo sem leucina e sem histidina (CM-LH), para análise das interações. Para a titulação da ligação de GRFs à isca F2, as leveduras foram inoculadas em 1 ml meio líquido (CM-L) e cultivadas a 30° C sob agitação. No dia seguinte, 1 ml dessa cultura foi diluída em 10ml de meio e cultivada novamente nas mesmas condições. No terceiro dia, as culturas foram diluídas a OD 600 ~ 0,4, lavadas e ressuspensas em 1 ml de água destilada autoclavada. Foram plaqueados 5 µl da suspensão contendo as leveduras, previamente diluída (50 µl de suspensão e 150 µl de água destilada autoclavada), em meio CM-LH em concentrações crescentes de 3-AT (0, 10, 20, 40 e 60 mM). As leveduras foram cultivadas a 30° C e fotografadas no 4° dia, sendo que após esse período não foi observada nenhuma mudança no padrão de crescimento.

6. Experimentos de transativação em protoplastos

A fim de verificar a funcionalidade das interações entre os fatores de transcrição identificados e o promotor do gene que codifica bHLH35, foram realizados experimentos de transativação utilizando protoplastos obtidos a partir de cultura de células de *Arabidopsis thaliana*.

Para isso, uma região de 814pb correspondente às iscas F1.2 e F2 foi utilizada como sequência promotora putativa para a construção do plasmídeo repórter utilizando o vetor pGUS-xx (PASQUALI *et al.*, 1994). A região foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico de arroz cv. Nipponbare, com a enzima de alta fidelidade Phusion (Thermo Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. O fragmento foi purificado a partir do gel de agarose 1% utilizando kit de purificação de DNA em gel (NZYTech) de acordo com o protocolo do fabricante.

O fragmento obtido foi clonado no vetor pJET1.2 (Thermo Scientific) e transformado em células de *E. coli* TOP10 por choque térmico, que foram posteriormente plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram cultivadas a 37° C por aproximadamente 16 horas. Os clones foram confirmados por PCR de colônia e as positivas foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivadas sob agitação a 37° C. Uma das culturas teve o plasmídeo purificado utilizando kit de miniprep (NZYTech) e o mesmo foi confirmado por sequenciamento e digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII. O produto da digestão foi verificado em gel de agarose 1% e o fragmento foi purificado a partir do gel com kit de purificação (NZYTech). O fragmento resultante foi ligado no vetor p-GUSxx, que foi previamente linearizado com as enzimas de restrição BamHI e HindIII (Fermentas) e purificado em kit (NZYTech). O vetor resultante do processo de ligação foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* DH5α por choque térmico. Foi adicionado LB líquido e a suspensão foi incubada por 1h à 37° C sob agitação. Após isso, a suspensão de bactérias foi plaqueada em LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivada a 37° C por aproximadamente 16 horas. Os clones resultantes foram confirmados por PCR de colônia e uma delas foi inoculada em LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina, sob agitação, a 37° C por aproximadamente 16 horas. Foi realizada

uma nova confirmação por PCR e então a colônia foi reinoculada em LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina para obtenção do DNA plasmidial. Da cultura líquida preparada para a maxiprep, foram separados 3 ml para confirmação do clone por digestão a fim de detectar possíveis contaminações. O plasmídeo foi então purificado utilizando o kit PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi estocado a -20° C para análises posteriores.

Os plasmídeos efetores, contendo a sequência codificadora dos fatores de transcrição foram construídos utilizando o vetor p2GW7 (KARIMI *et al.*, 2002). Para isso, os clones em pENTR foram recombinados para o vetor p2GW7 utilizando o kit LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os clones resultantes foram confirmados por PCR de colônia e uma colônia de cada construção foi inoculada em LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina, sob agitação, a 37° C por aproximadamente 16 horas. Foi realizada uma nova confirmação por PCR e então a colônia foi reinoculada em LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina para obtenção do DNA plasmidial. Da cultura líquida preparada para a maxiprep, foram separados 3ml para extração de plasmídeo e confirmação do clone por digestão a fim de detectar possíveis contaminações. O plasmídeo foi então purificado utilizando o kit PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi estocado a -20° C para análises posteriores.

Para os experimentos de transativação, foram utilizados protoplastos obtidos a partir de cultura de células de *Arabidopsis thaliana*. As células foram cultivadas em meio MS modificado (4,414 g/l de MS-B5 Duchefa, contendo 30 g/l de sacarose e 1 mg/l 2,4-D, pH 5,7 ajustado com KOH 1 M), sob agitação constante, a 24° C no escuro. Semanalmente, 10 ml da cultura foram adicionados a 40 ml de meio de cultura novo para manutenção da linhagem. Para a obtenção de protoplastos são utilizadas culturas de 3 a 4 dias após a troca de meio. As células provenientes da cultura foram coletadas por centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos em tubos de fundo cônico de 50 ml. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 ml de solução enzimática preparada no momento do uso (MS-B5-GM: 3163,98 mg/l de MS-B5 Duchefa, 0,28 M de glicose, 0,34 M de manitol, pH5,5 ajustado

com KOH 0,1M, autoclavado). Na hora do uso, foi adicionado 1 % de celulase e 0,2 % de macerozima. A solução enzimática foi agitada por 30 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e esterilizada por filtração. O volume foi completado para 50 ml com meio de cultura MS-B5-GM e a suspensão foi dividida em duas placas de Petri de vidro de 15 cm de diâmetro. As células foram cultivadas na solução enzimática sob agitação de 30 a 40 rpm no escuro a 28° C até apresentarem formato esférico na observação por microscopia de inversão (usualmente o processo leva de 3 a 4 horas). Os protoplastos foram transferidos para tubos de fundo cônico de 50 ml e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 25 ml meio MS-B5 contendo sacarose a 0,28M (3163,98 mg/l de meio MS-B5 Duchefa, sacarose 0,28M, pH 5,5 ajustado com KOH, autoclavado). A suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 5 ml de meio MS-B5 com 0,28M de sacarose, transferidas para dois tubos de 15 ml com fundo cônico e centrifugadas a 800 rpm durante 7 minutos. Nessa etapa as células devem flutuar, sendo transferidas para novo tubo de 15 ml (aproximadamente 2 a 3 ml de células). O número de células foi determinado pela contagem, em câmara de Fuchs-Rosenthal, do número de células em uma solução diluída 50 vezes. O número aproximado de protoplastos contidos em 1 ml foi calculado pela média da contagem de 4 quadrados grandes da câmara, vezes o fator de diluição, vezes 5000. A solução de protoplastos foi diluída em meio MS-B5 com sacarose 0,28 M para uma concentração final de 6×10^6 protoplastos/ml. Os protoplastos foram utilizados imediatamente para transformação.

Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes para cada fator de transcrição. Cada experimento consistiu na transformação de quatro diferentes combinações de plasmídeos, e as transformações ocorreram em triplicatas. Em todas as transformações, foi utilizada a razão de 3 µg de plasmídeo repórter vazio (pGUS-xx) para 8 µg de plasmídeo efetor vazio (p2GW7). Para manter essa razão, a quantidade dos plasmídeos contendo fragmentos clonados a ser utilizada foi calculada por molaridade (BioMath calculator - Promega) em relação ao respectivo vetor vazio. A primeira combinação consistiu em transformar o plasmídeo repórter vazio, pGUS-xx e o plasmídeo p2GW7 contendo o gene codificador da Luciferase (p2GW7-LUC;

GOUVEIA, dados não publicados) para expressão da proteína em protoplastos. A segunda combinação consistiu na mesma combinação anterior, com adição do plasmídeo efetor contendo o FT de interesse (p2GW7-IDEF1 ou p2GW7-GRF11). A terceira combinação consistiu na adição do plasmídeo repórter contendo o promotor do gene *OsbHLH35* e p2GW7-LUC. A quarta transformação consistiu na combinação anterior com adição do efetor contendo o FT de interesse (p2GW7-IDEF1 ou p2GW7-GRF11) (Tabela 1).

Tabela 1 - Esquema das transformações nos experimentos de transativação

		Transformação			
		A	B	C	D
Plasmídeos	pGUSxx-vazio	+	+	-	-
	pGUSxx-bHLH35	-	-	+	+
	p2GW7-LUC	+	+	+	+
	p2GW7-FT	-	+	-	+

Os plasmídeos foram combinados e diluídos em água estéril, se necessário, até o volume final de 20 µl em tubos de 2 ml. Aos tubos contendo os plasmídeos foram adicionados 50 µl da suspensão de protoplastos. Após isso, foram adicionados 150 µl de solução de PEG (25 % PEG 6000; manitol 0,45 M; Ca(NO₃)₂ 0,1M) e as reações foram misturadas e incubadas no escuro, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Após a incubação, foi adicionado 1 ml de Ca(NO₃)₂ a 0,275M e as amostras foram misturadas por inversão. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido por sucção com agulha acoplada à bomba de vácuo. As células foram ressuspendidas em 0,5 ml de meio MS-B5-GM contendo 0,5 mg/l de 2,4-D. As suspensões foram transferidas para placas de 24 poços e foi adicionada água estéril entre os poços para manter a umidade.

As amostras foram incubadas a 22° C no escuro, sem agitação, por aproximadamente 24 horas. Após o período de incubação, os protoplastos foram coletados por centrifugação a 1500 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi removido por sucção com agulha acoplada à bomba de vácuo. A lise celular foi realizada por suspensão no tampão CCLR (20 ml de tampão fosfato preparado com 45,4 ml K₂HPO₄ 1M e 4,6 ml de KH₂PO₄ 1M, pH 7,8; 40 µl de EDTA 0,5M; 200 µl de Triton X-100; 2 ml de glicerol 87%; estocado a 4° C) contendo 0,5 µl/ml de β-mercaptoetanol, seguida por dois ciclos de congelamento a -20° C e descongelamento. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos à velocidade máxima e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Para o ensaio de GUS (β-Glucuronidase), 20 µl de amostra foram transferidos para novo tubo, ao qual foi adicionado 2 µl de CCLR contendo o substrato MUG (4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide), na proporção 1 volume de MUG para 3 volumes de CCLR. Após incubação a 37° C durante 1 hora, no escuro, foram adicionados 180 µl de Na₂CO₃ para interromper a reação. As amostras foram transferidas para microplacas e as leituras foram realizadas em fluorímetro (Fluoromax-4 Micromax plate reader, Horiba), com excitação a 365 nm e emissão a 455 nm em triplicatas. Para o ensaio de luciferase, foram adicionados 20 µl das amostras a placas de 96 poços. As leituras foram realizadas em triplicatas, após 10 segundos de reação, no luminômetro MicroLumatPlus LB 96V (Berthold Technologies). Para a reação, foram adicionados às amostras 150 µl de tampão LUC (Tricina pH7,8 20 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 0,1 M; DTT 3,3 mM e ATP 2 mM, adicionados no momento do uso), e 75 µl do substrato Luciferina (estoque a 1,5 mM), com injetores automáticos presentes no equipamento. A expressão do gene de interesse foi calculada pela razão GUS/LUC como descrito previamente (FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 1
Caracterização do fator de transcrição OsbHLH35

1. Os fatores de transcrição bHLH

As proteínas “*basic-helix-loop-helix*” (bHLH), compõem uma das maiores famílias de fatores de transcrição encontradas em organismos eucarióticos (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010), desempenhando importantes funções em processos regulatórios como a glicólise e o desenvolvimento sexual em fungos, a neurogênese em mamíferos e as respostas ambientais em plantas (SAILSBERY & DEAN, 2012).

O domínio “*basic Helix-Loop-Helix*”, que nomeia os fatores de transcrição da família bHLH, foi descrito pela primeira vez no ano de 1989, como um novo motivo de ligação a DNA e de interação proteica (MURRE *et al.*, 1989). Esse motivo é formado por uma sequência altamente conservada de aproximadamente 60 aminoácidos e possui duas regiões funcionalmente distintas. A primeira, presente na porção N-terminal, compreende uma região básica composta por aproximadamente 13 aminoácidos, conhecida pela função de ligação ao DNA. A segunda parte corresponde à região “HLH”, uma estrutura composta por duas alfa-hélices, “Hélice 1” e “Hélice 2”, cada uma formada por aproximadamente 15 aminoácidos, contendo principalmente resíduos hidrofóbicos, conectadas por uma volta de comprimento variável (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010; SAILSBERY & DEAN, 2012). As duas alfa-hélices possuem a capacidade de interação com outras alfa-hélices, promovendo a formação de homodímeros ou de heterodímeros que estabilizam a ligação ao DNA, promovendo a transcrição (MA *et al.*, 1994; SHIMIZU *et al.*, 1997). A região básica também assume uma estrutura de hélice, ficando conectada à Hélice 1 (MA *et al.*, 1994) (Figura 4).

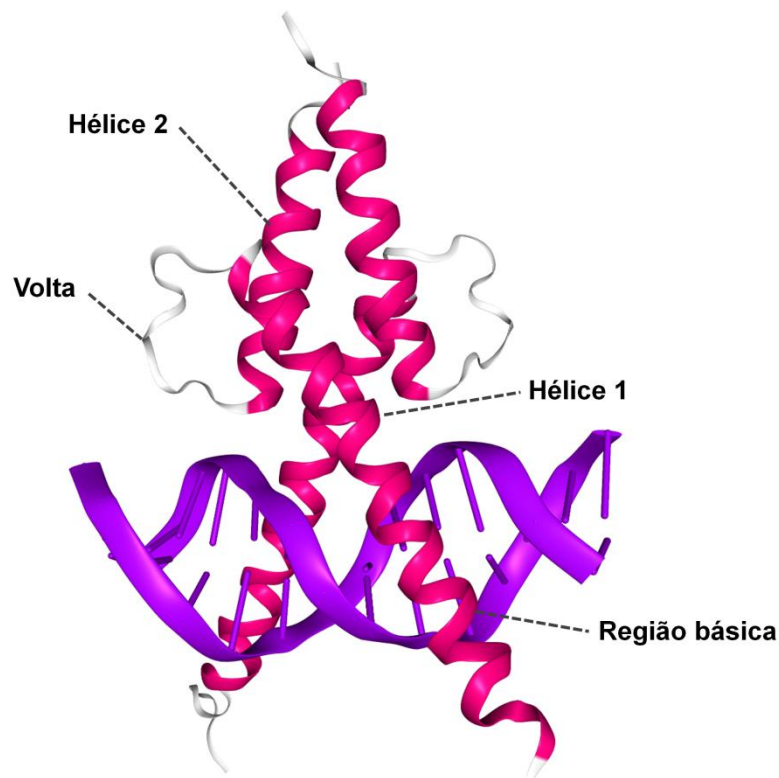


Figura 4 – Representação tridimensional do dímero bHLH ligado ao DNA

Ilustração feita a partir da estrutura cristalográfica do domínio bHLH da proteína MyoD, depositada no Protein Data Bank (PDB ID: 1MDY). (MA *et al.*, 1994).

Em 1999, Atchley e colaboradores desenvolveram um critério para facilitar a definição das proteínas bHLH por meio da identificação de 19 resíduos chave; porém, esse estudo baseou-se somente em sequências de metazoários, sendo insuficiente para a identificação de proteínas bHLH fora desse reino (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010). Posteriormente, um estudo mostrou a conservação dos sítios nos domínios bHLH em sequências provenientes dos três reinos nos quais está presente (SAILSBERY & DEAN, 2012) (Figura 5). No entanto, apesar da grande conservação dos motivos bHLH, a parte restante das proteínas exibe uma conservação muito baixa de suas sequências e grande variabilidade de domínios adicionais (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010).

A região básica do domínio bHLH tem a habilidade de se ligar a uma sequência consenso hexanucleotídica conhecida como E-box (5'-CANNTG-3') (CHAUDHARY & SKINNER, 1999; MURRE *et al.*, 1989), sendo que dois

resíduos conservados, um ácido glutâmico (Glu) e uma Arginina (Arg), em posições específicas, são reportados como essenciais ao reconhecimento e à ligação aos E-boxes (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010) (Figura 5). Os diferentes dímeros formados podem se ligar a motivos E-box específicos, determinando como essas proteínas irão regular a transcrição de seus genes-alvo e assim, os processos nos quais eles estão envolvidos (FAIRMAN *et al.*, 1997; JONES, 2004).

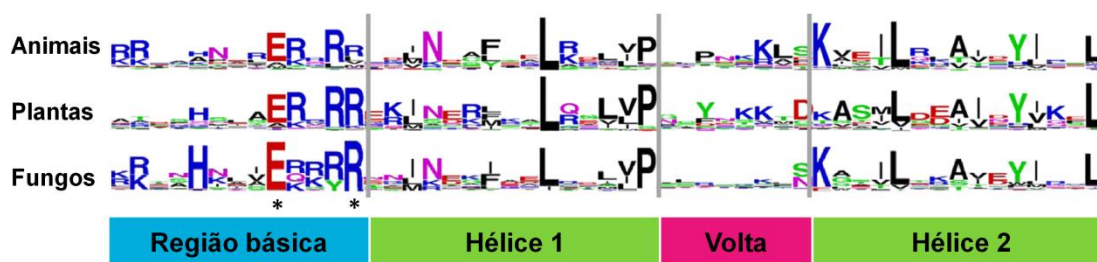


Figura 5 - Conservação dos domínios bHLH em animais, plantas e fungos.

Os logotipos mostram a conservação de aminoácidos em cada sítio, sendo que o tamanho da letra é proporcional à conservação do aminoácido em 279 sequências de animais, 523 sequências de plantas e 509 sequências de fungos. Os resíduos Glu (E) e Arg (R), importantes na ligação a E-box estão marcados com asterisco (*). Adaptado de SAILSBERY; DEAN, 2012.

Diversos trabalhos propuseram classificações para as proteínas bHLH. O primeiro deles formulou a uma classificação em metazoários, com base na distribuição tecidual, especificidades de ligação ao DNA e potencial de dimerização (MURRE *et al.*, 1989). Outro estudo, de foco evolutivo, classificou a família em quatro grupos principais, levando em consideração a ligação a E-box, a conservação de resíduos em outras regiões do motivo e a presença ou ausência de motivos adicionais (ATCHLEY & FITCH, 1997).

Com a disponibilização de um maior número de genomas sequenciados, essa classificação filogenética foi ampliada, classificando as bHLHs em seis diferentes grupos (LEDENT & VERVOORT, 2001). O Grupo A possui a capacidade de ligação a E-boxes 5'-CANNTG-3' e contém 22 subfamílias. O Grupo B compreende doze subfamílias com capacidade de ligação ao G-box 5'-CACGTG-3'. O grupo C contém sete subfamílias que, além do domínio bHLH

possuem um domínio PAS e se ligam a sequência ACGTG ou GCGTG nos promotores de genes-alvo. O grupo D é composto por uma subfamília formada pelas proteínas Id (Inhibitor of DNA binding). Essas proteínas possuem a capacidade de formar heterodímeros com certas bHLHs mas não possuem a porção básica N-terminal e assim, impedem a ligação ao DNA (FORREST & MCNAMARA, 2004; SUN *et al.*, 1991). O Grupo E é formado por duas subfamílias que se ligam preferencialmente a N-box (CACGCG ou CACGAG). O grupo F, por sua vez, possui sequências que divergem das demais e contém um domínio adicional para dimerização e ligação ao DNA (LEDENT & VERVOORT, 2001).

As proteínas bHLH de fungos e de plantas são mais parecidas com as bHLHs do Grupo B de metazoários (BUCK & ATCHLEY, 2003; HEIM *et al.*, 2003; SAILSBERY & DEAN, 2012), sugerindo que este seja o grupo ancestral (SAILSBERY & DEAN, 2012). Em fungos, as proteínas bHLH foram agrupadas em doze grupos, F1 a F12 (Sailsberry ET al, 2012) e, em plantas, um estudo abrangente classificou essas proteínas em trinta e três diferentes grupos (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010).

As primeiras classificações de bHLHs em plantas, conduzidas com sequências provenientes de arroz e de Arabidopsis, categorizaram as proteínas bHLH em quinze a vinte e cinco grupos (BUCK & ATCHLEY, 2003; HEIM *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006; TOLEDO-ORTIZ *et al.*, 2003). Estudos posteriores com um maior número de espécies ampliaram essa classificação para vinte e seis (PIRES & DOLAN, 2010a) e trinta e três grupos (CARRETERO-PAULET *et al.*, 2010).

Entre os membros dessa família em plantas, alguns têm se destacado devido ao relevante papel desempenhado em processos de desenvolvimento e em resposta a estresses (PIRES & DOLAN, 2010b; CASTILHOS *et al.*, 2014). As proteínas bHLHs SPECHLESS (SPCH), MUTE e FAMA são relacionadas ao controle do desenvolvimento dos estômatos (LIU *et al.*; 2009; NADEAU, 2009; SERNA, 2009); IRO2 em arroz (OGO *et al.*, 2007) e FIT em Arabidopsis, junto com outras bHLHs (WANG *et al.*, 2007) regulam a absorção de ferro; as proteínas ICE são implicadas na tolerância ao frio (CHINNUSAMY *et al.*, 2007; CHINNUSAMY *et al.*, 2003); os PIFs (phytochrome interacting factor) são responsáveis pela interação com fitocromos e pela resposta à luz (CASTILLON

et al., 2007); Transparent Testa 8 (TT8) e seus homólogos GLABRA 3 (GL3) e ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3) atuam na regulação da biossíntese de antocianina e desenvolvimento de tricomas e de pelos radiculares (NESI *et al.*, 2000; PAYNE *et al.*; 2000; ZHANG *et al.*, 2003). No entanto, muitos genes dessa família ainda não foram caracterizados, incluindo a OsbHLH35, alvo de estudo neste trabalho, que se mostrou induzida nas plantas duplamente silenciadas nas APX citosólicas, OsAPX1 e OsAPX2 (RIBEIRO *et al.*, 2012).

No âmbito do projeto que nossa equipe vem desenvolvendo em colaboração com pesquisadores do grupo *Genomics of Plant Stress* (GPlantS), foram realizados experimentos de mono-híbrido em levedura, a fim de identificar fatores de transcrição que se ligam ao promotor do gene *OsbHLH35*, induzido nas plantas duplamente silenciadas nos genes *OsApx1* e *OsApx2*. Para isso, uma região de 1500pb antes do ATG foi dividida em quatro fragmentos, os quais foram utilizados como iscas no *screening* de duas bibliotecas de cDNA: o fragmento 1.1, próximo do ATG, com 200pb; o fragmento 1.2, com 332pb; o fragmento 2 com 441 pb; e o fragmento 3 com 557 pb. Os fragmentos 1.2 e 2 não são sobrepostos (CASTILHOS, 2014; CASTILHOS & LAZZAROTTO, dados não publicados).

Para os *screenings*, foram utilizadas duas diferentes bibliotecas, construídas a partir de plântulas de arroz submetidas a baixas temperaturas (5° C e 10° C) e salinidade elevada (200mM NaCl), respectivamente (FIGUEIREDO *et al.*, 2012). Para cada uma das iscas utilizadas nesses experimentos, foram pesquisados mais de três milhões de clones. Foram identificados quatro fatores de transcrição com capacidade de ligação a fragmentos do promotor de *OsbHLH35* (CASTILHOS, 2014; CASTILHOS & LAZZAROTTO, dados não publicados). Três deles são membros da família GRF (Growth Regulating Factor), envolvida no crescimento e no desenvolvimento vegetal, *OsGRF3* (LOC_Os04g51190), *OsGRF4* (LOC_Os02g47280) e *OsGRF11* (LOC_Os07g28430) (CHOI & KIM; KENDE, 2004), e o quarto fator de transcrição identificado foi o *IDEF1* (Iron-deficiency 1) (LOC_Os08g01090), que atua como regulador positivo de genes relacionados à captação e à utilização de ferro em arroz (KOBAYASHI *et al.*, 2007, 2009, 2010, 2012).

O objetivo do trabalho descrito neste capítulo foi a caracterização do gene *Os**h**HLH35*. Para isso, primeiramente, analisamos o padrão de expressão de *Os**h**HLH35* frente a diferentes condições de estresse. Além disso, analisamos plantas *nocaut*e para o gene *Os**h**HLH35* e geramos diferentes linhagens de plantas superexpressando *Os**h**HLH35*.

2. Resultados

2.1. Padrão de expressão do gene *Osb**H**L**H**3**5***

No intuito de caracterizar o gene *Os**b**H**L**H**3**5*, realizamos experimentos de quantificação relativa de transcritos por PCR quantitativa (RT-qPCR) em amostras de plantas submetidas a diferentes condições de estresse. De modo geral, experimentos em escala laboratorial não reproduzem fielmente as características fisiológicas de um estresse em cultivo no campo, mas servem como ponto de partida para análises posteriores.

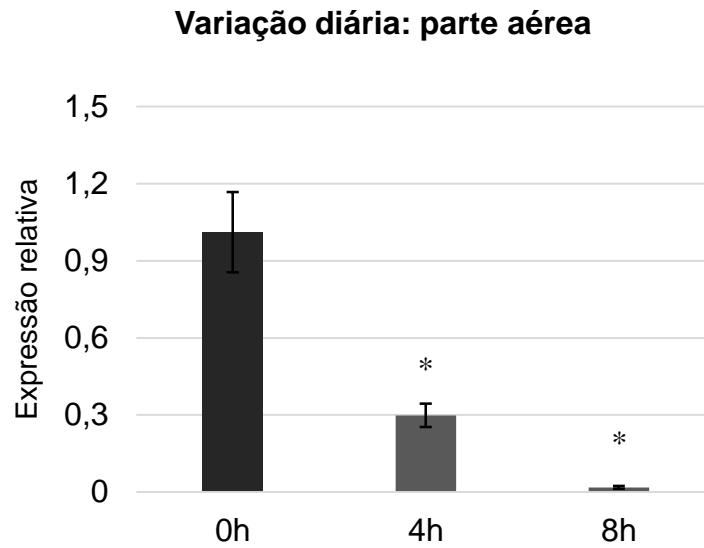
Neste trabalho, foi avaliada a expressão relativa do gene *Os**b**H**L**H**3**5* em resposta à salinidade, à dessecação, ao frio, ao estresse mecânico, e à exposição ao ABA, à luz UV-B e ao peróxido de hidrogênio exógeno. Além disso, foi analisada a variação da expressão relativa do gene ao longo do dia.

Visando a confirmar os dados de expressão obtidos por meio dos experimentos de RT-qPCR, também analisamos a expressão do gene *Os**b**H**L**H**3**5* em resposta à dessecação, à salinidade, e ao frio, utilizando dados de microarranjo disponíveis.

2.1.1. Variação da expressão relativa de *Osb**H**L**H**3**5* ao longo do dia**

Para a análise da expressão do gene *Os**b**H**L**H**3**5* ao longo do dia, foram avaliadas amostras de partes aéreas e de raízes de plantas coletadas 4 horas após o amanhecer (0h) e depois de 4h e 8h da primeira coleta. A expressão do gene foi reprimida no decorrer do dia em partes aéreas (A) não sofreu variação em raízes (B) (Figura 6).

A.



B.

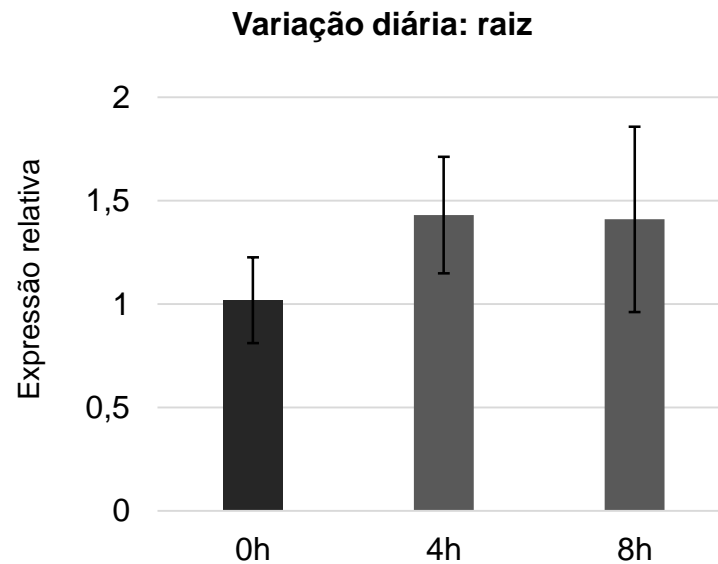


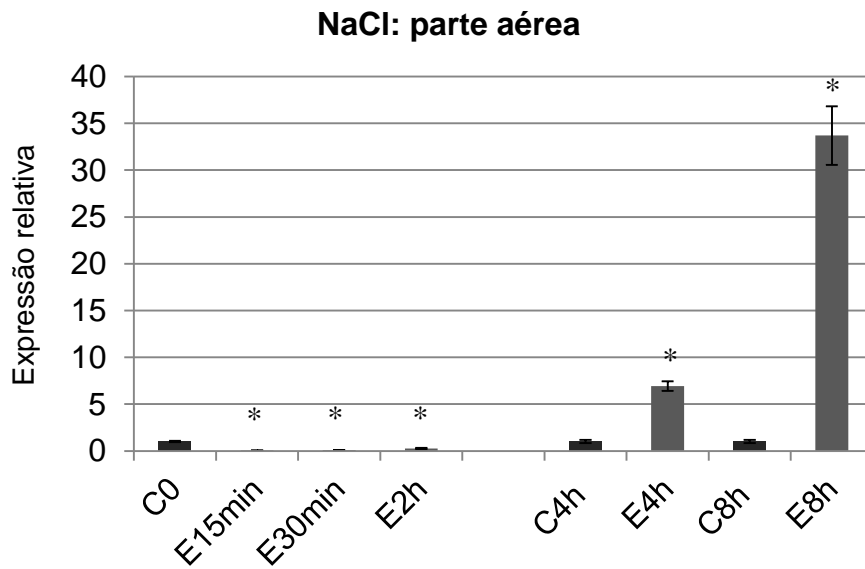
Figura 6: Variação da expressão do gene *OsbHLH035* durante o dia em condições normais.

Expressão relativa do gene *OsbHLH35* durante o dia em partes aéreas (A) e em raízes (B) de plantas em condições normais de cultivo. Tempo 0h: 4 horas após o amanhecer; 4h: 4 horas após a primeira coleta; 8h: 8 horas após a primeira coleta. A expressão do gene nos tempos de 4 horas e 8 horas foi comparada com o tempo 0. Normalizadores: UBC2 (ubiquitin conjugating enzyme) e EF1 α (elongation factor 1 α). *Estatisticamente significativo: teste-T com $p < 0,05$.

2.1.2. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta à salinidade

Para a análise da expressão do gene *OsbHLH35* em resposta ao estresse salino, foram analisadas amostras de partes aéreas e de raízes de plantas expostas a 200 μ M de NaCl. A expressão do gene foi induzida em partes aéreas após 4 e 8 horas de estresse. A repressão dos 15 minutos até 2 horas de estresse pode ser devida à diminuição da expressão observada ao longo do dia (Figura 9A). Em raízes, a expressão do gene foi reprimida aos 15 minutos de estresse, e foi induzida após 30 minutos (Figura 7).

A.



B.

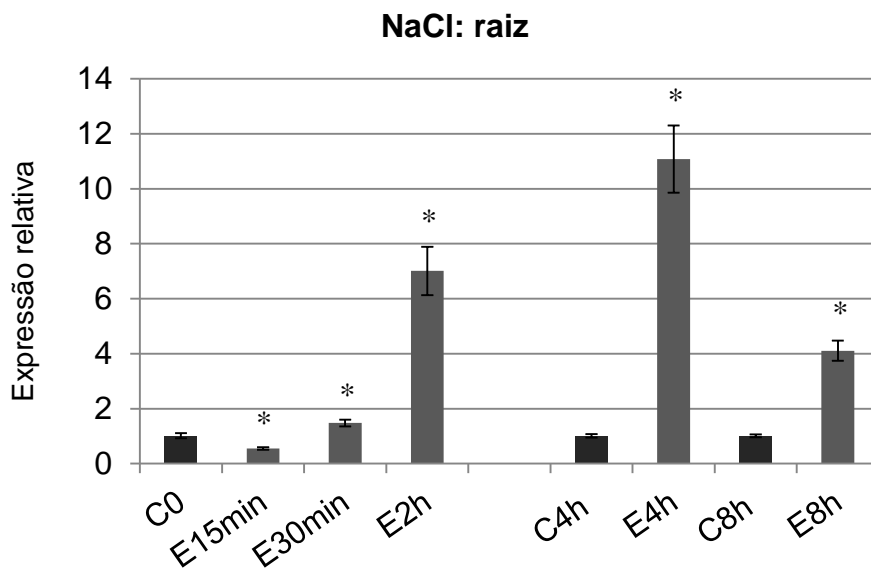


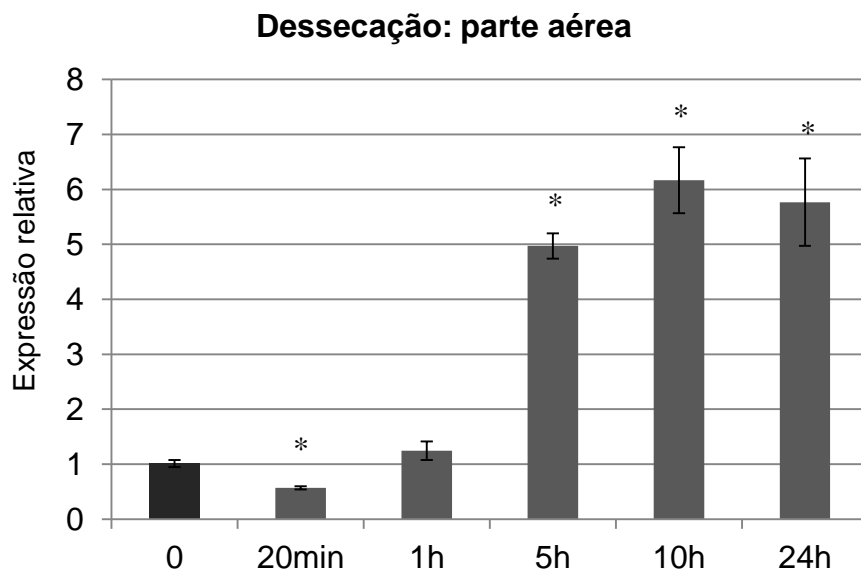
Figura 7: Expressão relativa do gene bHLH035 sob estresse salino.

A expressão do gene *OsbHLH35* foi avaliada em partes aéreas (A) e em raízes (B) de plantas expostas a 200 μ M de NaCl. Períodos de estresse de 15min, 30min e 2h (E15min, E30min, E2h) foram comparados com o tempo 0 (C0, ausência de estresse); períodos de estresse de 4h e 8h (E4h, E8h) foram comparados com os controles de 4h e 8h (C4h, C8h), respectivamente. Normalizadores: UBC2 (ubiquitin conjugating enzyme) e EF1 α (elongation factor 1 α). *Estatisticamente significativo; teste T com $p < 0,01$.

2.1.3. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta à dessecação

Para a análise da expressão do gene *OsbHLH35* em resposta à dessecação, foram analisadas amostras de partes aéreas e de raízes de plantas repousadas sobre papel absorvente. A expressão do gene foi induzida em partes aéreas a partir de 5 horas de estresse. A repressão observada aos 20 minutos pode ser devida à repressão observada ao longo do dia (Figura 6A). Em raízes, a expressão do gene foi induzida a partir de 10 horas de estresse (Figura 8).

A.



B.

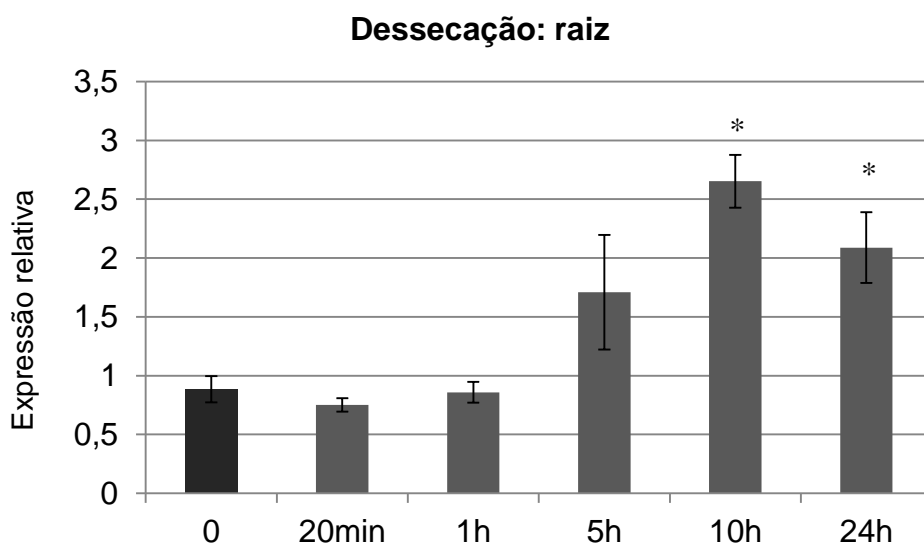


Figura 8: Expressão relativa do gene *OsbHLH035* sob estresse de dessecação.

As amostras foram coletadas após 20 minutos, 1 hora, 5 horas, 10 horas e 24 horas de estresse e comparadas com o controle em condições normais (tempo 0).

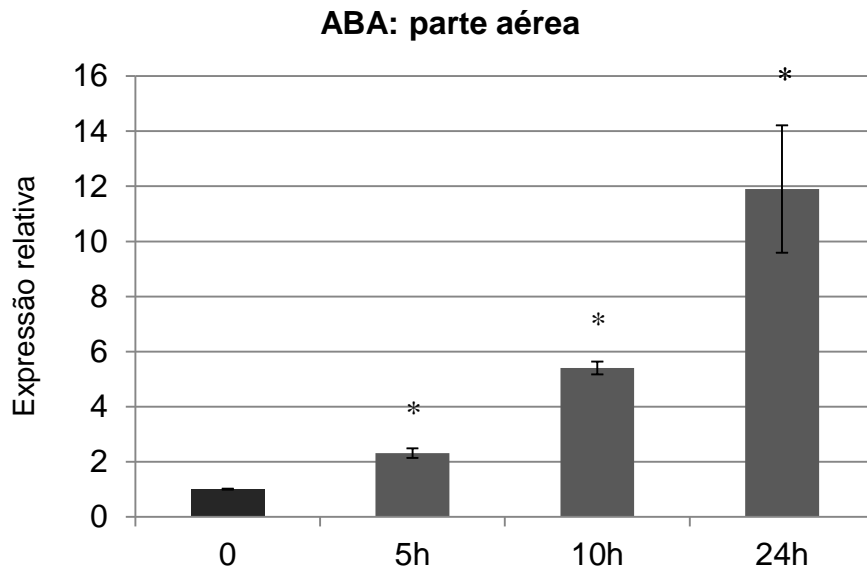
Normalizadores: UBC2 (ubiquitin conjugating enzyme) e EF1 α (elongation factor 1 α).

*Estatisticamente significativo; teste T com $p < 0,01$.

2.1.4. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta à exposição ao ABA

A expressão do gene *OsbHLH35* foi avaliada em resposta ao ABA. Para isso, foram coletadas amostras de partes aéreas e de raízes de plantas expostas a 100 mM do composto. A expressão do gene foi induzida em partes aéreas a partir de 5 horas de estresse. A repressão observada aos 20 minutos pode ser devida à repressão observada ao longo do dia (Figura 6A). Em raízes, a expressão do gene foi induzida a partir de 10 horas de estresse (Figura 9).

A.



B.

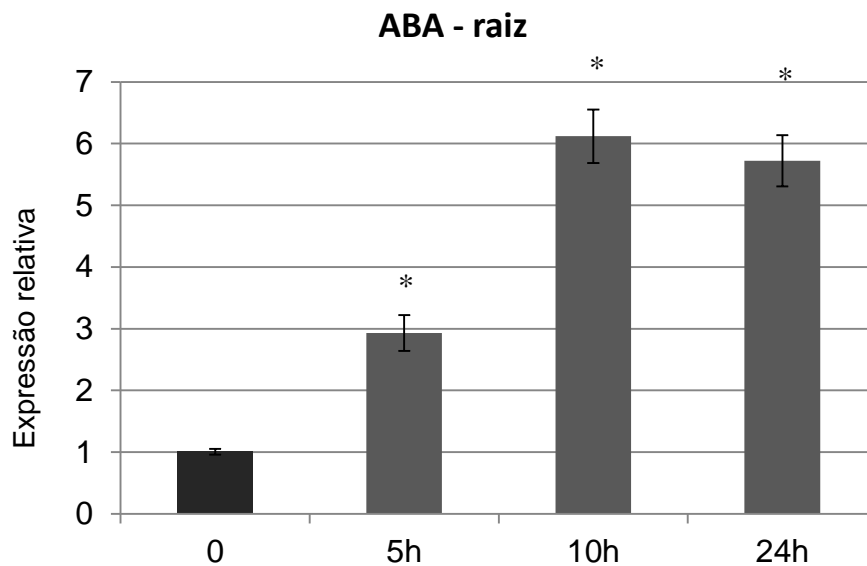


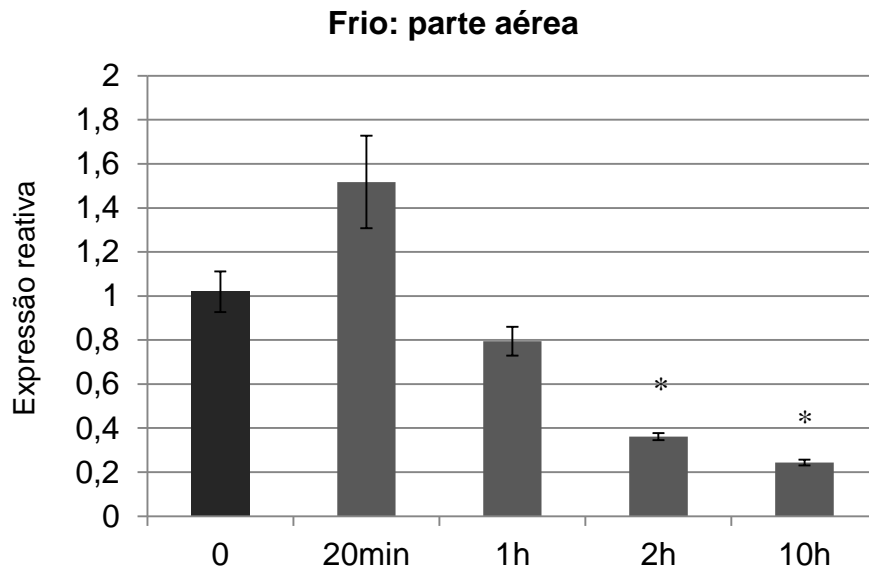
Figura 9: Expressão relativa do gene *OsbHLH035* após tratamento com ABA.

Amostras de partes aéreas (A) e raízes (B) de plantas expostas ao ABA foram coletadas após 5 horas, 10 horas e 24 horas de estresse e comparadas com o controle não tratado (tempo 0). Normalizadores: UBC2 (ubiquitin conjugating enzyme) e EF1 α (elongation factor 1 α). *Estatisticamente significativo; teste T com $p < 0,01$.

2.1.5. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta ao frio

Para a análise da expressão do gene *OsbHLH35* em resposta ao frio, foram avaliadas amostras de partes aéreas e de raízes de plantas coletadas após 20 minutos, 1 hora, 2 horas e 10 horas de cultivo a 10° C. A expressão do gene foi reprimida no decorrer do dia em partes aéreas (A) e não sofreu variação em raízes (B). A repressão observada pode não ser real, devido à redução da expressão observada nesse tecido durante o dia (Figura 10).

A.



B.

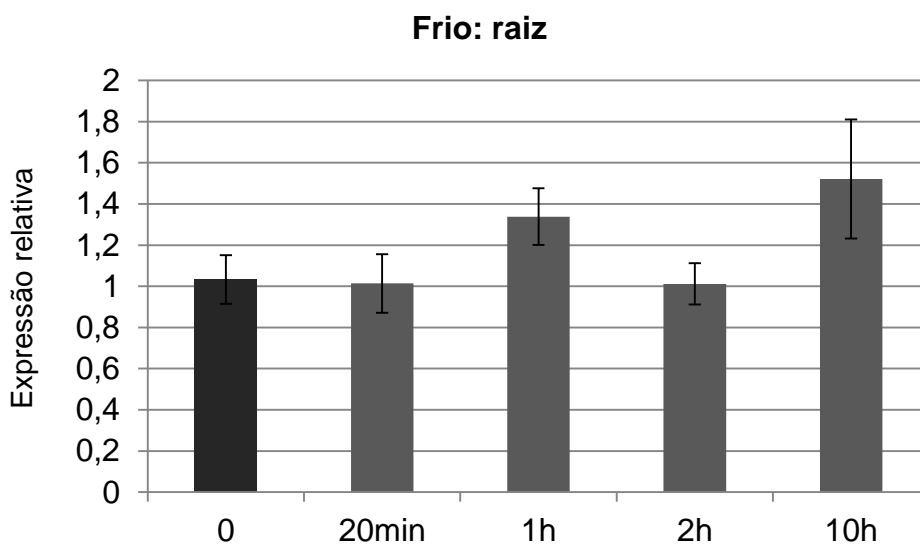


Figura 10: Expressão relativa do gene *OsbHLH035* em plantas mantidas a 10° C. Expressão relativa do gene foi avaliada em amostras de partes aéreas (A) e raízes (B) de plantas mantidas a 10° C durante 20 minutos, 1 hora, 2 horas e 10 horas, comparadas com o controle mantido em condições normais de cultivo (tempo 0). Normalizadores: UBC2 (ubiquitin conjugating enzyme) e EF1 α (elongation factor 1 α). *Estatisticamente significativo; com $p < 0,01$.

2.1.6. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta ao estresse mecânico

A expressão do gene *OsbHLH35* também foi avaliada na resposta ao estresse mecânico. Para isso, as folhas e os caules das plântulas foram danificados por dobramento e quebra e as plântulas inteiras foram coletadas nos tempos de 10, 20, 40 minutos e 1 hora após o estresse. Foi observada uma repressão da expressão do gene a partir dos 10 minutos após o estresse, porém, a repressão observada pode não ser real, devido à redução da expressão observada em parte aérea durante o dia (Figura 11).

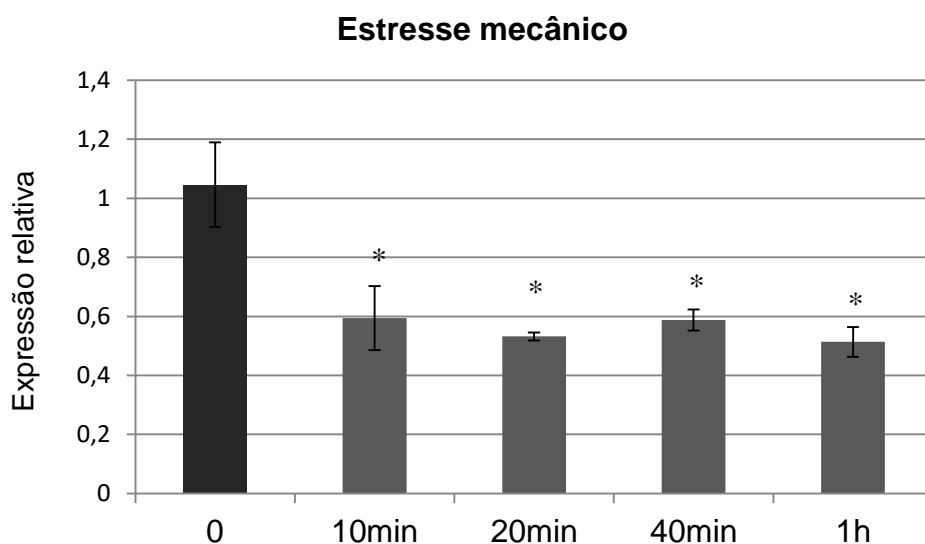


Figura 11 - Expressão relativa do gene *OsbHLH035* em plântulas submetidas a estresse mecânico.

Neste experimento, as amostras foram coletadas nos tempos de 10 minutos, 20 minutos, 40 minutos e 1 hora após o estresse e comparadas ao controle em condições normais de cultivo (tempo 0). Normalizadores: UBC2 (ubiquitin conjugating enzyme) e EF1 α (elongation factor 1 α). *Estatisticamente significativo; teste T com $p < 0,05$.

2.1.7. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta à exposição à luz UV-B

Para analisar a expressão do gene *OsbHLH35* em resposta à exposição à luz UV-B, as plantas foram irradiadas duas vezes durante 4 horas, com intervalo de 20 minutos entre cada exposição. As amostras foram coletadas logo após a segunda exposição (tempo 0), e também após 6 e 24 horas após o estresse. As plantas controle foram mantidas em condições normais, sem exposição à lâmpada UV-B.

Foi observada indução na expressão do gene logo após o estresse e também após 30 minutos. A indução aparente, porém, não significativa, da expressão nos demais tempos se deve à indução quando em comparação com o normalizador FDH somente, que não se reproduziu em comparação com os demais normalizadores (Figura 12).

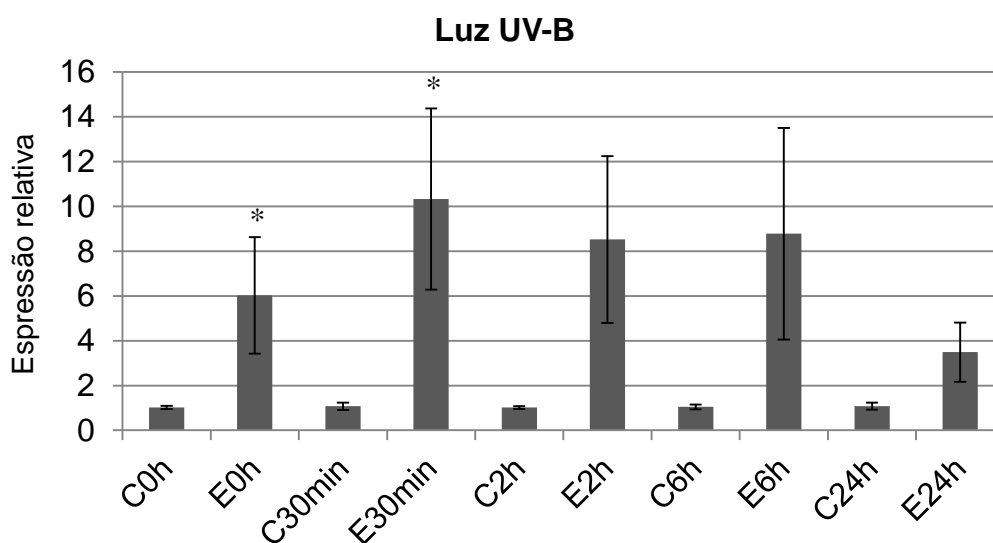


Figura 12 – Expressão relativa do gene *OsbHLH35* após exposição à luz UV-B.

A expressão do gene *OsbHLH35* foi avaliada após exposição à luz UV-B. foram analisadas amostras após o estresse (E0h), e após 30 minutos (E30min), 2 horas ((E2h), 6 horas (E6h) e 24 horas (E24h). Cada amostra foi comparada com seu controle, C0h, C30min, C2h, C6h e C24h, respectivamente. Normalizadores: FDH (formate dehydrogenase), UBI5 (ribosomal-ubiquitin fusion protein) e EF1 α (elongation factor 1 α). *Estatisticamente significativo; teste T com $p < 0,05$.

2.1.8. Expressão relativa de *OsbHLH35* em resposta à aplicação de peróxido de hidrogênio exógeno

Para avaliação da expressão do gene em resposta ao H₂O₂, as plantas foram expostas a 10 μM de H₂O₂. As amostras foram coletadas 2h, 4h e 8h após a aplicação do estressor. A expressão do gene foi induzida 4h e 8h após a aplicação do composto (Figura 13).

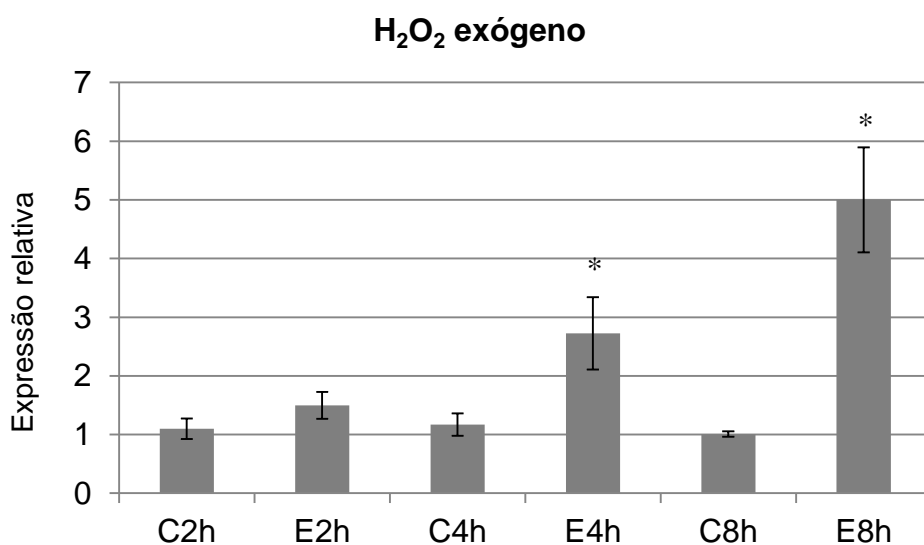


Figura 13 – Expressão relativa do gene *OsbHLH35* em resposta à aplicação de peróxido de hidrogênio exógeno.

As amostras foram coletadas 2h, 4h e 8h (após a aplicação do estressor (E2h, E4h, E8h) e comparadas com os respectivos controles coletados nos mesmos tempos (C2h, C4h, C8h). Normalizadores: FDH (formate dehydrogenase), UBI5 (ribosomal-ubiquitin fusion protein) e EF1α (elongation factor 1α). *Estatisticamente significativo; teste T com $p < 0,01$.

2.1.9. Avaliação da expressão do gene *OsbHLH35* em experimentos de microarranjo, em resposta à dessecação, salinidade elevada e frio

No intuito de confirmar os resultados dos experimentos de estresse realizados, foram avaliados dados de microarranjo disponibilizados por estudos anteriores (JAIN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2012). A análise da expressão em amostras de plântulas submetidas aos estresses de dessecação em papel absorvente, 200mM de NaCl e temperatura de 5° C mostrou que a expressão do gene *OsbHLH35* estava aumentada em relação ao controle, que consistiu em amostras de plantas cultivadas em condições normais (Figura 14).

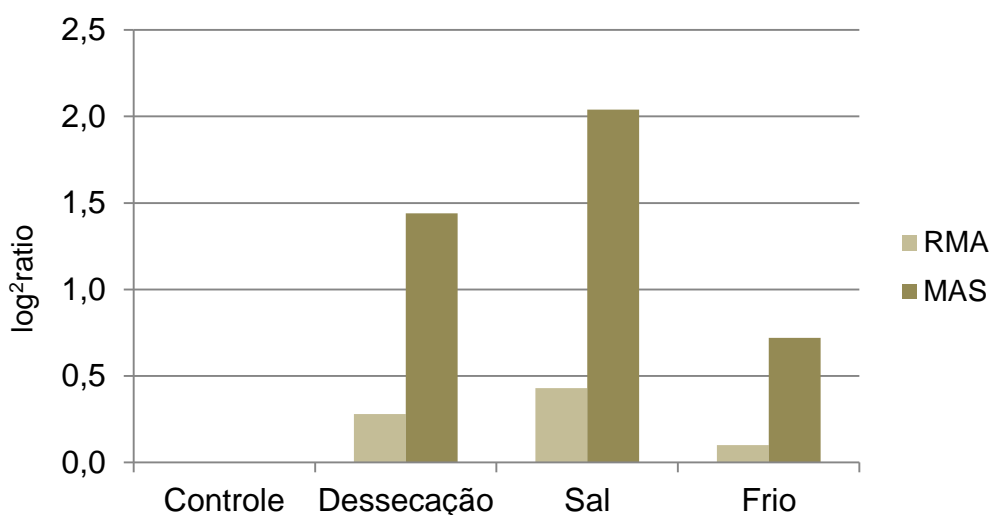


Figura 14 – Expressão do gene *OsbHLH35* em resposta à dessecação, à salinidade e ao frio.

Expressão calculada pelo logaritmo na base 2 da razão entre as amostras e o controle. Normalização pelos métodos de RMA e MAS5.0.

2.2. Geração de plantas de arroz superexpressando *Os**b**H**L**H35*.

No intuito de contribuir com a caracterização funcional do gene *Os**b**H**L**H35*, foram obtidas diferentes linhagens de plantas de arroz ssp. Japonica cv. Nipponbare superexpressando o gene *Os**b**H**L**H35*, sob controle do promotor do gene *ZmUbi*, utilizando os plasmídeos pANIC6A e pANIC6B (MANN *et al.*, 2012).

Após a análise de diferentes protocolos, padronizamos uma metodologia de transformação e de regeneração de calos de arroz em nosso laboratório. Primeiramente, obtivemos um novo estoque da bactéria *A. tumefaciens* AGL1 e passamos a transformar as bactérias alguns dias antes de cada processo de transformação de calos, de forma a evitar o manuseio excessivo de estoques congelados. Também padronizamos os protocolos de elaboração de soluções estoque e de meios de cultura, no intuito de evitar o preparo de soluções em diferentes concentrações e, portanto, diminuindo os riscos de preparo incorreto dos meios.

As principais modificações feitas ao protocolo foram a omissão do processo de pré-regeneração, que consistia em incubar os calos transformados em meio de regeneração com adição de ABA (Anexo 2) e a utilização do meio de regeneração descrito em OZAWA, 2009. Comparado com o meio de regeneração RHTC50 (Anexo 2), esse possui menor concentração de ANA, utiliza Kinetina ao invés de BAP e não é adicionada higromicina.

Após diversos processos de transformação, obtivemos trinta e duas linhagens de calos resistentes à higromicina para a construção *bH**L**H35*-pANIC6A e cinco linhagens de calos resistentes para a construção *bH**L**H35*-pANIC6B. Nem todas as linhagens submetidas ao processo de regeneração originaram plantas e diversos calos foram perdidos durante o processo de seleção devido a elevações excessivas na temperatura da incubadora.

Após a regeneração, as plantas foram transferidas para o solo e cultivadas a 28° C e fotoperíodo de 16h/8h, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação para completar o desenvolvimento. Ao final, sobreviveram plantas de uma linhagem para a construção *bH**L**H35*-pANIC6A e de uma linhagem para a construção *bH**L**H35*-pANIC6B.

O desenvolvimento vegetativo das plantas foi normal para o que se espera de plantas regeneradas a partir de calos (Figura 15). Após a fase vegetativa, as plantas geraram panículas; porém, até o momento do fechamento desta tese, não foram originadas sementes (Figuras 16 e 17), indicando que os genes podem estar envolvidos no desenvolvimento de estruturas ligadas à sua formação.

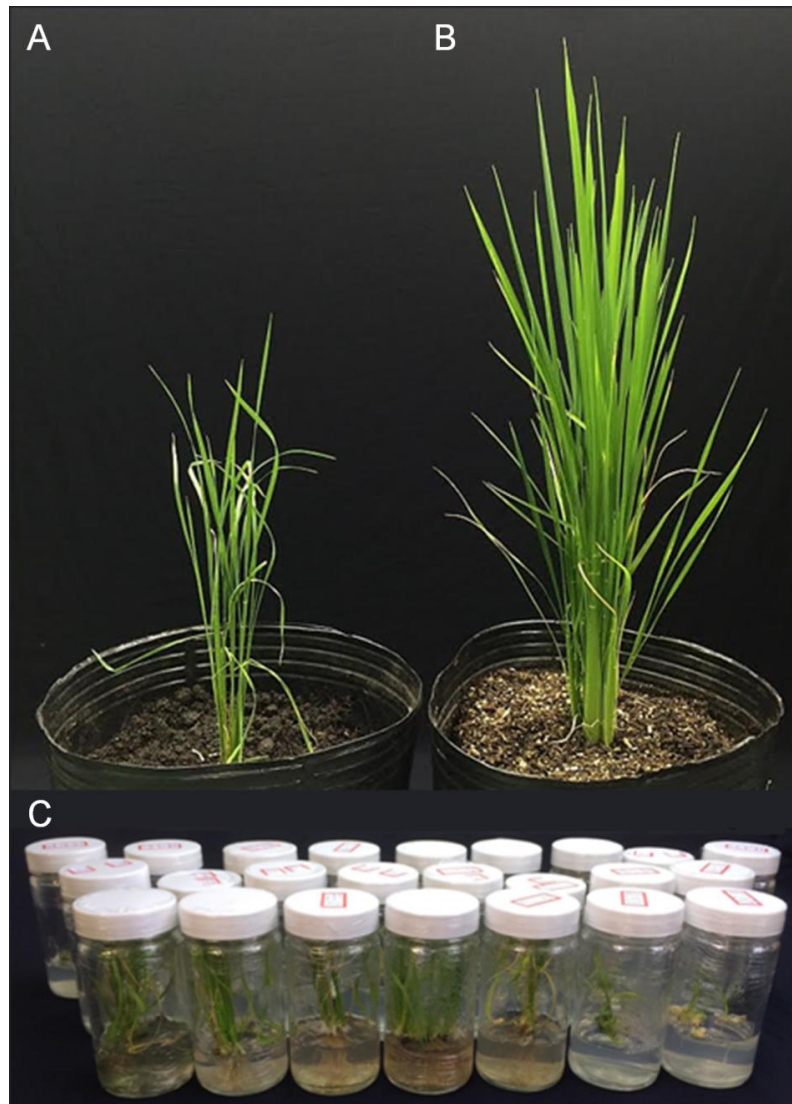


Figura 15 – Plantas de arroz representativas em diferentes estágios de desenvolvimento.

A. Plantas regeneradas a partir da transformação com a construção bHLH35-pANIC6A. B. Plantas regeneradas a partir da transformação com a construção GRF11-pANIC6A. C. Plantas em fase de enraizamento e re-seleção (MS+HIG) após transformação com as construções GRF11-pANIC6A; GRF11-pANIC6B e bHLH35-pANIC6A e bHLH35-pANIC6B (após processo de regeneração). Fotos em Outubro de 2016.



Figura 16 – Plantas de arroz representativas em diferentes momentos de desenvolvimento

(A) e (B) Plantas superexpressando *OsbHLH35* em pANIC6A e 6B, evidenciando as panículas. (C) Plantas superexpressando os genes *OsbHLH35* e *OsGRF11*. Fotos em Fevereiro de 2017.



Figura 17 – Plantas de arroz superexpressando *Osb**H**L**H35***

(A) Plantas superexpressando o gene *Os**b**H**L**H35* com o vetor pANIC6A. (B) Plantas superexpressando o gene *Os**b**H**L**H35* com o vetor pANIC6B. Fotos em Agosto de 2017.

2.3. Análise de plantas *nocaut* para o gene *Osb**H**L**H35*.**

Com o objetivo de caracterizar o gene *Os**b**H**L**H35*, foi adquirida uma linhagem de sementes *nocaut* neste gene (PFG_2D-10137.L cv. Dondjin; POSTECH) (YI & AN, 2013). As plantas provenientes das sementes foram genotipadas com *primers* específicos e somente uma planta heterozigota possuía a inserção de T-DNA. As demais plantas não possuíam a inserção, sendo consideradas segregantes. A planta heterozigota contendo a inserção de T-DNA possuía fenótipo anão e não se desenvolveu até a fase reprodutiva (Figura 18).

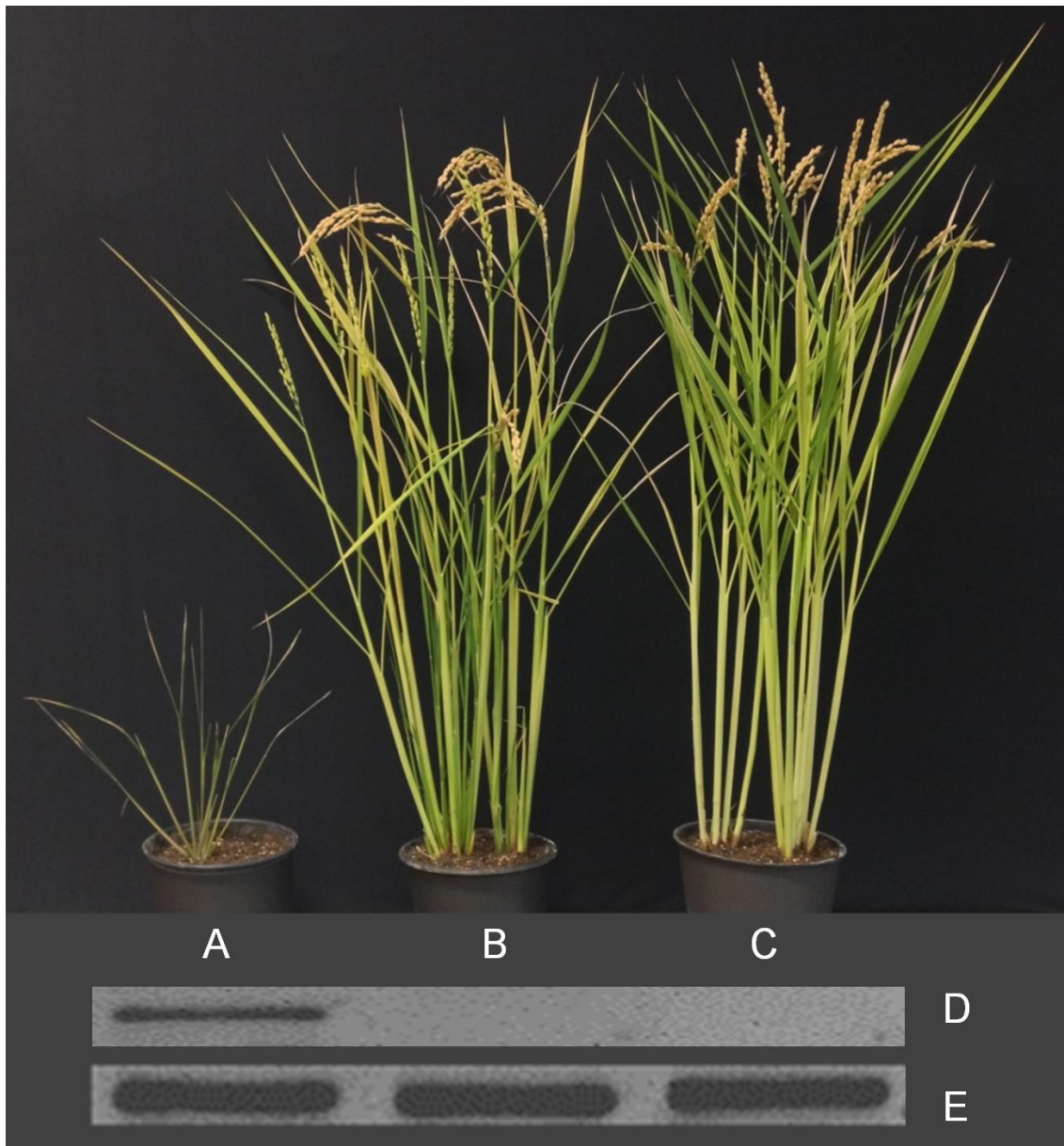


Figura 18 - Plantas PFG_2D-10137.L e WT

A. Planta heterozigota da linhagem PFG_2D-10137.L., anã, contendo a inserção de T-DNA. B. Plantas da linhagem PFG_2D-10137.L., segregante, não contêm a inserção de T-DNA. C. Plantas WT cv. Dondjin. D e E. Genotipagem das plantas com primers B1 (T-DNA) reverso e promotor de bHLH35 direto (D) e primers direto e reverso para amplificação do promotor bHLH35 (E).

A partir dessa observação, foram adquiridas novamente as sementes visando à obtenção de um maior número de plantas mutantes, no intuito de verificar se o atraso no desenvolvimento era um fenótipo devido ao silenciamento do gene *OsbHLH35*.

Nesse experimento, nenhuma planta possuía a inserção de T-DNA; porém, duas plantas segregantes possuíam o fenótipo anão (Figura 19), indicando que esse fenótipo possa estar relacionado à presença de alguma outra mutação ou inserção de T-DNA não identificada.



Figura 19 - Plantas PFG_2D-10137.L e WT

A e B. Plantas da linhagem PFG_2D-10137.L. Ambas apresentam desenvolvimento retardado, porém, são segregantes, não contêm a inserção de T-DNA. C. Planta WT cv. Dondjin.

3. Discussão

A caracterização funcional do gene *OsbHLH35* foi iniciada pelo estudo da expressão do gene em resposta à salinidade, à dessecação, ao frio, ao estresse mecânico, e à exposição ao ABA, à luz UV-B e ao peróxido de hidrogênio exógeno. A expressão do gene foi induzida em resposta à salinidade, à dessecação, à exposição ao ABA, à luz UV-B e ao peróxido de hidrogênio exógeno, e foi reprimida em resposta ao frio e ao estresse mecânico; porém, essa redução aparente pode ser devida à repressão da expressão do gene observada em folhas durante o decorrer do dia.

Como os experimentos de RT-qPCR não possuíam controles para cada tempo de estresse avaliado, buscamos dados de microarranjo previamente publicados no intuito de confirmar esses resultados. Essas análises mostraram uma indução da expressão do gene em resposta à salinidade, à dessecação e ao frio. Essa indução em resposta ao estresse de frio pode ter sido ocultada em nossos experimentos pela repressão da expressão do gene ao longo do dia.

Sabe-se que a privação de alguns nutrientes, incluindo potássio, podem induzir a geração de ERO, que são importantes na geração de sinais de Ca^{2+} em células vegetais (WANG & WU, 2013), embora a relação das ERO com as respostas a esse estresse ainda não estejam bem elucidadas (ZHANG *et al.*, 2017). O fator de transcrição *OsbHLH35* ainda não está caracterizado na literatura, porém, um trabalho recente mostrou que o gene *OsbHLH35* teve sua expressão reprimida em resposta à deficiência de K^+ , enquanto que a expressão de peroxidases estava aumentada (ZHANG *et al.*, 2017). Isso mostra uma relação inversa entre os níveis de expressão de peroxidases e de *OsbHLH35*, assim como nas plantas duplamente silenciadas nas APX1 e APX2, que apresentavam menor atividade de APX (RIBEIRO *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2010).

Embora ainda não existam relatos da atuação de *OsbHLH35* nas respostas a estresses, a expressão do gene estava induzida em plantas de arroz silenciadas nas APX1 e APX2, que apresentam altos níveis de peróxido de hidrogênio. Essas plantas não apresentam defeitos no desenvolvimento e são tolerantes a concentrações tóxicas de alumínio (RIBEIRO *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2010), além de responderem a estresses abióticos como

salinidade, calor, alta luminosidade e aplicação de metil-viologênio de forma semelhante às plantas controle. Isso ocorre possivelmente devido à ativação de um mecanismo de compensação, que culmina com a expressão aumentada de genes que codificam enzimas das famílias GPX e CAT (BONIFACIO *et al.*, 2011). O fato de a expressão do gene *OsbHLH35* ser modulada em resposta a diferentes estresses abióticos e em plantas com níveis de peróxido aumentados sugere que esse gene responda a alterações no estado redox.

No intuito de caracterizar funcionalmente o gene *OsbHLH35*, foram avaliadas plantas de arroz nocaute e foram geradas plantas superexpressando esse gene. Ao analisar plantas da linhagem nocaute PFG_2D-10137.L, foi encontrada somente uma planta heterozigota, com um fenótipo anão e desenvolvimento estagnado. As demais plantas não continham a inserção de T-DNA. Novas sementes foram utilizadas para confirmar se esse fenótipo seria devido ao nocaute do gene. No entanto, nessa nova análise, foram encontradas novas plantas anãs que não continham a inserção. O fato de não ter sido obtida nenhuma planta homozigota para a inserção, apenas uma planta heterozigota com desenvolvimento prejudicado, como o de algumas plantas segregantes, não permitiu avaliar essa linhagem fenotipicamente. Isso pode indicar que o nocaute completo do gene seja deletério. No entanto, essa hipótese precisa ser melhor explorada para elucidar o possível efeito deletério da falta de *OsbHLH35* para a planta.

A superexpressão do gene *OsbHLH35* originou plantas que, até o momento do fechamento desta tese, não geraram sementes. Apesar de terem atingido a fase R4 (abertura da flor), o desenvolvimento estagnou nesta fase e não houve transição para as fases de enchimento dos grãos (a partir de R5), embora a transição de R4 para R5 deva durar apenas alguns dias (COUNCE *et al.*, 2015; COUNCE *et al.*, 2000).

Essas plantas são resultantes do processo de cultura de tecidos e, portanto, não regeneram todas ao mesmo tempo, dificultando as comparações com as plantas controle. Para avaliar mais rigorosamente o fenótipo, deve-se cultivar a rebrota do arroz em condições otimizadas, que favoreçam a produção de sementes, mantendo um aporte adequado de água e de nutrientes, além da temperatura e luminosidade controlados, para se ter certeza de que se trata de um fenótipo e não de um efeito das condições de cultivo.

Se o fenótipo for confirmado, as perspectivas para a continuação deste estudo envolvem a manutenção vegetativa das plantas, avaliação de parâmetros como a viabilidade do pólen e as estruturas florais, além de outras abordagens no intuito de determinar as causas da não produção de sementes. Algumas plantas dessa transformação já estão sendo cultivadas em sala de cultivo com condições controladas e serão analisadas na continuação deste projeto.

CAPÍTULO 2

Caracterização dos fatores de transcrição reguladores da expressão de *OsHLH35* em arroz

1. Os fatores de transcrição GRF

Os GRFs são fatores de transcrição codificados por pequenas famílias gênicas, e estão envolvidos em uma série de processos no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Os GRFs são caracterizados pela presença obrigatória de dois domínios chamados QLQ (Gln, Leu, Gln) e WRC (Trp, Arg, Cys). O domínio QLQ, contém o motivo QX3LX2Q e está localizado na porção N-terminal da proteína. Esse domínio foi nomeado devido a sua presença na subunidade catalítica SNF2/SWI2, que faz parte do complexo de remodelamento da cromatina SWI/SNF (Swith/ Sucrose non-Fermentable) (VAN DER KNAAP *et al.*, 2000).

O domínio WRC está sempre localizado após o domínio QLQ e possui o motivo de ligação ao DNA CX9CX10CX2H, um dedo de zinco do tipo C3H, presente no repressor do elemento GA Response Element 5, HRT de cevada (RAVENTÓS, 1998). Além desses domínios obrigatórios, podem estar presentes outros três domínios, FFD (Phe, Phe, Asp), TQL (Thr, Gln, Leu) e GGPL (Gly, Gly, Pro, Leu) (KIM *et al.*, 2003; VAN DER KNAAP *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2008).

Devido à presença do motivo dedo de zinco, o domínio WRC é reportado como responsável pela ligação ao DNA, enquanto que o domínio QLQ é responsável pela interação com proteínas. Os outros domínios ainda não tiveram suas funções caracterizadas (HOE KIM & TSUKAYA, 2015; KIM & KENDE, 2004).

A caracterização dessa família iniciou com o estudo do gene *OsGRF1*, o primeiro GRF identificado. No primeiro estudo realizado, a expressão desse gene estava induzida em plantas de arroz em resposta à giberelina e sua expressão em plantas de arabidopsis levou a um fenótipo anão, sugerindo a participação desse FT na regulação do crescimento vegetal (VAN DER KNAAP *et al.*, 2000).

Diversos estudos posteriores mostraram que esses FT estão envolvidos no crescimento e no desenvolvimento das plantas, e que suas funções podem depender da regulação da sua atividade por meio da interação com as proteínas da família GIF (GRF interacting factor) e também em nível de expressão, por meio da regulação pelo miRNA396 e por fatores de transcrição

(DEBERNARDI *et al.*, 2014; JONES-RHOADES & BARTEL, 2004; KIM & KENDE, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2010).

Sabe-se que os GRFs podem interagir com a família de proteínas GIF (GRF interacting factor). O primeiro membro da família GIF foi identificado em *Arabidopsis*, AtGIF1, também conhecido como AN3 (ANGUSTIFOLIA). AtGIF1 é um coativador que pode atuar em conjunto com GRFs na regulação do crescimento e no desenvolvimento das plantas (HORIGUCHI *et al.*, 2005; KIM & KENDE, 2004). O homólogo de GIF em humanos, SYT (human synovial translocation), também atua como coativador e tem a capacidade de interagir com as proteínas SNF2/SWI2, assim como AtGIF1 (DEBERNARDI *et al.*, 2014; KIM & KENDE, 2004; NAGAI *et al.*, 2001).

Alguns membros da família GRF são negativamente regulados em nível pós-transcricional pelo miR396 (JONES-RHOADES & BARTEL, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2010) e essa regulação é importante em diferentes aspectos do desenvolvimento, tais como a coordenação entre a divisão e a diferenciação celular durante o crescimento da folha (WANG *et al.*, 2011), a organogênese floral (LIU *et al.*, 2014a); a coordenação entre desenvolvimento e resposta a estresses (LIU *et al.*, 2017); entre outros.

Esse miRNA responde a diferentes condições de estresse abiótico, tais como salinidade, seca, frio, luz UV-B, e de estresse biótico, como ataque de nematoides e de fungos (CASADEVALL *et al.*, 2013; CASATI, 2013; HEWEZI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2008, 2014b, 2017; SOTO-SUÁREZ *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2012) e possui outros alvos além dos GRFs, tais como a proteína AtbHLH74 (BAO *et al.*, 2014), as ceramidases (LIU & YU, 2009), além de outros alvos preditos em soja, como proteínas de choque térmico, fatores de alongação, entre outros (KULCHESKI *et al.*, 2016).

Além disso, o miRNA396 também é regulado pela família TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA and PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN FACTOR1) (SCHOMMER *et al.*, 2014), que também exerce regulação da expressão de GRFs e de GIFs de forma direta. Adicionalmente, os GRFs podem afetar os níveis de miRNA396, regulando a expressão de outros GRFs (HEWEZI *et al.*, 2012).

Diversos membros da família GRF já foram caracterizados. AtGRF1, AtGRF2 e AtGRF3 atuam na regulação do desenvolvimento de cotilédones e

no crescimento das folhas, por meio do aumento do tamanho e do número de células (DEBERNARDI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2003). AtGRF4 também possui uma função no desenvolvimento, estando envolvido com a proliferação celular em folhas, desenvolvimento do embrião e do meristema apical da parte aérea (KIM & LEE, 2006). AtGRF5 atua na proliferação celular no primórdio foliar, e sua superexpressão originou plantas com folhas de tamanho aumentado (HORIGUCHI *et al.*, 2005). Por sua vez, o gene *ZmGRF10* codifica um GRF com uma porção C-terminal extremamente reduzida e sua superexpressão em milho deu origem a plantas com folhas menores devido à diminuição da proliferação celular ((WU *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2008).

Além disso, acredita-se que os GRFs tenham um papel no atraso da senescência foliar (DEBERNARDI *et al.*, 2014; VERCRUYSEN *et al.*, 2015) e que AtGRF5 estimule a divisão de cloroplastos, o aumento nos níveis de clorofila e a elevação das taxas de fotossíntese (VERCRUYSEN *et al.*, 2015). Os GRFs também atuam na repressão da expressão dos genes KNOX1 (KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN), importantes reguladores da função meristemática e de vias hormonais em angiospermas (SCOFIELD *et al.*, 2008; TSUDA & HAKE, 2015; TSUDA *et al.*, 2011), e essa função repressora é conservada em, pelo menos, *Arabidopsis*, arroz, e cevada (KUIJT *et al.*, 2014).

Sabe-se que a defesa das plantas a condições estressoras pode prejudicar o seu desenvolvimento; porém, os mecanismos moleculares envolvidos nessa complexa regulação entre crescimento e defesa ainda não estão completamente elucidados (GANGAPPA *et al.*, 2017; HERMS & MATTSON, 1992; PANGESTI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2012).

Nesse sentido, um número crescente de estudos sugere a importância dessa família na coordenação entre defesa e desenvolvimento em condições de estresse. Estudos anteriores demonstraram que AtGRF7 reprime a transcrição de genes de resposta a estresses osmóticos como o DREB2A (KIM *et al.*, 2012), um ativador transcricional de genes envolvidos nas respostas a estresses, tais como seca, sal e frio. DREB2A é regulado, tanto a nível transcricional quanto a nível proteico, para evitar sua acumulação em condições normais de desenvolvimento, garantindo o crescimento normal da planta (SAKUMA *et al.*, 2002, 2006).

Já foi descrito um *cis*-elemento de ligação de GRFs, possuindo a sequência de DNA “TGTCAG” identificado no promotor de *AtDREB2A* e confirmado pela análise do cistroma de *Arabidopsis* (KIM *et al.*, 2012; O’MALLEY *et al.*, 2016). Em arroz, o *cis*-elemento ainda não foi caracterizado; porém, sabe-se que o promotor do gene *Oskn2*, regulado por GRFs, possui repetições da sequência “CAG” ou o reverso complementar “CTG” (KUIJT *et al.*, 2014), presente no *cis*-elemento de ligação de *AtGRF7*.

Nosso grupo identificou três fatores de transcrição da família GRF, *OsGRF3*, *OsGRF4* e *OsGRF11*, em *screenings* de mono-híbrido em levedura, por meio da ligação ao promotor de gene *OsbHLH35*. Os dois primeiros, *OsGRF3*, *OsGRF4*, possuem a sequência alvo de reconhecimento do miRNA396 e, portanto, são alvos putativos desse miRNA, enquanto que *OsGRF11* não possui esse sítio.

OsGRF3 e *OsGRF4* já foram caracterizados em estudos anteriores e, portanto, já foram desvendadas algumas de suas funções. Um primeiro estudo caracterizou *OsGRF3* e *OsGRF10* como reguladores da expressão do gene *KNOX* de classe 1, *Oskn2*, e mostrou que essa função é conservada para outros FTs da família, tais como *AtGRF4*, *AtGRF5* e *AtGRF6* de *Arabidopsis*, e *GRF1* cevada (KUIJT *et al.*, 2014).

No intuito de caracterizar esses FTs, os autores superexpressaram *OsGRF3* e *OsGRF10* separadamente, o que levou a fenótipos aberrantes do desenvolvimento, tais como maior perfilhamento e a formação ectópica de raízes e de folhas nos nós, evidenciando um descontrole da atividade meristemática. Além disso, foi observado um fenótipo na formação de inflorescências.

As plantas com fenótipos menos severos tiveram atrasos de aproximadamente 2 semanas, enquanto que algumas linhagens da superexpressão de *OsGRF3* apresentaram atrasos de até 3 meses, e, em alguns casos, atingiram a senescência com as inflorescências ainda dentro das bainhas. Além disso, os autores geraram plantas duplamente silenciadas nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4*, utilizando uma construção específica para o gene *GRF1* de cevada, que possuía 93%, 85%, 73% de identidade com *OsGRF3*, *OsGRF4* e *OsGRF5*. Essas plantas também apresentaram fenótipos de desenvolvimento, como tamanho reduzido e menor perfilhamento,

acompanhado pelo aumento na expressão os genes *Oskn1*, *Oskn2* e *Oskn3* (KUIJT *et al.*, 2014)..

Trabalhos recentes identificaram variações do gene *OsGRF4* como responsáveis por fenótipos de desenvolvimento de grãos e de panículas, associadas a QTLs em diferentes cultivares de arroz (CHE *et al.*, 2015; DUAN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016).

Hu e colaboradores (2015) identificaram o QTL *GS2* da ssp. *Indica* cv. Baodali como responsável pelo maior comprimento e largura dos grãos nessa cultivar. Ao mapear essa sequência, os autores identificaram o locus de *OsGRF4* e a análise por sequenciamento revelou que o gene contém 4 polimorfismos nessa cultivar, sendo que uma mutação de 2 pares de bases (TC487-488AA) no sítio de reconhecimento de miRNA396, levando a uma maior expressão do gene, que é acompanhada por um aumento na expressão de genes de ciclo celular, resultando em grãos maiores e mais pesados.

Em outro estudo foi identificado o QTL *GS2* da ssp. *Indica* cv. Judali como responsável por um aumento do tamanho e no peso dos grãos nessa cultivar. O QTL também possuía o locus de *OsGRF4* contendo a mutação no sítio de reconhecimento do miRNA396. A análise de mais duas cultivares com grãos maiores, Kuangsijiadi e Chuandali, mostrou resultados semelhantes. Os autores também mostraram que *GS2* interage com os três GIFs presentes em arroz, e que a superexpressão de *OsGIF1* também resultou no aumento do tamanho e do peso dos grãos. Além disso, a análise fenotípica mostrou que o alelo *GS2* contendo a mutação atua predominantemente promovendo expansão celular e também proliferação celular, levando ao aumento no tamanho e no peso dos grãos (DUAN *et al.*, 2015).

Outro estudo mostrou que o QTL *GL2* da cultivar RW11 também codificava *OsGRF4*, e a superexpressão do gene em Nippobare originou plantas com sementes maiores e mais pesadas, com fenótipos consistentes com o nível de expressão do gene. Além disso, foi demonstrado que *OsGRF4* possui atividade ativadora da transcrição em levedura, e essa atividade é inibida por *GSK2*, um regulador negativo da via de sinalização de brassinoesteroides. Essa inibição estaria associada à regulação do comprimento do grão pelo hormônio (CHE *et al.*, 2015).

Na mesma linha, um estudo identificou o QTL GLW2 em uma linhagem produtora de grãos maiores, 307R. Esse QTL também codifica *OsGRF4* contendo a mesma mutação no sítio de miRNA396, diminuindo a eficiência de clivagem e o cruzamento com outras linhagens mostrou que o locus *GLW2* levava ao aumento da produtividade no campo (LI *et al.*, 2016). Outro trabalho identificou o QTL PT2 na variedade Chuandali, codificando *OsGRF4* com as mesmas características. A superexpressão do gene originou células maiores com maior conteúdo de citocininas, e afetou a expressão de genes de ciclo celular, originando plantas com grãos maiores (SUN *et al.*, 2016).

2. O fator de transcrição IDEF1

O ferro é um mineral muito importante para o crescimento vegetal, porém, devido ao fato de participar da Reação de Fenton, os níveis de ferro livre devem ser controlados. Sendo assim, as plantas devem regular a homeostase de ferro e responder tanto à deficiência quanto ao excesso desse metal (MORRISSEY & GUERINOT, 2009).

Existem dois mecanismos principais de absorção de ferro pelas raízes das plantas em situações de deficiência desse mineral. A estratégia I ocorre em todas as espécies de plantas, exceto nas gramíneas, e é baseada na redução de quelatos férricos e na absorção do ferro ferroso pela membrana das raízes. Também ocorre a liberação de compostos fenólicos e de prótons, acidificando o solo, aumentando a solubilidade do ferro férrico reduzindo-o para a forma ferrosa (Fe^{2+}). A estratégia II é específica de gramíneas e conta com a secreção de fitossideróforos, uma classe especial de moléculas quelantes de Fe^{3+} , e o transporte desse complexo por transportadores específicos localizados na membrana plasmática das células das raízes. O arroz, em adição à estratégia II, possui o transportador OsIRT1, que possibilita a absorção de Fe^{2+} , abundante em condições anaeróbicas e de submersão, como ocorre no cultivo irrigado (MARSCHNER & RÖMHELD, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 2012).

IDEF1 (Iron Deficiency-responsive Element-binding Factor 1) é um fator de transcrição pertencente à família ABI3/VP1, envolvido nas respostas e na tolerância à deficiência de ferro em plantas. Esse FT reconhece e se liga à

sequência “CATGC” (KOBAYASHI *et al.*, 2007) contida no *cis*-elemento de resposta à deficiência de ferro IDE1 (KOBAYASHI *et al.*, 2003).

IDEF1 participa da estratégia II de aquisição de ferro, e é responsável pela ativação de genes de resposta à deficiência desse metal, juntamente com IDEF2; porém, os dois fatores de transcrição regulam diferentes conjuntos de genes. Ambos os genes são expressos de forma constitutiva e não são induzidos pela deficiência de ferro (KOBAYASHI *et al.*, 2007, 2009, 2010; OGO *et al.*, 2007).

Entre os alvos de IDEF1 durante as fases iniciais da deficiência de ferro está o gene *OsIRO2*, que codifica um FT bHLH que regula a expressão de diferentes genes relacionados à absorção e ao transporte de ferro em arroz, tais como *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1*, *TOM1* e *OsYSL15* (OGO *et al.*, 2007, OGO *et al.*, 2011; KOBAYASHI *et al.*, 2009, 2012). Durante os estágios subsequentes da deficiência de ferro, IDEF1 regula outros alvos, como os genes LEA (Late embryogenesis abundant), que, em plantas, acumulam-se nos estágios finais da embriogênese e em órgãos vegetativos em resposta a variações ambientais, especialmente a desidratação (BATTAGLIA & COVARRUBIAS, 2013; HONG-BO *et al.*, 2005; HUNDERTMARK & HINCHA, 2008). Esse acúmulo é devido, provavelmente, pela regulação da expressão pela transativação do *cis*-elemento “CATGCA”, conhecido como RY-element, quase idêntico ao elemento de ligação de IDEF1 “CATGC” (KOBAYASHI *et al.*, 2009).

Entre os genes de resposta à deficiência de ferro, os fatores de transcrição da família bHLH desempenham importantes funções. Em *Arabidopsis*, FIT (FER-LIKE FE DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) é uma bHLH que regula diretamente a transcrição do gene *FRO2*, que codifica a ferro quelato redutase, e do gene que codifica o transportador *IRT1* (iron-regulated transporter 1), e é regulado a nível transcricional e pós transcricional para garantir as respostas em condições de deficiência de ferro. Além disso, pode formar heterodímeros com diferentes bHLHs, tais como AtbHLH38, AtbHLH39, AtbHLH100 e AtbHLH101, ativando a expressão dos genes alvo em *Arabidopsis* (SIVITZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2008). Outra bHLH, POPEYE, também está envolvida na homeostase de ferro nessa espécie (LONG *et al.*, 2010). Em arroz, as bHLHs *OsIRO2* e

OsIRO3 são importantes reguladoras das respostas à deficiência de ferro (KOBAYASHI *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2010).

Sabe-se que o gene *IDEF1* é constitutivamente expresso em diferentes tecidos durante as fases vegetativa e reprodutiva do arroz (KOBAYASHI *et al.*, 2010), e que sua expressão é regulada em nível proteico por meio de degradação pelo proteossomo 26S (TAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014), provavelmente por meio da atividade de CSN6, uma subunidade do complexo signalossomo COP9 (TAN *et al.*, 2016).

Essa degradação é prevenida pela interação com a proteína IBP1 (IDEF1-Binding protein / Bowman–Birk Trypsin Inhibitor). Portanto, especula-se que, em condições de suficiência de ferro, a proteína IDEF1 seja degradada, afetando a ativação da transcrição dos seus genes alvo. Já em condições de deficiência de ferro, a proteína IBP1 interage com IDEF1, prevenindo a sua degradação e, conseqüentemente, permitindo uma maior indução da expressão dos seus genes alvo (ZHANG *et al.*, 2014).

Devido ao fato de não ter sua expressão regulada em nível transcricional pela deficiência de ferro, Kobayashi e colaboradores (2012; 2015) sugerem que IDEF1 seja um sensor de ferro intracelular, por meio da ligação desse e de outros metais divalentes a duas regiões importantes para a atividade da proteína durante as respostas iniciais à deficiência de ferro em arroz.

O modelo proposto para a atividade de IDEF1 como sensor é de que, em condições de suficiência de ferro, mais íons desse metal se ligariam a IDEF1, enquanto que em condições de deficiência, outros metais se ligariam com maior abundância, promovendo um aumento da transcrição dos genes alvo. Já nas fases tardias de deficiência, em concentrações muito baixas de ferro, haveria uma prevalência de ligação de outros metais e IDEF1 regularia, além dos alvos contendo o *cis*-elemento IDE1, outros genes regulados pelo RY-element.

Além disso, a superexpressão de *OsIDEF1* sob controle do promotor 35S em arroz origina plantas com tamanhos menores durante as fases iniciais de desenvolvimento, além de sementes com uma taxa de germinação extremamente baixa. Por outro lado, a superexpressão do gene com a deleção das duas regiões envolvidas na ligação de metais reverteu parcialmente os fenótipos da superexpressão da sequência completa, sugerindo a importância

da ligação de metais a essas regiões no controle da atividade de IDEF1 (KOBAYASHI *et al.*, 2012).

No intuito de contribuir com a caracterização dessas importantes famílias de fatores de transcrição, neste capítulo, avaliou-se a ligação de três fatores de transcrição desta família em arroz, OsGRF3, OsGRF4 e OsGRF11 ao promotor do gene alvo putativo, *OsbHLH35*, assim como a ação de OsGRF11 e de OsIDEF1 na regulação da transcrição do gene *OsbHLH35*. Além disso, foram geradas diferentes linhagens de plantas superexpressando o gene *OsGRF11* e foi realizada uma análise de plantas de arroz duplamente silenciadas nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4* via RNAi.

3. Resultados

3.1. Identificação de *cis*-elementos no promotor de *OsbHLH35*

A região de 1600 pb anteriores ao ATG foi analisada quanto à presença dos *cis*-elementos conhecidos pela ligação de GRFs e de IDEF1. O fator de transcrição *OsIDEF1* já foi caracterizado quanto às respostas à deficiência de ferro em arroz, por meio da ligação ao *cis*-elemento “CATGC” (Iron Deficiency Element, IDE) e ao RY-element, “CATGCA” (KOBAYASHI *et al.*, 2007, 2009). O fator de transcrição AtGRF7 possui um *cis*-elemento alvo caracterizado, “TGTCAGG”, identificado no promotor do gene DREB2A. Porém, esses experimentos não demonstraram que a guanina na posição 7 seja de fato indispensável. Além disso, a análise do cistroma de arabidopsis sugere uma configuração “TGTCAG(G/A)”. Por isso, foi realizada uma análise *in silico* buscando pelas bases chave do *cis*-elemento, “TGTCAG”.

Foram encontrados cinco *cis*-elementos de ligação a IDEF1, “CATGC”, sendo que três deles estão localizados no fragmento utilizado para os experimentos de mono-híbrido. No total, quatro desses correspondem ao RY-element, dois deles no fragmento utilizado em nossas análises posteriores. Também foram localizados três *cis*-elementos de ligação de AtGRF7, na configuração “TGTCAG(A)”, um deles no fragmento utilizado para os experimentos de mono-híbrido (Figura 20).

AGGGACGAGTAAATCATGCAATCGATTTGTCGTCTCCCTCTCTCACGAACAGTGCATATTTGCG
GCTTCTTGGGCAGCTTGTTCGACCACCTGGTGATGAACTCCCAAAGTCCCAAAGTTTACATGCAAA
GCTACCGGAATACTAAGCCAATGAGACCATGAGAGCCATCCCTCTTGTAAATTTCTTGAATCT
TTTGAATCTTGGCATCTTTTCTAGCTGTTCTTCTGTTTCATGAGTCAATGGTGAACCATTTCAA
TTGTGCATGTCAGATCCTTCTGAAGAGTAGTCTGAATGAAGTATTGGGAATTTGGGACAAA
GACTAACATTCGACGTTAATTCTGACCTCACATGTTGTCATTGGAAAAATTGGGTAGTAGGACA
AGAAGACATAAACACAGCAACCATCAGAAGATAAGTTCGAGTGAACAGTGTTCCTTCTGTGAGT
TTCAGATAGGAAAATTGACGCATTTCGATGACAGTGTGAAACTGAATCATATGCATAAGCACAA
GACCCGTCAATCATTTCATAAAGGATCCAAAGGCCTCTCTCCTGCGAAGTTGCTTGTAAATTGA
GTGTGAAAGAGAGATGTTTTGCTTCAGCTAAAGGCCAAGACTGTCACTGTTGGAGCCTGTACTC
CATGAAAACCTATTTAATCGTGTCTCTATCCCTCTGTCTCGTTCGGAGGAAATGCTTGAAACAT
TAGTCAATGAATTGCATGACTTTTTCTGACGAGCTAACCAATTCAAGAAGAGGACTCTTGTGGC
CTCCCTGCTGCCTGATCTCCATTGTTTTCATAAGTCCTTGGCCGATCACATGTCCAAAGGGTAA
TTCATCAAGTTTACGCAACAAGAAAGATATCTTATAACCACAGATAATTACTGACAAGTCAGTGC
AAACCATTGCTCTTAACACTTCAGTTCTTTGTGTACATCTGTGTACCCTTTTACCCTGGCAAA
GCACAAAATACTTTGCACATTATCTGACTGGAGAAAAATGGCATTTAGTAATTACTAGGGAGTT
ACCCACGATAAAAATTTTCATGATACAGTTATCCTGTCCAGACATATTGGTTGGTTACAGTCTGA
AATCATCTGAATCCTTATCAGAACAGACTCATAAACCATTGTGTCAGACTTTTCTACACATCCT
ACTCATGACACACTCATGCAATGCCACCTCATCCAGTGGGCCAGGAGGACAAACCATGCCAATC
CAAAGAACTTTCTCTTAGTCTTTGTGGGGGACACATGTAAGAAAAAGGGACATGCATATATAG
GGTGGTTGGCCAGTAAAAAGTGTAGAACACTTAGCATAACCAATTATCATGTACATGAAGTGATC
AAATCTCACCCACAAGCATATCTCTCGCACCATTCCACCCTATAGAAACGAGATAACAAGACGC
TGTTTTGCACTAGCTATTGTAAGCTCCATCTCACTTTCACTTCGTTTTCTTGTCTTGTGCATC
ATTTCTTGACAAGTGCAGTTGTTCTTGATGCTGTTTCTTCATCTGATCCATCTCATTTTCCCCT
GTTACTGCAGTGACAGCCGACAAGAACCAGTTAGGTAAAACCTAGTAGGATGCAGGTTTGAATG

Figura 20 - Região de 1600pb da sequência promotora de *Osb**H**L**H35***

Em verde e em azul, os fragmentos do promotor utilizados para construção das iscas F1.2 e F2, respectivamente. O *cis*-elemento IDE, “CATGC”, e o RY element, “CATGCA”, correspondentes aos sítios de ligação do fator de transcrição IDEF1. O *cis*-elemento “TGTCAG” correspondente ao sítio de ligação dos fatores de transcrição GRF.

3.2. Confirmação da ligação dos Fatores de Transcrição GRF ao promotor de *Osb**H**L**H35***

No intuito de confirmar as interações entre os Fatores de Transcrição da família GRF e o promotor do gene que codifica bHLH35, foram realizados experimentos de mono-híbrido direto. Para isso, foi obtido o DNA plasmidial a partir de culturas líquidas de *Saccharomyces cerevisiae* da estirpe Y187 contendo os clones de interesse, isolados nos *screenings*.

Cada plasmídeo foi transformado nas leveduras contendo as iscas previamente integradas no genoma. Foram isoladas oito colônias resultantes

de cada transformação para verificação de interação por mono-híbrido direto em levedura. A isca F1.2 não possui *cis*-elementos de interação com os fatores de transcrição da família GRF e, devido a isso, foi possível utilizá-la como controle de especificidade de ligação, conforme protocolo descrito anteriormente (OUWERKERK & MEIJER, 2001).

Como era de se esperar, não foi observada interação entre GRFs e o promotor do gene *bHLH35* nesse meio (Figura 21). A confirmação da ligação de IDEF1 a esse fragmento foi realizada anteriormente (LAZZAROTTO, dados não publicados).

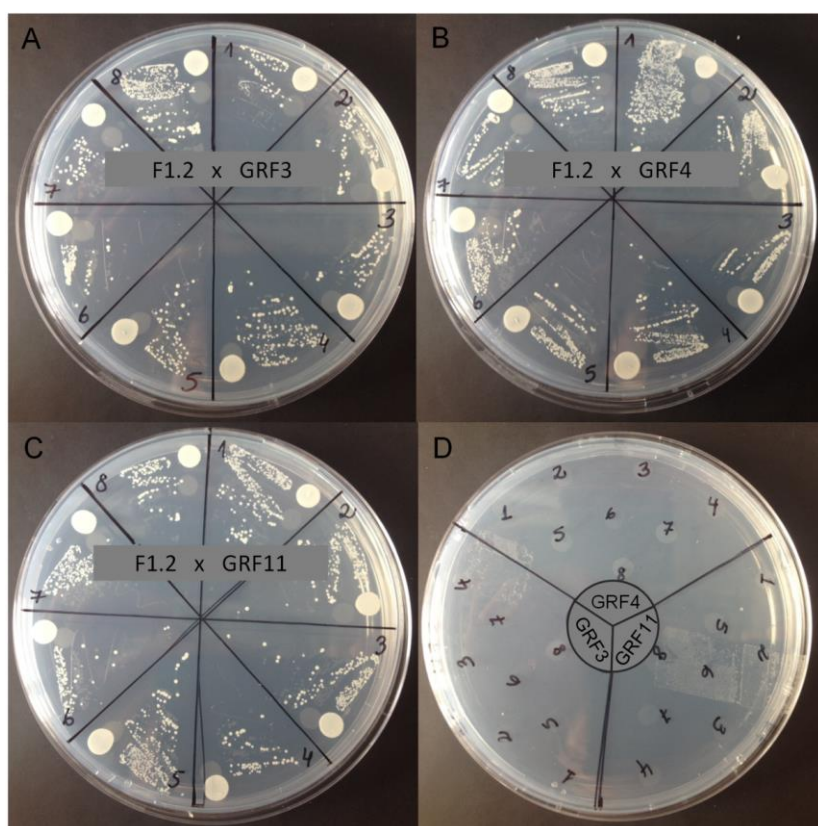


Figura 21 - Teste de interação da isca F1.2 com GRFs

A, B, C. Análise da presença dos plasmídeos e da viabilidade celular em meio mínimo em leveduras contendo a isca F1.2 e os plasmídeos presa correspondentes aos fatores de transcrição GRF3, GRF4 e GRF11, respectivamente. As leveduras foram cultivadas em meio CM suplementado com histidina (CM-L). Foram cultivadas oito colônias independentes para cada transformação. D. Teste para confirmação de interação. As mesmas leveduras foram cultivadas em meio CM sem suplementação com leucina e histidina (CM-LH) contendo 5 mM de 3-AT para verificação das interações por meio de mono-híbrido em levedura.

A isca F2 possui um *cis*-elemento de ligação a GRFs, e os fatores de transcrição da família GRF foram identificados por meio da ligação a esse fragmento (CASTILHOS, 2014; CASTILHOS & LAZZAROTTO, dados não publicados). Foram utilizadas no experimento oito colônias de cada transformação, que foram inoculadas em meio CM-L para verificação da presença dos plasmídeos e da viabilidade celular em meio de cultura mínimo. Esse ensaio mostrou que todas as colônias escolhidas foram capazes de crescer em meio mínimo suplementado com histidina e, portanto, são viáveis e possuem os plasmídeos.

A confirmação das interações entre os fatores de transcrição e a sequência isca se deu pela inoculação das mesmas leveduras em meio CM-LH contendo 5mM de 3-AT (Figura 22).

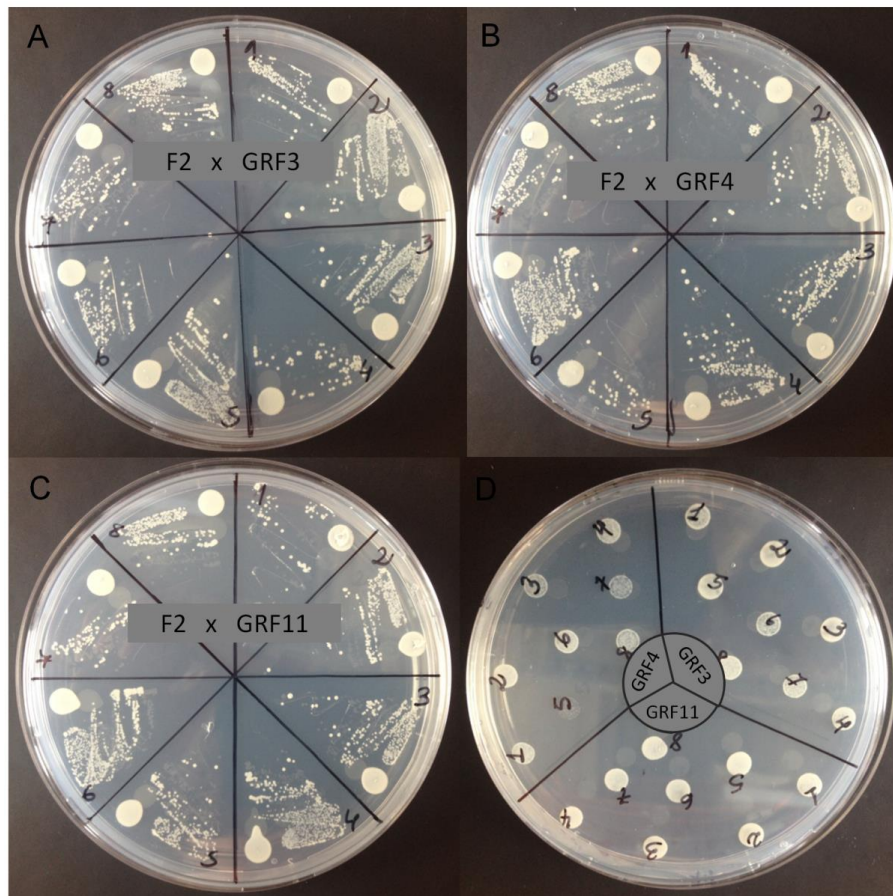


Figura 22 - Teste de interação da isca F2 com GRFs

A, B, C. Análise da presença dos plasmídeos e da viabilidade celular em meio mínimo em leveduras contendo a isca F2 e os plasmídeos presa correspondentes aos fatores de transcrição GRF3, GRF4 e GRF11, respectivamente. As leveduras foram cultivadas em meio CM suplementado com histidina (CM-L). Foram cultivadas oito colônias independentes para cada transformação. D. Teste para confirmação de interação: As mesmas leveduras foram cultivadas em meio CM sem suplementação com leucina e histidina (CM-LH) contendo 5 mM de 3-AT para verificação das interações por meio de mono-híbrido em levedura.

As leveduras contendo as iscas F2 e os clones confirmados no experimento anterior foram submetidas a concentrações crescentes de 3-AT fim de titular as interações. As leveduras contendo os plasmídeos presa correspondentes a GRF3 e GRF11 foram capazes de crescer até 60mM de 3-AT, pelo menos, enquanto que as leveduras contendo o plasmídeo presa correspondente a GRF4 tiveram o crescimento bastante reduzido em 20mM de 3-AT e, acima dessa concentração, não cresceram (Figura 23).

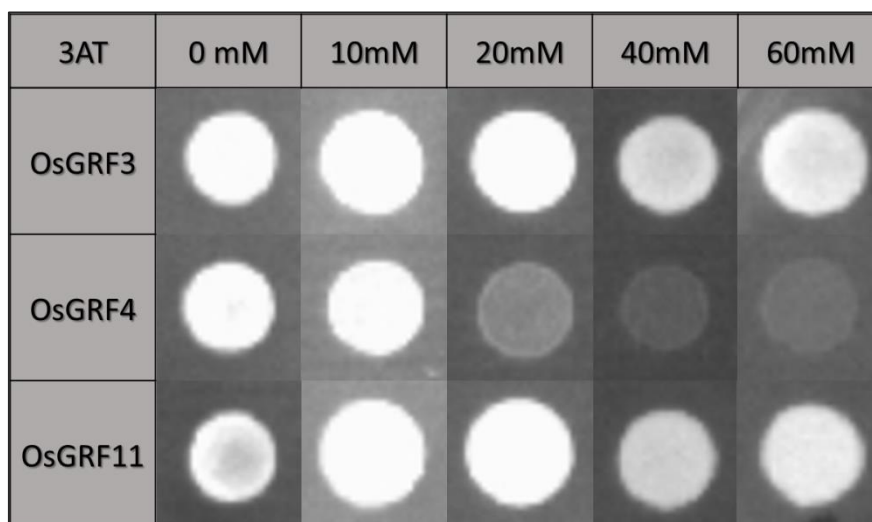


Figura 23 – Ensaio de titulação da interação de GRFs com a isca F2.

As leveduras contendo a isca F2 e as presas GRF3, 4 e 11 foram inoculadas em meio CM-LH ou em meio CM-LH contendo 3-AT nas concentrações de 10mM, 20mM, 40mM e 60mM. As leveduras contendo os plasmídeos presa correspondentes a GRF3 e GRF11 foram capazes de crescer até 60mM de 3-AT, enquanto que as leveduras contendo o plasmídeo presa correspondente a GRF4 foram capazes de crescer bem até 10mM de 3-AT e em concentrações a partir de 20mM de 3-AT tiveram seu crescimento reduzido.

3.3. Análise da ação dos FTs na transcrição de *OsbHLH35* por meio de ensaios de transativação em protoplastos.

Após a confirmação da ligação ao promotor de *bHLH35* nos experimentos de mono-híbrido direto por *GRF11*, neste estudo, e *IDEF1*, em estudo anterior (LAZZAROTTO, dados não publicados), foi avaliada a ação dessas interações por meio de ensaio de transativação em protoplastos.

Esse ensaio consistiu na obtenção de protoplastos a partir de culturas de células de *A. thaliana* e a transformação dos mesmos com diferentes combinações de plasmídeo repórter e de plasmídeo efetor. O plasmídeo repórter permite a expressão do gene repórter (GUS) sob controle do promotor do gene *bHLH35*. O plasmídeo efetor, por sua vez, permite a expressão da proteína de interesse, no caso, um fator de transcrição ou a luciferase. A expressão gênica é calculada pela razão entre as leituras GUS/LUC e comparada ao vetor repórter vazio.

No ensaio de transativação entre GRF11 e o promotor de *bHLH35*, observou-se a repressão significativa da transcrição do gene repórter (*gus*) controlado pelo promotor do gene *bHLH035* na presença do efector GRF11, sugerindo que GRF11 seja repressor de bHLH35 (Figura 24).

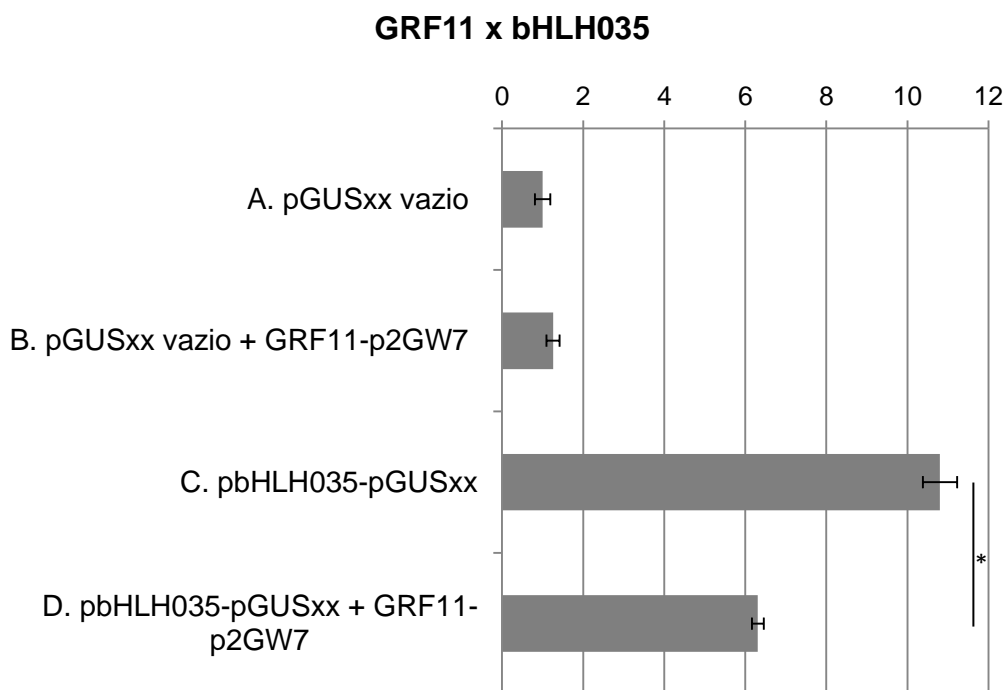


Figura 24 - Experimento de transativação do promotor do gene *bHLH035* pelo fator de transcrição GRF11.

Experimento realizado em protoplastos obtidos de cultura de células de *A. thaliana*. (A) Vetor repórter (pGUSxx vazio). (B) Vetor repórter (pGUSxx vazio) e plasmídeo efector GRF11-p2GW7. (C) Plasmídeo repórter (pbHLH35-pGUSxx). (D) Plasmídeo repórter (pbHLH35-pGUSxx) e plasmídeo efector (GRF11-p2GW7). (A,B,C,D) Plasmídeo LUC (LUC-p2GW7). *Teste T entre “C” e “D”, com $p < 0,01$.

No experimento de transativação entre IDEF1 e o promotor de *bHLH35* não foi observada variação significativa na transcrição do gene repórter (*gus*) controlada pelo promotor do gene *OsbHLH035* na ausência e na presença do efetor IDEF1 (Figura 25).

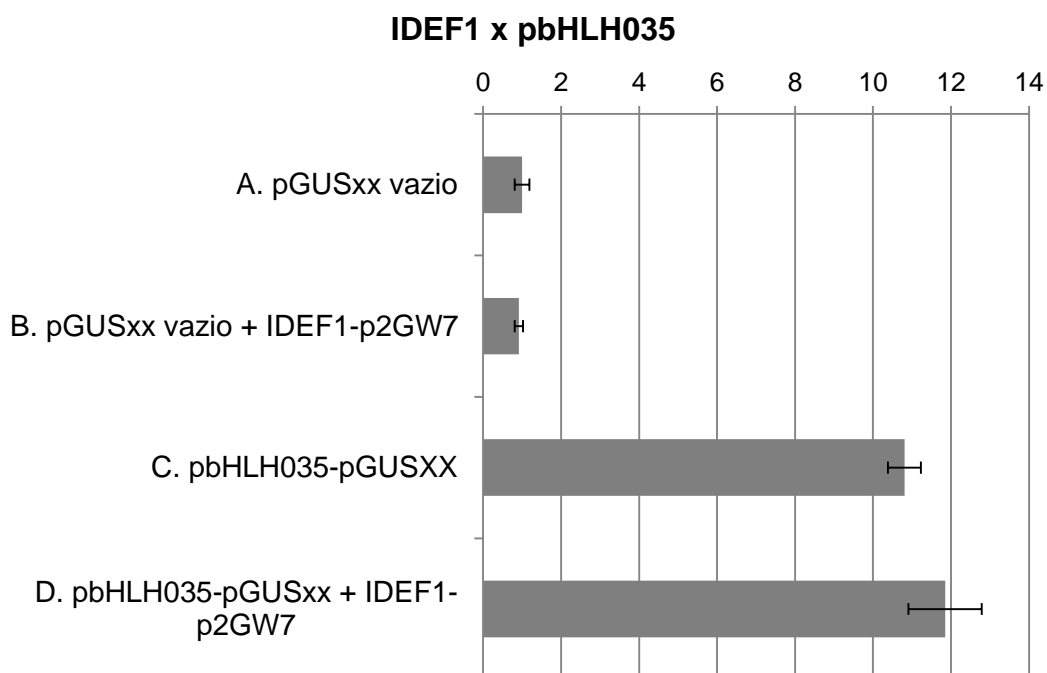


Figura 25 - Experimento de transativação do promotor do gene *bHLH035* pelo fator de transcrição IDEF1.

Experimento realizado em protoplastos obtidos de cultura de células de *A. thaliana*. (A) Vetor repórter (pGUSxx vazio). (B) Vetor repórter (pGUSxx vazio) e plasmídeo efetor IDEF1-p2GW7. (C) Plasmídeo repórter (pbHLH35-pGUSxx). (D) Plasmídeo repórter (pbHLH35-pGUSxx) e plasmídeo efetor (IDEF1-p2GW7). (A, B, C, D) Plasmídeo LUC (LUC-p2GW7). *Teste T entre “C” e “D”, com $p < 0,01$.

3.4. Análise de plantas de arroz duplamente silenciadas nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4*.

Para prosseguir com a caracterização dos fatores de transcrição da família GRF, foram avaliadas duas linhagens de plantas de arroz silenciadas em *OsGRF3* e *OsGRF4*, geradas em um estudo já publicado (KUIJT *et al.*, 2014), gentilmente cedidas pelo Dr. Pieter B. Ouwkerk.

Nesse estudo, os autores mostraram que o silenciamento desses genes leva à redução no crescimento das plantas, provavelmente devido à repressão de um gene da família *KNOX1*. Essas plantas possuem fenótipo de desenvolvimento bastante alterado, sendo que a linhagem 1.2 possui um fenótipo mais severo que a linhagem 1.4 (KUIJT *et al.*, 2014).

O estudo anterior focou no desenvolvimento vegetativo das plantas e, por isso, neste trabalho, foi avaliado o impacto desse fenótipo de desenvolvimento na produtividade da planta. Para isso, foram germinadas sementes de cada uma das linhagens de plantas silenciadas e plantas WT. Após as plantas completarem o desenvolvimento, a produção de panículas pelas plantas silenciadas foi avaliada em relação às plantas WT.

Quando comparada à produção de panículas nas plantas WT, a produção foi de 23% para a linhagem L1.2 e de 60% para a linhagem L1.4 (Figura 26), sugerindo que o duplo silenciamento dos genes *OsGRF3* e *OsGRF4* possa afetar a formação de panículas. Não foram observadas diferenças no tamanho dos grãos entre as linhagens L1.2, L1.4 e as plantas WT (Figuras 27 e 28).

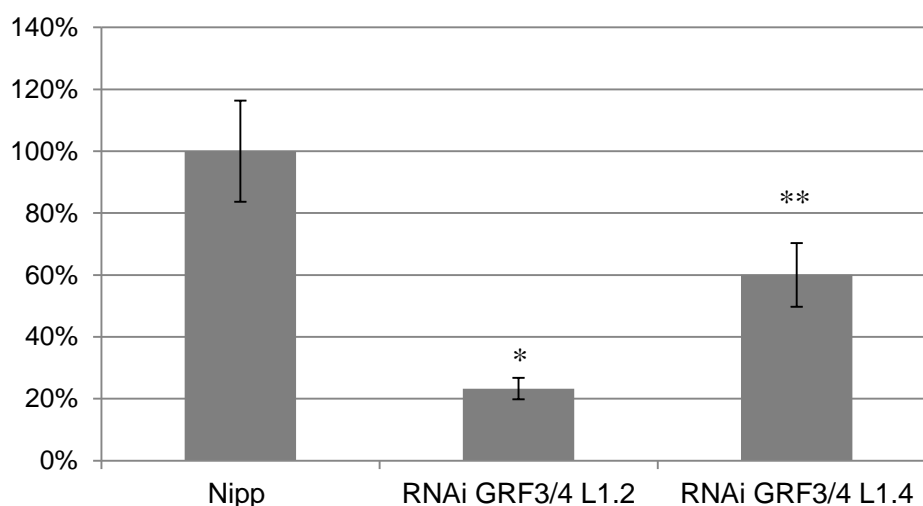


Figura 26 – Produção de panículas nas plantas RNAi *OsGRF3*-*OsGRF4* e WT.

Foram contadas as panículas maduras de plantas duplamente silenciadas nos genes *OsGRF3* e *OsGRF4*. Foram avaliadas 4 plantas WT cv. Niponbare, 10 plantas da linhagem 1.2 e 7 plantas da linhagem 1.4 (RNAi *GRF3/4* L1.2 e L1.4, respectivamente). *Teste-T, $p < 0,001$; **Teste-T, $p < 0,05$.



Figura 27 – Sementes de plantas de arroz RNAi *OsGRF3-GRF4* e Nipponbare WT. (A) Sementes de plantas RNAi *OsGRF3-GRF4* da linhagem L1.2. (B) Sementes de plantas RNAi *OsGRF3-GRF4* da linhagem L1.2. (C) Sementes de plantas Nipponbare WT. Imagem com redução de brilho (20%).

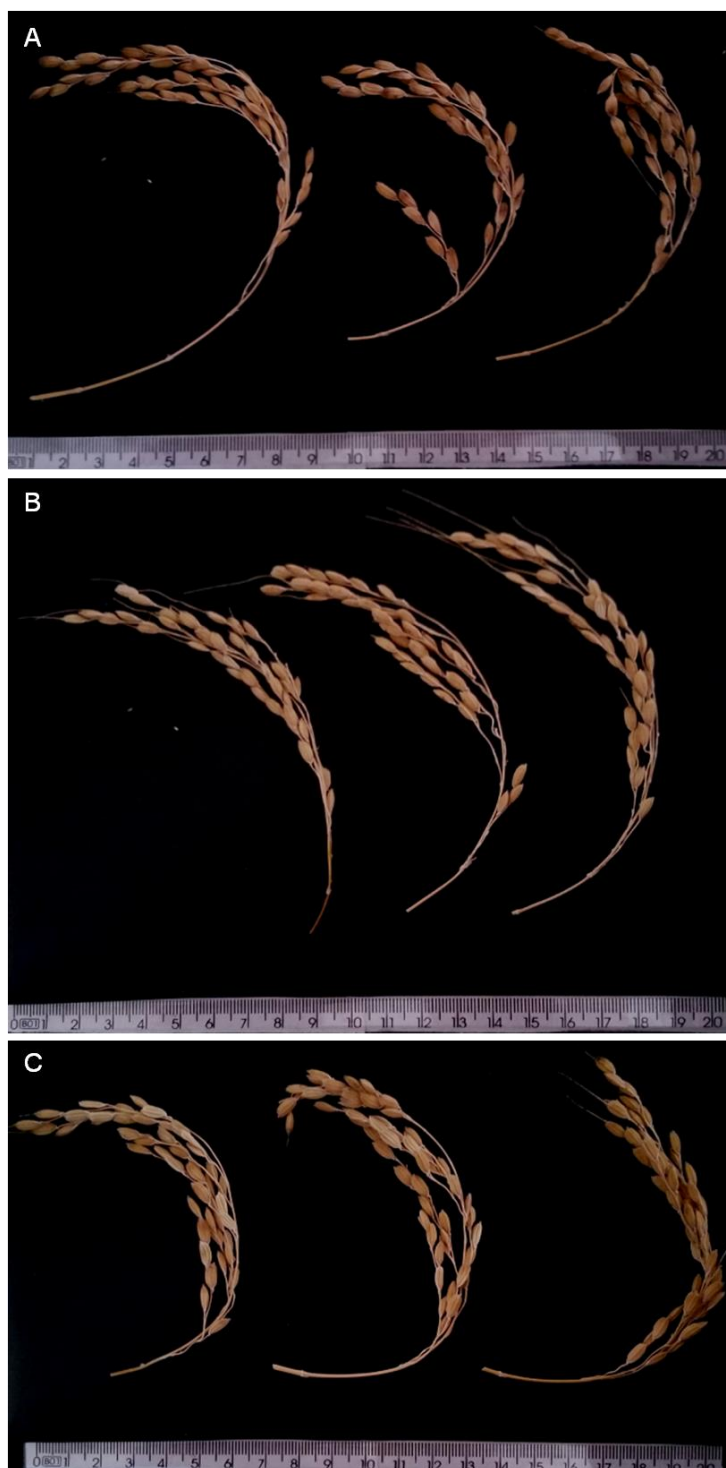


Figura 28 – Panículas das plantas WT e RNAi *OsGRF3-OsGRF4*.

(A) Panículas representativas das plantas WT cv. Nipponbare. (B) Panículas representativas das plantas RNAi *OsGRF3-GRF4*, linhagem L1.2. (C) Panículas representativas das plantas RNAi *OsGRF3-GRF4*, linhagem L1.4. Imagens com redução de brilho (20%).

3.5. Geração de plantas de arroz superexpressando *OsGRF11*.

No intuito de avançar com a caracterização funcional da família GRF, foram obtidas diferentes linhagens de plantas de arroz ssp. Japonica cv. Nipponbare superexpressando o gene *OsGRF11*, sob controle do promotor do gene *ZmUbi*, utilizando os plasmídeos pANIC6A e pANIC6B (MANN *et al.*, 2012).

Utilizando o protocolo de transformação padronizado neste trabalho, foram obtidas oito linhagens de calos resistentes à higromicina para a construção *GRF11*-pANIC6A e vinte e uma linhagens de calos resistentes para a construção *GRF11*-pANIC6B. Assim como ocorreu com as plantas de superexpressão do gene *bHLH35*, diversas linhagens foram perdidas no processo, restando ao final sete linhagens de plantas para a construção *OsGRF11*-pANIC6A e seis linhagens para a construção *OsGRF11*-pANIC6B.

O desenvolvimento vegetativo das plantas foi aparentemente normal para o que se espera de plantas regeneradas a partir de calos (Figura 15). Após a fase vegetativa, as plantas geraram panículas; porém, até o momento do fechamento desta tese, não deram origem a sementes (Figuras 29 e 30).

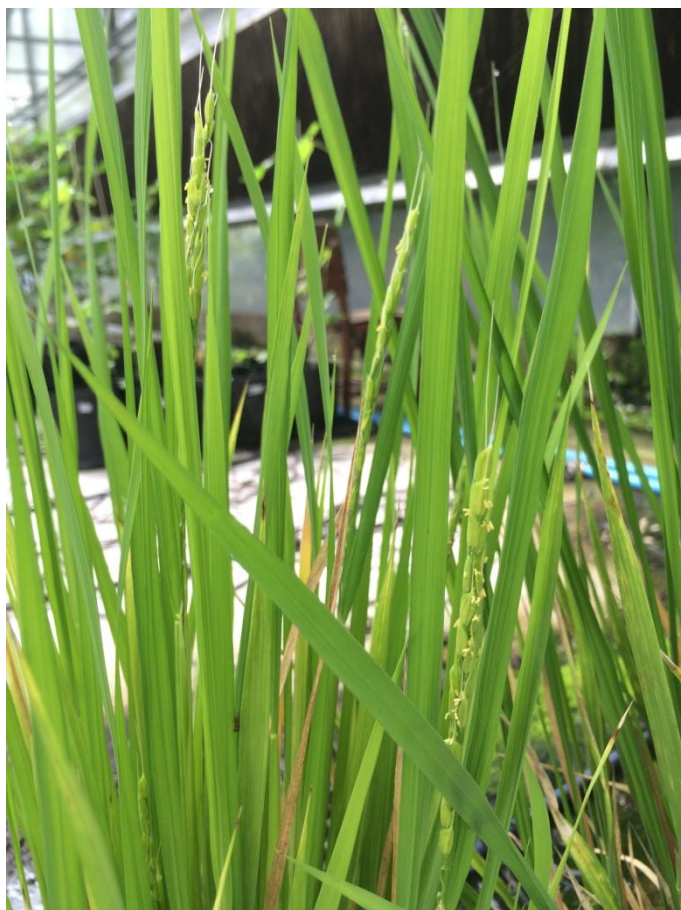


Figura 29 – Plantas superexpressando *OsGRF11*

Plantas superexpressando *OsGRF11* utilizando o vetor de expressão pANIC6A, evidenciando as panículas. Foto em Fevereiro de 2017.



Figura 30 – Plantas superexpressando *OsGRF11*

(A) Plantas superexpressando o gene *OsGRF11* com o vetor pANIC6A. (B) Plantas superexpressando o gene *OsGRF11* com o vetor pANIC6B. Fotos em Agosto de 2017.

4. Discussão

4.1. GRF

Os experimentos de mono-híbrido em levedura mostraram a interação de OsGRF3, OsGRF4 e OsGRF11 com um fragmento do promotor de *OsbHLH35* (Figuras 22 e 23), no qual está presente o *cis*-elemento de ligação de AtGRFs. Esse *cis*-elemento foi identificado no promotor de DREB2A e no estudo do cistroma de arabidopsis (KIM *et al.*, 2012; O'MALLEY *et al.*, 2016).

É importante salientar que essas interações ocorreram de forma específica com o fragmento isca F2 (Figuras 22 e 23), no qual a sequência alvo de ligação de AtGRF7 está presente, e que não houve interação com o fragmento isca F1.2 (Figura 21), no qual a sequência não é encontrada. Isso sugere que o *cis*-elemento seja conservado em arroz, embora sejam necessários experimentos que confirmem a especificidade de ligação à sequência "TGTCAG" diretamente.

Nos ensaios de transativação, GRF11 foi capaz de reprimir a expressão do gene repórter controlado pelo promotor de *OsbHLH35* (Figura 24). Esses resultados sugerem que *OsbHLH35* seja um alvo direto de OsGRF11. Embora inicialmente descritos como ativadores, já existem evidências de que os GRFs sejam repressores transcricionais (KIM *et al.*, 2012; KUIJT *et al.*, 2014). Nossos resultados corroboram com a hipótese de atividade regulatória negativa de GRFs.

Existem poucos alvos diretos de GRFs caracterizados, como o DREB2A em arabidopsis e os genes da família KNOX I em arroz, arabidopsis e cevada. Sabe-se que AtDREB2A é um ativador transcricional de genes envolvidos na tolerância a estresses osmóticos e de temperatura, porém, a sua expressão leva ao retardo no crescimento e a problemas reprodutivos.

Durante condições normais, DREB2A não é capaz de ativar a transcrição de seus genes alvo, porém, em condições de estresse, a proteína sofre modificações pós-traducionais tornando-se funcional e ativa a transcrição dos genes alvo (SAKUMA *et al.*, 2002, 2006). *AtGRF7* é um repressor transcricional de genes de resposta a estresse osmótico e induzido por ABA,

incluindo *AtDREB2A*, e essa repressão parece ocorrer especificamente durante condições normais (KIM *et al.*, 2012).

A expressão de genes de resposta a estresses pode levar a problemas de desenvolvimento, como o retardo no crescimento. Dessa forma, as plantas precisam ter um controle fino da expressão desses genes para lidar com as condições estressoras sem limitar seu crescimento (CLAEYS & INZÉ, 2013; HUOT *et al.*, 2014; NOLAN *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2012).

AtGRF7 parece atuar como repressor de genes de resposta a estresses garantindo o crescimento das plantas em condições normais (KIM *et al.*, 2012). Nesse sentido, *GRF11* regulou negativamente a expressão de *OsbHLH35*, um gene induzido em diferentes condições de estresse como salinidade, dessecação, exposição à luz UV-B, ao peróxido de hidrogênio e ao ABA. Esses resultados sugerem que *GRF11* possa ser um repressor de genes de resposta a estresse, embora isso seja apenas uma hipótese que pode orientar as investigações nas etapas subsequentes deste projeto.

Os membros da família KNOX I (KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN) atuam no desenvolvimento e na manutenção do meristema apical da parte aérea e dos meristemas florais por meio da regulação da expressão de diversos fatores de transcrição e de genes que participam de vias hormonais (BOLDUC *et al.*, 2012; HAKE *et al.*, 2004; HAY & TSIANTIS, 2010; TSUDA & HAKE, 2015; TSUDA *et al.*, 2011).

A expressão dos genes KNOX deve ser rigorosamente controlada a fim de regular sua atividade. Sabe-se que a modulação negativa da expressão de KNOX I nas células que cercam o meristema apical da parte aérea resulta na diferenciação das células nesse tecido (SAKAMOTO *et al.*, 2001; TSUDA & HAKE, 2015), enquanto que a regulação positiva da sua expressão nas células meristemáticas resulta na manutenção do tecido meristemático (TSUDA *et al.*, 2011).

Diversos reguladores da expressão de genes KNOX I já foram caracterizados, entre eles, alguns membros da família GRF. *GRF1* de cevada atua como repressor da expressão do gene *Bkn3*. *AtGRF4*, *AtGRF5* e *AtGRF6* reprimem a atividade do promotor do gene *AtKNAT2*. Em arroz, *GRF3* e *GRF10* reprimem diretamente a transcrição de *Oskn2* (KUIJT *et al.*, 2014). Nesse trabalho, os autores sugerem que a ligação de GRF ocorra em

sequências enriquecidas em “CAG” ou o reverso complementar “CTG”, presentes em fragmentos do promotor de *Oskn2*, embora também não haja uma comprovação direta da ligação a estas sequências.

A superexpressão do gene *OsGRF3* sob controle do promotor 35S resultou na redução nos níveis de expressão de *Oskn1*, *Oskn2* e *Oskn3*. Além disso, a superexpressão do gene levou a fenótipos severos de desenvolvimento, como a formação ectópica de raízes e de brotos, assim como o atraso na formação de inflorescências e, em casos severos, a senescência das folhas com panículas ainda internalizadas na bainha (KUIJT *et al.*, 2014).

O silenciamento de *OsGRF3* e *OsGRF4* via RNAi, utilizando uma construção específica para o gene GRF1 de cevada, originou plantas apresentando fenótipos de tamanho reduzido e com desenvolvimento atrasado, tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, com expressão aumentada dos genes *Oskn1*, *Oskn2* e *Oskn3* (KUIJT *et al.*, 2014), além de produzirem menor número de panículas em comparação a plantas WT, conforme foi analisado neste trabalho. Portanto, a superexpressão e o silenciamento desses genes parece afetar o desenvolvimento das plantas durante as fases vegetativa e reprodutiva, sugerindo que a expressão dos mesmos deve ser controlada finamente para garantir o correto desenvolvimento das plantas.

Assim como na superexpressão de *OsGRF3* e *OsGRF10*, parece haver um fenótipo na fase reprodutiva das plantas superexpressando *OsGRF11*. Assim como a superexpressão de *OsbHLH35*, a superexpressão de *OsGRF11* originou plantas estagnadas na fase reprodutiva R4 (COUNCE *et al.*, 2000). Portanto, essas plantas também devem ter seu fenótipo avaliado rigorosamente em condições ótimas de cultivo e, posteriormente, devem ser analisadas as estruturas florais e a viabilidade do pólen para tentar determinar as causas da não produção de sementes.

4.2. IDEF1

O gene *OsIDEF1* é constitutivamente expresso em diferentes tecidos de plantas de arroz e sua superexpressão dá origem a plantas que exibem tolerância à deficiência de ferro e que possuem níveis aumentados de expressão de genes reguladores da absorção e do transporte de ferro em arroz

(OGO *et al.*, 2006, 2007, 2011). Sabe-se que a regulação da atividade desse FT se dá principalmente em nível proteico, por meio da degradação via proteossomo 26S ou da inibição dessa degradação via interação com IBPs.

As proteínas IBP são inibidores de proteases da família Bowman-Birk (BBI), encontrada em *Selaginella moellendorffii*, leguminosas, cereais, e em algumas espécies de angiospermas, estando ausente em *Arabidopsis* (JAMES *et al.*, 2017). Em condições de suficiência de ferro, IDEF1 é degradado, enquanto que, na deficiência de ferro, ocorre a inibição da sua degradação devido à interação com IBP1 e, conseqüentemente, o acúmulo de IDEF1 e a indução da expressão dos genes alvo (TAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014).

Nossos experimentos de transativação não mostraram variação significativa na expressão do gene repórter sob controle do promotor de *OsHLLH35*, contendo a sequência reconhecida por OsIDEF1, "CATGC", presente no elemento IDE1. Uma explicação possível seria a degradação de IDEF1, já que a família BBI, responsável pela regulação de IDEF1 em nível proteico em arroz, não é encontrada em *Arabidopsis*. Nesse caso, a ausência de IBP não previne a degradação de IDEF1, impedindo a ativação da transcrição do gene repórter por esse FT. Outra explicação deve-se ao fato de termos conduzido os experimentos com culturas de células provenientes de folhas. Em um estudo anterior, plantas de tabaco expressando duas cópias de IDE1 fusionado ao gene *gus* exibiram transativação do gene repórter em raízes de plantas em deficiência de ferro, mas não em folhas, sugerindo que o *cis*-elemento seja funcional apenas em raízes de plantas em deficiência de ferro (KOBAYASHI *et al.*, 2007).

As perspectivas para a continuação desta etapa do projeto e resolução desses problemas são a realização dos experimentos de transativação com protoplastos obtidos a partir de raízes de plantas de arroz cultivadas em deficiência de ferro. A utilização de arroz como modelo poderia superar o problema da falta de IBP em *Arabidopsis*, e impedir a degradação da proteína IDEF1 pelo proteossomo 26S. Além disso, a deficiência de ferro pode estar acionando algum outro mecanismo de regulação que ainda não tenha sido completamente elucidado, como a hipótese de IDEF1 ser um sensor de ferro, por exemplo. Portanto, a condução dos experimentos nessas condições seria um passo importante para tentar resolver esses problemas.

CAPÍTULO 3

Caracterização evolutiva da família de fatores de transcrição GRF

3.1. Introdução

Os GRFs (Growth Regulating Factors) compreendem uma família de fatores de transcrição exclusiva do reino vegetal, com importantes funções no crescimento e no desenvolvimento. Essas proteínas são caracterizadas pela presença dos domínios QLQ e WRC, responsáveis pela interação com proteínas e DNA, respectivamente. O domínio QLQ recebe esse nome devido à similaridade de sequência com o motivo encontrado na subunidade SNF2 do complexo de remodelamento da cromatina SWI2/SNF2. Em ambas as proteínas, esse domínio está localizado na porção N-terminal e possui a função de interação com proteínas (ISHIDA *et al.*, 2004; KIM & KENDE, 2004; NAGAI *et al.*, 2001; VAN DER KNAAP *et al.*, 2000).

Diversos membros dessa família já foram caracterizados, principalmente em espécies como *Arabidopsis* e arroz, que constituem modelos de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, respectivamente. Entre as funções dessa família de fatores de transcrição estão a regulação da expansão e da proliferação celular nas folhas, nos cotilédones e no meristema apical da parte aérea das plantas (HORIGUCHI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2003; KIM & LEE, 2006; KUIJT *et al.*, 2014), além da participação na organogênese floral (LIU *et al.*, 2014a) e no controle do tamanho dos grãos e da produtividade (CHE *et al.*, 2015; DUAN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016).

Essa família é regulada de forma complexa. Alguns membros são regulados negativamente pelo miRNA396 (JONES-RHOADES & BARTEL, 2004) e certos GRFs têm a capacidade de interagir com as proteínas GIF, uma pequena família de coativadores, homóloga aos genes SYT, descritos em humanos. A proteína SYT é capaz de interagir com membros da subunidade SNF2, hBRM (Brahma) and hBRG (Brahma-related gene 1). Essa interação ocorre por meio dos domínios SNH e QLQ, respectivamente, assim como a interação entre GIFs e GRFs. Apesar da presença da sequência conservada QLQ na porção N-terminal das proteínas, e do fato de que GRFs e SNF2 interagem com os coativadores GIF e SYT, respectivamente, por meio dos mesmos domínios, nenhum estudo propôs uma ancestralidade comum entre as famílias.

Estudos anteriores propuseram diferentes classificações filogenéticas e sugeriram alguns mecanismos de evolução dos genes que codificam os GRFs. Um dos estudos sugere que a evolução da família se deve em grande parte a eventos de triplicação do genoma no ancestral das dicotiledôneas e que ocorreram outros eventos independentes de duplicação genômica, seguido por retenção gênica em algumas espécies como soja e álamo. Entre os seis grupos, dois continham apenas sequências de dicotiledôneas e não havia nenhum grupo exclusivo de monocotiledôneas (OMIDBAKHSHFARD *et al.*, 2015).

O outro estudo, desenvolvido com sequências de arábidoide, arroz, álamo, uva e pera, sugere uma divisão em cinco grupos, com três deles contendo genes das cinco espécies, um grupo exclusivo de monocotiledôneas e um de dicotiledôneas (CAO *et al.*, 2016). Os dois estudos apresentaram uma certa divergência entre si, o que sugere que ainda existem aspectos evolutivos desta família que necessitam ser explorados e discutidos detalhadamente.

Neste capítulo, a evolução da família GRF foi analisada por meio de análises filogenéticas para tentar entender sua origem e sua expansão em plantas. Os dados obtidos sugerem um novo modelo de origem e de expansão dessa família em Viridiplantae. Os resultados deste capítulo estão apresentados em forma de artigo científico.

Molecular evolution and diversification of the GRF transcription factor family

Leila Spagnolo Fonini^{1,3}, Pedro M. Barros², Caroline Cabreira-Cagliari³, Marcelo Affonso Begossi Martins³, Nelson J.M. Saibo², Andreia Carina Turchetto-Zolet³, Marcia Margis-Pinheiro^{1,3}.

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91509-900, RS, Brazil.

²Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA), Av. da República, 2780-157, Oeiras, Portugal.

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91509-900, RS, Brazil.

ABSTRACT

Growth Regulating Factors (GRFs) comprise a transcription factor family with important functions in plant growth and development. They are characterized by the presence of QLQ and WRC domains, responsible for interaction with proteins and DNA, respectively. The QLQ domain is named due to the similarity to a protein interaction domain found in the SWI2/SNF2 chromatin remodeling complex. Despite the occurrence of the QLQ domain in both families, the divergence between them had not been further explored. Here, we show evidence for GRF origin and determined its diversification in angiosperm species. Phylogenetic analysis revealed 11 well-supported groups of GRFs in flowering plants. These groups were supported by gene structure, synteny, and protein domain composition. Synteny and phylogenetic analyses allowed us to propose different sets of probable orthologs in the groups. Besides, our results, together with functional data previously published, allowed us to suggest candidate genes for engineering agronomic traits. In addition, we propose that the QLQ domain of GRF genes evolved from the eukaryotic SNF2 QLQ domain, most likely by a duplication event in the common ancestor of the

Charophytes and land plants. Altogether, our results are important for advancing the origin and evolution of the GRF family in Streptophyta.

INTRODUCTION

Growth Regulating Factors (GRFs) comprise an important transcription factor family that plays diverse roles in plant development. These transcription factors are characterized by the obligatory presence of two conserved domains named QLQ (Gln, Leu, Gln) and WRC (Trp, Arg, Cys)¹. The QLQ domain is usually located at the protein N-terminus and contains the motif QX₃LX₂Q. This region is named QLQ due to the similarity to the protein-protein interaction domain of yeast SWI2/SNF2 (Switch/Sucrose non-fermentable), which is a subunit of a chromatin-remodeling complex¹. Located after QLQ, the WRC domain contains a nuclear localization signal and a CX₉CX₁₀CX₂H motif¹, an atypical C3H Zinc-finger motif found in barley HRT, a transcriptional repressor of the Gibberellin Response Element (GARE)². Further studies demonstrated that the WRC domain from GRF acts as DNA binding domain in barley, arabidopsis, and rice³⁻⁵, and that some GRFs possess more than one WRC, such as AtGRF9⁶ and BrGRF12⁷. Besides that, there are other conserved regions found in C-termini of some but not all GRFs, like FFD (Phe, Phe, Asp), TQL (Thr, Gln, Leu) and GGPL (Gly, Gly, Pro, Leu)^{1,6,8}; however, their roles were not yet unveiled⁹.

Most of the studies in the last years focused on understanding the specific roles of GRFs in different plant species (^{9,10} for reviews). The first known functions described for these proteins were in stem and leaf growth, particularly in GA-induced stem elongation¹, regulation of cell expansion in leaf and cotyledon growth⁶ and cell proliferation in leaf primordia^{11,12} cotyledons and shoot apical meristem (SAM)^{5,12}. Other functions related to plant development were also revealed, like participation in flower organogenesis¹³, organ longevity^{14,15}, seed oil production¹⁶, photosynthetic efficiency^{15,16}, control of grain size and yield¹⁷⁻²¹. Importantly, GRF genes are known to be upstream regulators of class I KNOX genes to maintain a proper SAM activity, together with other regulators of KNOX I expression, and this function is conserved in monocots and eudicots species^{5,22}. Under adverse environmental conditions,

GRFs also play important roles, like coordination of growth in response to osmotic and ABA-induced stresses⁴ and host transcriptional reprogramming during cyst nematode infection²³ and in response to fungal pathogens²⁴.

GRFs can physically interact with GRF-Interacting Factors (GIFs), a small family of transcriptional co-activators. This interaction occurs between the QLQ domain of GRF and the SNH (SSXT N-terminal homolog) domain present in GIF proteins²⁵. However, this interaction does not seem to be mandatory for GRF function since they are capable of acting as negative regulators^{4,5}. Also, it is not clear whether distinctive heterodimers of GRF and GIF have different functions in the downstream pathways⁹.

GRFs are part of a complex regulatory module. Some GRF members are negatively regulated at transcript level by miR396^{14,23,26,27}. The miRNA396 responds to different stress conditions such as drought, cold, high-salinity, UV-B light and pathogens^{24,28–30}, and it is also regulated by the TCP family (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA and PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN FACTOR1)³¹, which modulates the gene expression of GRFs and GIFs directly as well²⁶. Moreover, GRFs affect miR396 transcript levels and then, the gene expression of other GRFs²³, in an intricate cascade of regulation.

In arabidopsis, GIF1, also called ANGUSTIFOLIA3 (AN3), is homolog to the human Synovial Translocation Protein (SYT)²⁵. Interestingly, SYT interacts with the human SNF2 proteins, BRM (Brahma) and BRG (Brahma-related gene 1)³². Also, in arabidopsis, GIF1 can associate with two different SWI/SNF complexes through the interaction with BRM or SYD (Splayed), the SNF2 homologs in this species¹⁴. Although the SNF2 and GRF proteins share a conserved QLQ domain located at the *N-termini* of both proteins, and have the same molecular partner GIF or its ortholog SYT, to date, there is no study suggesting the origin of GRFs from SNF2 and exploring the divergence between these families.

It is believed that *GRF* family is unique to land plants, with no genes found outside Embryophytes^{9,10,33}. Based on phylogenetic analysis, previous studies established divisions of *GRFs* in six¹⁰ or five³³ groups. The first study claims that *GRFs* evolved with whole-genome triplication event in eudicot ancestor and other independent WGD events, followed by gene retention in soybean and

poplar. Between the six groups, they found two groups specific to eudicot species and no group exclusive to monocots¹⁰. The second study focused on arabidopsis, rice, chinese pear, poplar and grape genes. Between the five clades, it was found three groups containing genes from the five species, whereas the other two groups included genes from one, two or three species. Also, they found one group specific to monocots and one exclusive to eudicot species³³.

Many aspects of the biological functions of GRFs are already well known; however, the evolutionary history and diversification of these proteins are not yet completely elucidate and needs to be deeper comprehended based on different methods and discussed in detail.

In this work, we conducted a phylogenetic approach to understand the evolution and diversification of *GRF* family. Based on evidence from previous reports, we hypothesize that *GRFs* have evolved before the emergence of land plants by a duplication event of *SNF2* gene. In this way, our results showed the origin of *GRF* genes in Charophytes. In addition, we suggest that *SNF2* and *GRFs* diverged very early in the course of evolution, probably by a duplication event in the Charophyte ancestor. Also, we found well-supported data for eleven groups in flowering plants, six groups exclusive to eudicots and five groups exclusive to monocot species, suggesting that *GRF* family evolved mostly independently in monocot and eudicot species.

RESULTS

Identification of *GRF* genes and QLQ divergence from *SNF2*

We analyzed 41 plants and algae genomes and found *GRF* genes in 37 of them. As previously reported, we did not find *GRFs* in Chlorophytes. A total of 395 *GRF* encoding genes were identified, of which 22 produce proteins containing two WRC domains (Table 1). Among the 395 genes, one was found in the genome of the Charophyte algae *Klebsormidium nitens* (formerly *Klebsormidium flaccidum*). In addition to the genes previously described^{8,33,34}, we found four extra genes in the maize genome, *ZmGRF15* to *18*. We discarded *ZmGRF8* and *12* from our analyses, since the first one contains only

a partial WRC domain and does not have QLQ, and in the second one both domains are absent; however, we kept the nomenclature to avoid future confusions. We also found two extra genes in purple false brome, *BdiGRF11* and *12*, and two extra genes in grape vine, *VviGRF9* and *VviGRF10* (Tables S2 and S3).

We also analyzed the divergence between *GRF* and *SNF2* and the diversification of these families, since both share a conserved QLQ domain, which allows the interaction with SNH domains present in the homologous SYT and GIF families. While GRFs are exclusive to Viridiplantae, SNF2 family is found in eukaryotes. The *SNF2*-type genes have different names, *SNF2* in fungi, *BRM* and *BRG1* in metazoans, and *BRM* and *SPLAYED* (*SYD*) in plants. In this work, the general term “*SNF2*” will be used for all the *SNF2*-type genes. However, when referring to a particular gene, the specific gene name will be used.

The binding region between BRM, the human SNF2, and SYT, the GIF homolog, was shown to be located between the amino acids 156 to 205 for BRM, and 1 to 181 for SYT³². Analyses in SMART (Simple Modular Architecture Tool)³⁵ showed that these regions correspond to QLQ (172 to 208) and SNH (17 to 77) domains respectively. The interaction between GRFs and GIFs also occur via these domains²⁵. Blastp analyses allowed us to identify 52 *SNF2* genes in the 32 species we analyzed, including fungi, metazoans, algae and land plants, all of them presenting QLQ domain (Table S1). The phylogenetic relationships of *SNF2* and *GRF* gene families revealed that *GRFs* and *SNF2* grouped in distinct clades. The *SNF2* clade includes sequences from fungi, metazoans, algae, and land plants species, while the *GRF* clade includes only sequences from the Charophyte *K. nitens* and land plants species (Fig. 1A). Therefore, we propose that *GRF* gene may have originated from *SNF2* gene by a duplication event in a Charophyte ancestor and since then these two gene families have evolved and diversified independently, with gains and losses of domains, since the families share only QLQ domain in the N-terminal region of the proteins.

AtBRM and *AtSYD* are paralogous that grouped in distinct subclades in the *SNF2* clade. As well as arabidopsis, purple false brome, turnip and populus possess both genes, while rice and turnip possess only *BRM*. Both *BRM* and

SYD suffered specific duplications in populus, and *BRM* was duplicated in turnip, probably in a WGD event. The detailed information on species, *loci* and taxa terminologies of *SNF2* and *GRFs* are provided in Table S1 and S2, respectively.

The early divergence between the *SNF2* and *GRF* gene families was accompanied by changes in the amino acid composition and therefore in the properties of QLQ domain. In *GRF* proteins, QLQ domain presents two conserved glutamic acid (E) residues in the positions 9 and 11, what confers a negative charge and acidic property to the core. In the case of *SNF2*, the charge is neutral to positive, and the chemical property varies from neutral to basic in the same positions (Fig. 1B and 1C). Other prominent differences are observed in the positions 12, 22, 35 and 36. Besides the canonical QX₃LX₂Q, the most conserved residues are the phenylalanine (F) in position 2, the proline (P) in position 27 and the leucine (L) at position 30 (Fig. 1B and 1C).

Table 1 – Number of GRF genes in the selected species

Tree	Species	Total GRF number	GRFs with double WRC
	<i>Solanum lycopersicum</i>	13	1
	<i>Solanum tuberosum</i>	9	1
	<i>Vitis vinifera</i>	10	1
	<i>Populus trichocarpa</i>	19	1
	<i>Salix purpurea</i>	21	1
	<i>Ricinus communis</i>	9	1
	<i>Manihot esculenta</i>	15	2
	<i>Medicago truncatula</i>	9	1
	<i>Glycine max</i>	24	2
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	11	1
	<i>Prunus persica</i>	10	1
	<i>Fragaria vesca</i>	10	1
	<i>Cucumis sativus</i>	8	1
	<i>Boechera stricta</i>	8	1
	<i>Brassica rapa</i>	16	1
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9	1
	<i>Arabidopsis lyrata</i>	9	1
	<i>Capsella rubella</i>	8	0
	<i>Capsella grandiflora</i>	8	0
	<i>Eutrema salsugineum</i>	9	1
	<i>Gossypium raimondii</i>	18	1
	<i>Theobroma cacao</i>	10	1
	<i>Eucalyptus grandis</i>	5	0
	<i>Citrus sinensis</i>	9	0
	<i>Citrus clementina</i>	9	0
	<i>Aquilegia coerulea</i>	7	0
	<i>Oryza sativa</i>	12	0
	<i>Brachypodium stacei</i>	12	0
	<i>Brachypodium distachyon</i>	12	0
	<i>Setaria italica</i>	10	0
	<i>Panicum hallii</i>	10	0
	<i>Panicum virgatum</i>	19	0
<i>Zea mays</i>	16	0	
<i>Selaginella moellendorffii</i>	4	0	
<i>Physcomitrella patens</i>	2	0	
<i>Sphagnum fallax</i>	4	0	
<i>Klebsormidium nitens</i>	1	0	
<i>Micromonas sp.</i>	0	0	
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	0	0	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0	0	
<i>Volvox carteri</i>	0	0	

Tree of species, based on NCBI Taxonomy, was constructed with phyloT, available at: <http://phylot.biobyte.de>

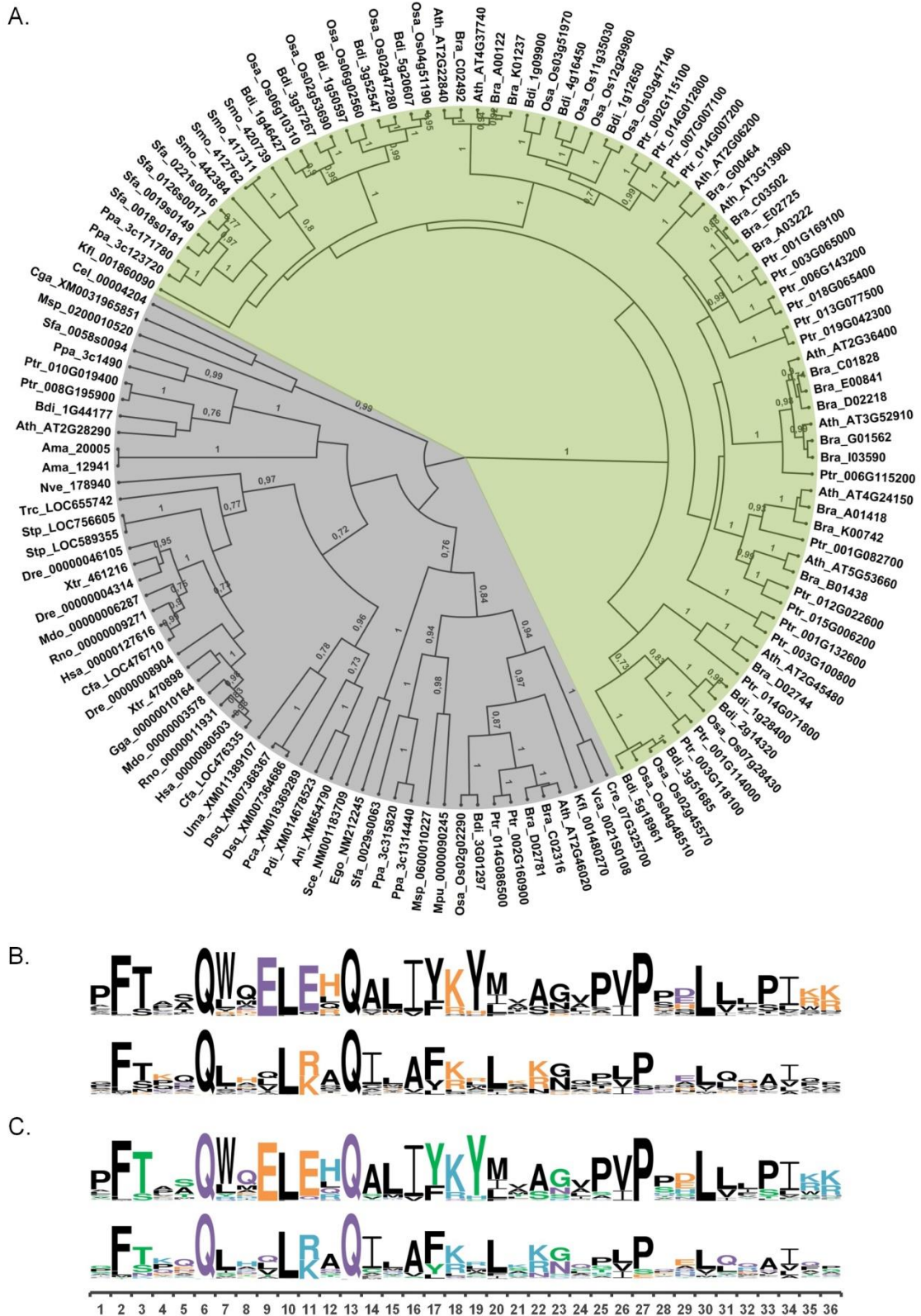


Figure 1. Phylogenetic relationship among SNF2 and GRFs and QLQ properties. (A) An unrooted tree with SNF2 and GRF coding sequences of QLQ domains of algae, land plants, animals and fungi was reconstructed by Bayesian inference. GRFs are colored in green, SNFs are colored in gray. Only posterior probability values higher than 0.7 are shown above branches. The species and *loci* information are detailed in Table S1. (B) Logos representing the charge of the aminoacids from QLQ domain

present in GRF (top) and SNF2 (bottom). Negative residues in purple and positive in orange. **(C)** Logos representing the chemical properties of the aminoacids from QLQ domain of GRF (top) and SNF2 (bottom). Basic residues in blue, acidic in orange, neutral in purple, polar in green and hydrophobic in black. Protein sequences corresponding to QLQ domain from SNF2 and GRFs separately were used to construct the diagrams in WebLogo3.

Diversification of GRF family in Streptophyta

The *GRF* family has undergone a significant expansion in land plants. The phylogenetic tree, reconstructed from 392 sequences by Bayesian method, allowed us to identify 11 well-supported groups of GRF proteins in flowering plants, as shown by posterior probability (Fig. 2 and Fig. S1). The composition of the groups was confirmed by domain distribution in all GRF proteins (Fig S1), and also by gene structural organization (Fig. 3A) and syntenic analysis (Fig. 4A and 4B) from selected species. Besides these 11 groups, we identified sets containing sequences from algae, lycophyte, and bryophyte. We joined these clusters and named it Group XII (Fig. 2 and Fig. S1).

GRF is encoded by a single gene in the algae *K. nitens* and duplicated in lycophyte and bryophyte species independently. The proteins in Group XII have different domain compositions in the C-terminal region. *K. nitens* GRF possesses a GGPL motif and the other members of the group possess different combinations of the extra motifs.

The expansion of the family occurred separately on the current monocot and eudicot species. There are six groups exclusive to eudicots: groups I to IV, VI and VII; and five groups exclusive to monocots: groups V and VIII to XI. For both monocots and eudicots, duplication events occurred mainly on the basis of each one of these groups of species, since the genes from different species are almost ubiquitous throughout each group. A tree showing the separation of the 11 groups is shown in the Fig. 2, while the complete tree containing all *taxa* terminologies, group relationships and domain characterization of all GRFs is found at Fig. S1.

In general, Group I is characterized by the presence of proteins containing five domains. A duplication in the basis of Brassicaceae originated *AtGRF3* and *AtGRF4* and their orthologs. Duplications in the basis of eudicots were

responsible for the Group II expansion, giving rise to a subgroup of 15 genes encoding proteins containing one WRC domain and 22 GRFs presenting two WRC domains. In most cases, there is no additional motif, with some exceptions where TQL is present. Also, some species appear to have undergone gene losses.

Group III is characterized by the presence of the GGPL, which corresponds to the only additional domain, and basal duplications gave rise to subgroups containing *AtGRF7* and *AtGRF8*. Proteins from Groups IV and V have similar structures, with the presence of FFD and TQL additional domains. Group IV is exclusive to eudicots while group V is composed by GRFs from monocot species. The similarity between these groups may be explained by a common ancestor gene that evolved independently in monocot and dicot species. The expansion of group IV occurred on the basis of eudicots, and the Brassicaceae ancestor probably suffered gene loss, since there are no members in this group. The expansion of the Group V occurred mainly via duplications in the origins of Poaceae, originating five subgroups. These duplications gave rise to the paralogous *OsGRF1* and *OsGRF2*, *OsGRF3* and *OsGRF4* and the closely related gene *OsGRF5*.

Group VI is exclusive to eudicots and present subgroups containing different extra domains. The subset containing *AtGRF5* and *AtGRF6* is specific to Brassicaceae. The first possess only QLQ and WRC and the second also contains the FFD domain. Although this group has a diversified protein structure, *AtGRF5* and *AtGRF6* are syntenic to other genes present in this group.

Group VII arose on the basis of eudicots. In general, members of this group possess TQL and GGPL, with some exceptions. Duplication in the basis of Brassicaceae gave rise to the paralogous *AtGRF1* and *AtGRF2*, presenting TQL and GGPL.

Groups VIII, IX, X and XI evolved from an ancestor of Poaceae. Groups VIII and IX are more related to the eudicot Group VII and may have a common ancestor gene that diverged independently in monocot and dicot species. A basal duplication in Group VIII originated two subgroups, the first containing *OsGRF6* and its orthologs, possessing TQL and GGPL, and other subgroup containing *OsGRF7*, *OsGRF8* and its orthologs, with GGPL domain. Group IX,

in which *OsGRF9* is present, originated in the Poaceae ancestor and has only GGPL extra domain.

Groups X and XI probably evolved with basal duplications. The structure of the members of these groups is formed by QLQ and WRC only, without the presence of additional domains. Group X is formed by *OsGRF11*, *ZmGRF10* and other genes, while group XI is composed by *OsGRF10* and *OsGRF12*, among others. Also, the *GRFs* in these groups have an extremely short C-terminal region and the absence of additional domains. Despite the similarity between these groups, the posterior probability in the consensus tree did not support a single clade between the groups, suggesting the existence of some level of divergence between them.

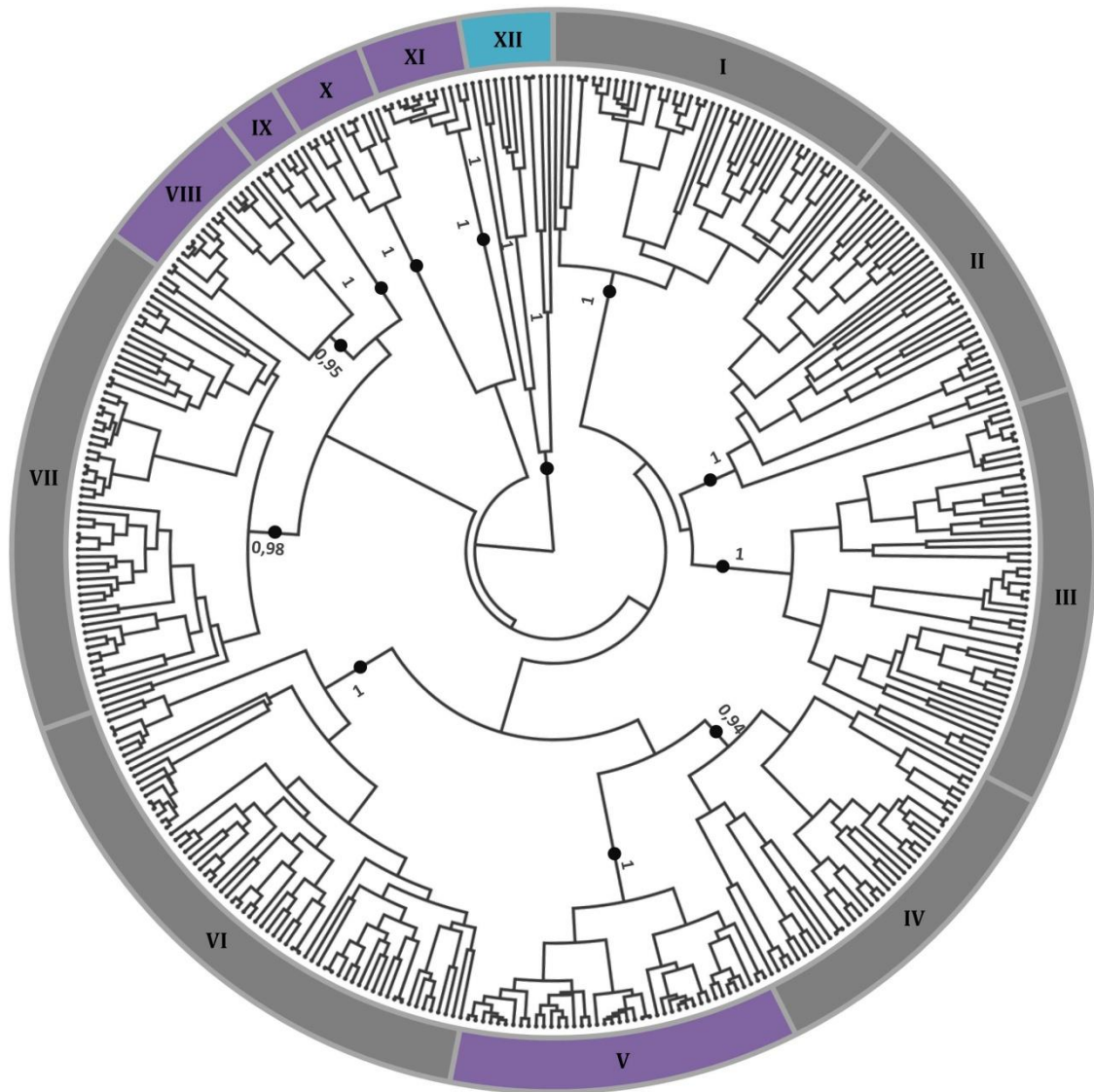


Figure 2. Phylogenetic relationship of GRFs.

Coding sequences of QLQ and WRC domains of *K. nitens* and land plants were used to generate an unrooted tree reconstructed by Bayesian inference. GRFs are grouped from I to XII (black dots). Groups I to XI corresponds to flowering plants and group XII corresponds to algae and mosses. The dicot groups are colored in gray, monocot groups in purple and algae and mosses group in blue. Species, *loci* and taxa terminologies are available at Table S2. A detailed tree is available as Fig S1.

Structural organization of GRF genes from arabidopsis, rice and moss

We selected one representative species of mosses, eudicots, and monocots to analyze the structural organization of GRF genes between these clades. Among these three species, the two GRF genes from the moss *Physcomitrella patens* are the largest, with 6200 and 6399 bp, respectively.

OsGRFs ranged from 1126 to 3948bp and *AtGRFs* from 1053 to 3416bp. To facilitate comparison of gene structures, a tree was reconstructed with sequences of only these three species (Fig. 3A). Most of the genes have QLQ and WRC in separate exons, except for *PpGRF1* and *AtGRF7*. The number of introns interrupting the coding region varied from 2 to 4, and domain position follows the order QLQ, WRC, FFD, TQL, and then GGPL.

In general, genes positioned in the same group have very similar gene structures, besides domain composition. The two *PpGRFs* have four introns interrupting the coding region. *AtGRF5* and 6, both from Group VI have a similar organization; however, *AtGRF5* lost the FFD domain. From Group I, both *AtGRF3* and *AtGRF4* have four exons and three introns interrupting the coding region and possess all the five domains. *AtGRF7* and 8, from Group III, have GGPL as the only extra domain but present different genetic structures. *AtGRF1* and *AtGRF2*, from Group VII, both possess four exons and three introns, with TQL and GGPL in the last exon. *OsGRF9* from Group IX has three introns, four exons and GGPL domain. From Group VIII, *OsGRF6* have two introns and three exons and the closely related *OsGRF7* and *OsGRF8* have three introns and four exons. *OsGRF10* and *OsGRF12*, both from Group XI, have two introns and three exons, and no additional domain. *OsGRF1* to 5, from Group V, have similar gene structures, with the presence of FFD and TQL domains. The subgroup including *OsGRF1* and *OsGRF2* contain three exons and two introns, while the subgroup of *OsGRF3* to 5 has an additional intron separating WRC from the extra domains. *OsGRF11*, from Group X, have no additional domain, and *AtGRF9*, from Group II, possess an extra WRC motif.

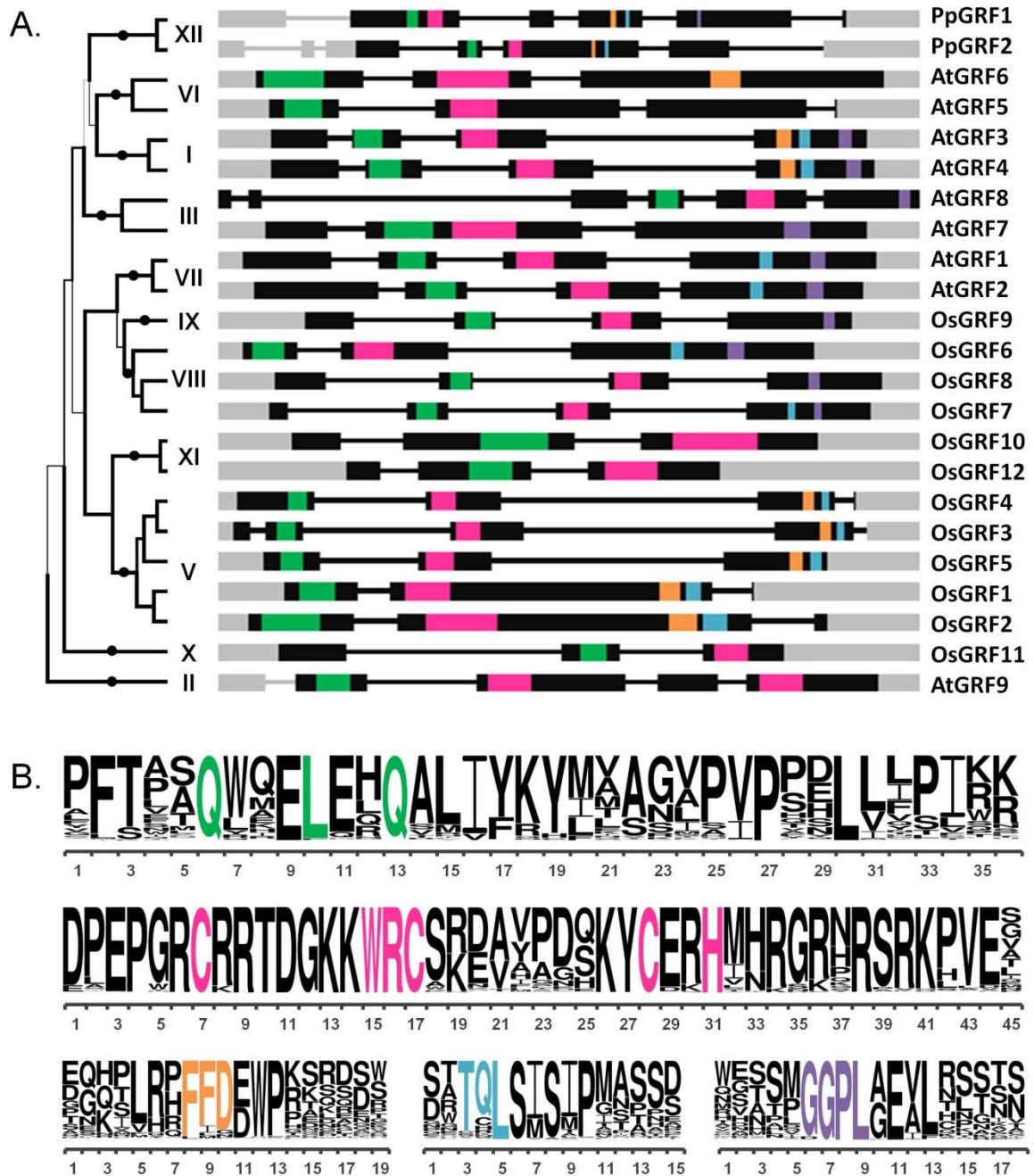


Figure 3. Structural organization of GRF genes and domains.

(A) QLQ and WRC coding sequences of GRFs of *P. patens* (Pp), *A. thaliana* (At) and *O. sativa* (Os) were used to generate an unrooted tree by Bayesian inference (line width by posterior probability). The graphical representation of gene structures was based on genomic information available at Phytozome. Gray color corresponds to 5' and 3' untranslated regions. Black bars and lines indicate exons and introns respectively. Gene sizes were adjusted to the same width. For scale, QLQ domain (green) corresponds to 118bp. The groups are indicated by black circles. **(B)** Logos of QLQ (36 aa), WRC with the C3H motif (45 aa), FFD (19 aa), TQL (15 aa) and GGPL (18 aa) domains. The height of the letters is based on the probability of the residue in the position and the width was adjusted to fit. Domain colors: QLQ in green, WRC in pink, FFD in orange, TQL in blue and GGPL in purple.

Domain conservation of GRFs

We also analyzed the amino acid sequence conservation of the five domains in 392 GRF sequences to identify the pattern of conservation and the polymorphic sites (Fig. 3B). Between the five domains, WRC is the most conserved, except for the region between the positions 19 to 25 that is less conserved. We found an absolute conservation of the C3H motif, suggesting the importance of this motif for GRF function. QLQ domain has some sites with high conservation, importantly, the QX3LX2Q, the phenylalanine (F) in position 2, two glutamic acid (E) residues in positions 9 and 11, the proline (P) in the position 27, the leucine (L) in 30, among others. FFD have a higher conservation in the core of the motif. Besides two phenylalanine (F) and the aspartic acid (D) residues in the positions 8 to 10, this domain possesses phenylalanine (F) in the position 6, tryptophan (W) in 12 and proline (P) in the position 13. TQL has three sites even more conserved than the amino acids present in positions 3 to 5 that appoint the domain. Two serine (S) and one proline (P) residues, localized in the sites 6, 8, and 10 respectively, are almost absolutely conserved. The GGPL domain also have core conservations, with glutamic acid (E) and leucine (L) in positions 11 and 13, besides the two glycines (G), the proline (P), and the leucine (L) that names the motif, located at positions 6 to 9.

Synteny analysis and genomic organization of *GRF* genes

To find probable orthologs of *AtGRFs* and *OsGRFs* we conducted searches in the Plant Genome Duplication Database (PGDD)³⁶. Arabidopsis *GRFs* were searched against tomato and soybean genomes, while rice *GRFs* were searched against maize and purple false brome genomes. The pairs of probable orthologs found in duplicated blocks are summarized in Figs. 4A and 4B. In general, these pairs are consistent with the distribution of the genes in the groups of the phylogenetic tree.

We also analyzed the intraspecific duplications of GRFs in arabidopsis and rice using the same database. The relative positions of the genes and the duplicated blocks are graphically demonstrated in Fig. 4C. *AtGRF1* and

AtGRF2, located on chromosome 2 and 4 respectively, are contained in a large block of duplication, with 29 anchors. Both genes are members of the Group VII. Group I members, *AtGRF3*, located on chromosome 2, and *AtGRF4*, located on chromosome 3, both are enclosed in a huge block, with 291 anchors. *OsGRF1* and *OsGRF2*, located on the chromosomes 2 and 6, are both included in a huge block with 152 anchors. *OsGRF3* and *OsGRF4*, located on chromosomes 4 and 2, are part of a giant block of duplication with 335 anchors. The four genes are members of the Group V, and the syntenic genes formed different subsets inside the main group. *OsGRF6* and *OsGRF9*, both located on chromosome 3, are included in a small block with 8 anchors. The other genes are not contained in any block of duplication.

The number of non-synonymous (Ka) and synonymous (Ks) substitutions per site of the duplicated GRFs were also determined in PGDD. The Ka/Ks values for all pairs of duplicated GRFs were lower than 1, suggesting that duplicated gene pairs are under purifying selection.

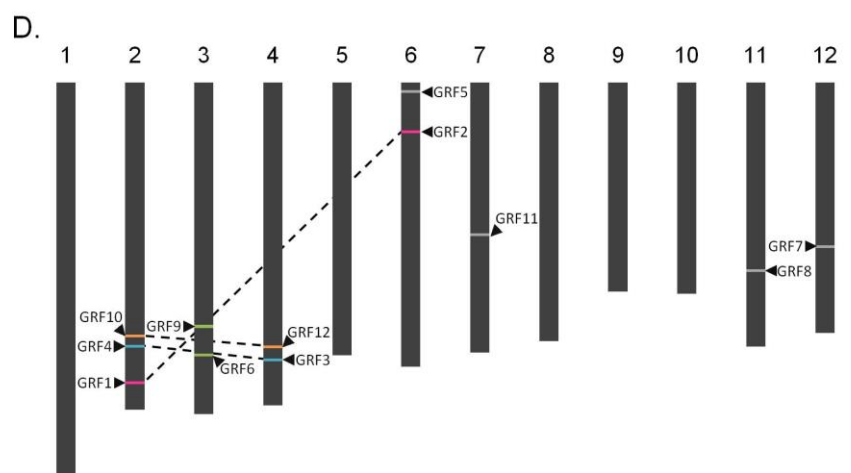
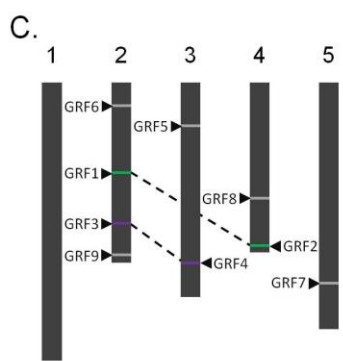
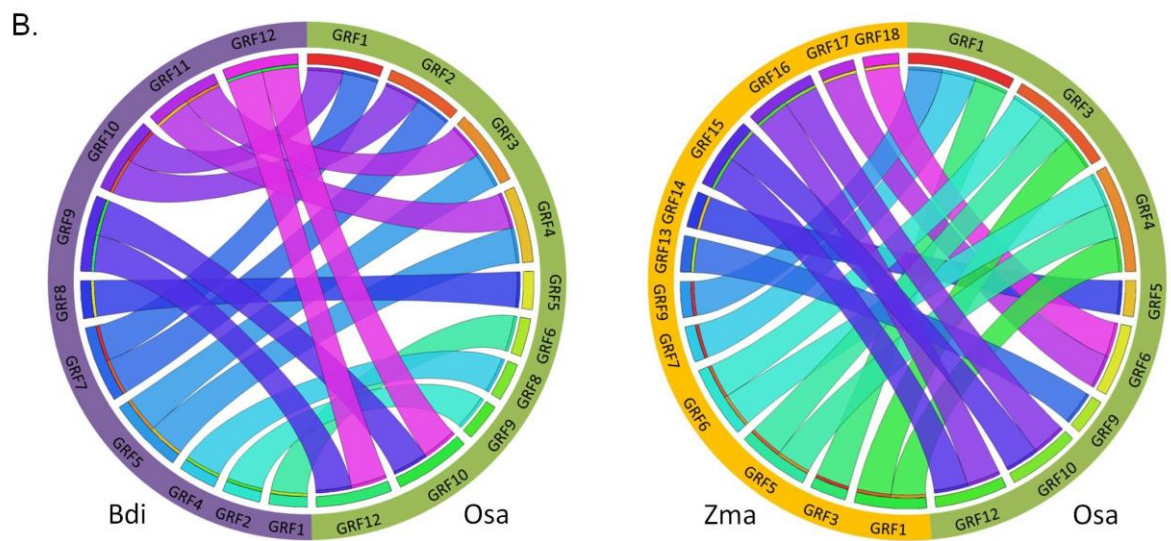
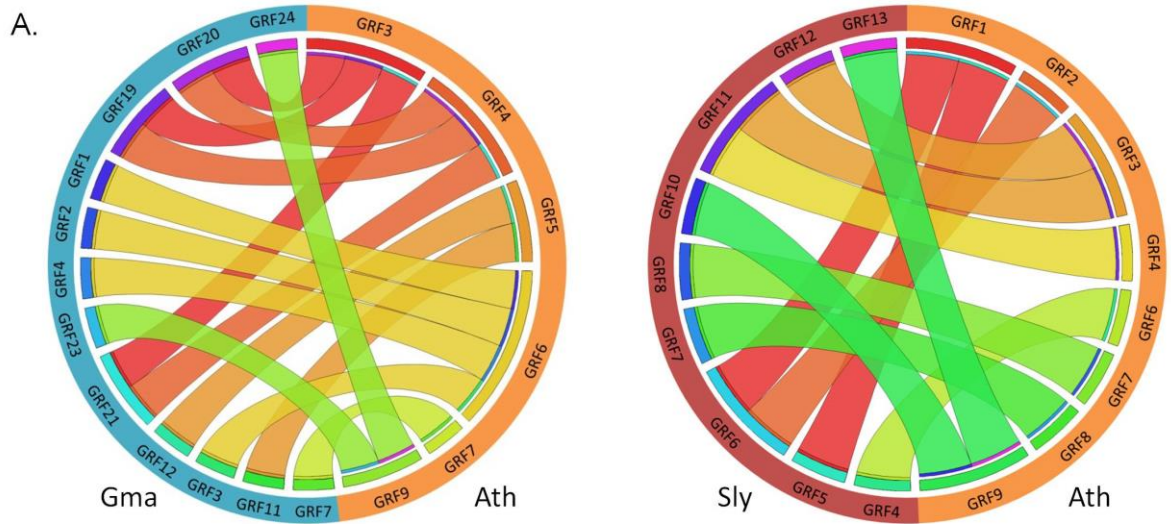


Figure 4 – Synteny and chromosome distribution of GRFs of rice and arabidopsis.

(A) Synteny between arabidopsis (Ath) and soybean (Gma), arabidopsis and tomato (Sly), (B) Synteny between rice (Osa) and purple false brome (Bdi), rice and maize (Zma). In (A) and (B), probable orthologs are linked by ribbons. Distribution of GRFs in nuclear chromosomes of arabidopsis (C) and rice (D). Genes not duplicated in gray. Genes in duplicated regions are represented with the same colors. Duplicated regions in different chromosomes are linked with dashed lines.

***In silico* prediction of GRF targets and biological processes**

A target *cis*-element for GRF transcription factors was characterized by functional⁴ and cistrome³⁷ analysis. The regulatory sequences described in these previous works present the core nucleotides “TGTCAG” and it was discovered in the *DREB2A* promoter, which is regulated by AtGRF7⁴. However, the experiments were conducted in arabidopsis and it is not known whether this *cis*-element is conserved among other species. Initial studies suggest its conservation in rice (Fonini *et al*, unpublished results). Since rice is a model for monocot studies and is also a cereal crop, we conducted an *in silico* analysis to find putative targets of GRFs by the *cis*-element core “TGTCAG” or the reverse complement “CTGACA” in this specie.

The identification of putative targets was conducted in the fuzznuc tool from EMBOSS³⁸. We identified genes containing at least 2 core motifs in a region of 1,500bp upstream ATG. A set list containing 1270 putative targets of GRFs was submitted to Gene Ontology analysis and overrepresentation test in PANTHER³⁹ database. From these, 83 were not annotated in the database, and 7 had multiple mapping information. The complete list of enriched GO terms and the 1270 putative targets are available at Tables S4 and S5, respectively. The statistic overrepresentation test shows that the enriched targets are involved in several biological processes related to GRF functions. Among these processes are the regulation of leaf development (GO:2000024), regulation of endosperm development (GO:2000014), adaxial/abaxial pattern formation (GO:2000011), regulation of meristem structural organization (GO:0009934), reproductive process (GO:0022414), cell cycle (GO:0007049), cell division (GO:0051301) and regulation of cell proliferation (GO:0042127).

This result suggests that the *cis*-element is conserved, at least in rice, since several biological processes of the putative targets matches with already

characterized GRF functions. Also, this target library may contribute to functional GRF studies in rice and also in other species.

DISCUSSION

GRF family arose earlier than previously thought during the evolution of Viridiplantae. In our analysis, we found a *GRF* gene in the genome of the Charophyte algae *K. nitens*. In accordance with previous studies^{9,10}, we did not find *GRF* genes in Chlorophyte. Our phylogenetic analysis revealed that *GRFs* may arise after division between Charophyte and Chlorophyte, and not after the emergence of Embryophyte as previously suggested^{9,10}. Charophyte algae are currently accepted as valuable models for the study of plant evolution^{40,41}, although incomplete genome data and poor quality fossils made difficult to uncover evidence of the transition of Charophytes to land plants. However, novel analyses of Charophyte species revealed the existence of several pre-adaptations; similar to what is observed in land plants^{40,42}.

Viridiplantae separated into Chlorophyte and Streptophyte around 725 to 1200 million years ago. Streptophyte comprises Embryophyte, known as “land plants”, and six distinct groups of Charophyte algae Mesostigmatales, Chlorokybales, Klebsormidiales, Charales, Coleochaetales, and Zygnematales. It is currently accepted that the ancestor of all extant land plants was close to Coleochaetales and Zygnematales (Figure 5)^{42,43}.

We found evidence on the emergence of GRFs in *Mesostigma viridis*, from the most basal Charophytes, the Mesostigmatales. It means that this family exists even before the first multicellular green plants, which arose after the divergence between Mesostigmatales and Chlorokybales (Figure 5)⁴³. Also, we conducted searches on available public transcriptome databases and found GRF encoding sequences in another Charophyte species, *Spirogyra pratensis* and *Nitella mirabilis*, although we did not include this data in our analysis because we only used data from sequenced genomes.

The expansion of GRF family accompanied the rapid evolution of plants, since the basal Charophyte Mesostigmatales until the modern angiosperms (Figure 5). Remarkably, GRFs evolved with the expansion of gene number and remained as families. While in the Charophyte *K. nitens* genome there is just

one gene, the family encompasses 24 genes in soybean, the one with the highest number of genes among the species analyzed. Other species with a high number of genes, such as switchgrass, maize, turnip, cotton, soybean, and Salicaceae, underwent whole genome duplication (WGD) events at some moment in the course of evolution⁴⁴. This finding indicates that besides ancestral duplications in basal monocot and eudicot, recent WGD events were crucial for the expansion of the family. Also, the *ka/ks* values of the putative ortholog pairs suggested a purifying selection, in accordance with a previous work conducted with pear genes³³.

The conservation among the sequences of QLQ and WRC in different GRFs did not allow further characterization of the relations between the groups. However, through the analysis of the domain composition, we observed that the dicot Group IV and the monocot Group V are somewhat related. We also noticed a relationship between monocot Groups X and XI, both with no additional domains and a short C-terminal region. ZmGRF10, a member of Group X, has the ability to interact with GIFs. However, it lacks the C-terminal domain and the transactivation activity⁴⁵. The other members of Group X and the Group XI share the same structure of ZmGRF10, so, it is possible that the other GRFs in both groups also lack the transactivation ability.

In an attempt to understand the ancestral role of GRF genes, since they were also found in algae, we reviewed the functional data already published. We also analyzed published functional data of genes related with *GRFs*, such as *KNOX1* and *TCP4*, since *GRF* genes are not yet characterized in basal species. It is already known that GRFs modulate the expression of cell cycle regulator genes, controlling cell proliferation in the shoot apical meristem (SAM)^{12,26}. The multicellular forms with apical growth are pre-adaptations that appeared in algae before the appearance of land plants⁴³ and could be among the functions of an ancient GRF.

Although some Charophytes already occupied land^{40,42}, the appearance of alternating life cycles and the three-dimensional (3D) growth, with the development of plant body plans, are currently accepted as important attributes that enabled plant adaptation and evolutionary success in the terrestrial habitat^{42,43}.

The APETALA2 (AP2) TFs are known to promote the 3D growth and to determine the identity of stem cells in moss⁴⁶. Transcriptome analysis conducted in arabidopsis with double mutants of AP2-type AINTEGUMENTA (ANT) and its partner SEUSS (SEU) showed a decrease in the expression of *GRF* genes. The downregulation of *AtGRF5* was also confirmed by *in situ* hybridization⁴⁷. It could indicate another ancient function of GRFs; however, the specific relationship between GRFs and this specific AP2 remains elusive.

GRFs are known to regulate the expression of *KNOX I* genes by directly binding to its promoter and this function is conserved across monocot and dicot species⁵. *KNOX* proteins are involved in alternating of generations, and its ancestral role in life cycle progression is conserved in bryophytes²². During the evolution, *KNOX* genes diverged into class I and II, before the land colonization. A third class, M, is found only in eudicot species so far²². In angiosperms, *KNOX* genes are known to participate in SAM maintenance and organ differentiation by regulating the production of gibberellins, then, its expression must be strictly controlled by GRFs and other transcription factors (TFs)^{5,22}.

TCPs are putative targets of *KNOX* TFs and are essential for sporophyte developmental progression and body plan architecture in moss^{48,49}. *TCPs* are divided into class I and II, and *AtTCP4* is a member of class II. *AtTCP4* is directly regulated by miR396³¹ and the encoded protein regulates *AtGRF5*, *AtGRF6* and *AtGIF1*, which are not targets of this miRNA, suggesting a direct regulation of GRFs by *TCP4*, independently of miR396²⁶.

The regulatory system composed by miR396 and GRFs is involved in the control of root growth and mycorrhizal colonization in the model legume barrel medic. Transgenic roots overexpressing a miR396 precursor showed lower expression of six *GRFs* and two *bHLH* genes. These plants showed limited growth and reduced mycorrhizal colonization, and the growth limitation caused by miR396 overexpression occurred mainly via repression of *GRF* genes⁵⁰. The association with arbuscular mycorrhizal fungi was shown to be essential for plant success on land in basal species, since it allowed increased nutrient acquisition⁵¹.

Beyond that, GRFs were also previously related to stress responses and hormone pathways. Some of these attributes were already present in early diverging Charophytes, like tolerance to desiccation and high UV-B radiation,

besides the presence of hormones^{40,43}. AtGRF7 was shown to be involved in the regulation of osmotic stress-responsive genes, like *DREB2A*⁴. Also, GRFs are known to regulate leaf size and some stress conditions may directly affect growth^{11,14,52}. High UV-B levels are associated with smaller leaf size, and GRFs were shown to be regulated during this stress³⁰. A recent study showed that the decrease in leaf growth during UV-B stress is consequence of a reduction in cell production through changes in GRFs and gibberellin levels⁵².

GRFs were first reported as responsive to GA3 levels¹ and other works suggested the relationship of GRFs and hormonal pathways. ZmGRF1 was shown to modulate gibberellin levels in the growth zone of maize leaves⁵². OsGRF4 interacts with GSK2, a central negative regulator of BR signalling. This interaction was shown to be important for the regulation of grain length by BR¹⁹. Also, the expression of GRFs from tomato is modulated by GA3, ABA and JA treatment⁵³. Since hormones were already present in Charophytes⁴⁰, GRFs ancestor gene may already have a function in hormone signaling and responses.

The data published so far demonstrate that GRFs are involved in a wide range of processes in plants, from cell division to stress responses. The characterization of genes directly related with GRFs could indicate ancient functions of GRFs. Studies conducted in basal extant species showed that KNOX1 and TCP4 are involved with the alternation of generations and development of body plans. Since GRFs, KNOX1 and TCP4 are known to regulate each other expression, GRF ancient functions could be also related to these processes. Moreover, GRFs were already implicated in stress responses, like drought and UV-B light exposure, besides the participation in hormone signaling in flowering plants. All of these pathways comprise pre-adaptations that made ancestral land plants evolutionary successful, so, it is possible that the ancient GRF functions were important for the adaptation and evolution of plants in the terrestrial environment.

Functional studies on arabidopsis and rice showed that GRFs play diverse roles in important agronomic traits like plant growth, grain productivity, stress responses and integration of defense with growth processes. In this work, we identified several paralogous and probable orthologs of genes related to these traits that could be manipulated to enhance characteristics of interest. OsGRF4

and OsGRF6 have been linked to yield-related traits, regulating grain size^{18,19} and panicle branching⁵⁴, respectively. The expression of both genes and their homologs could be explored to improve plant productivity, alone or in combination, mainly in cereal crops. We identified paralogous and orthologs of both genes. OsGRF3 is paralogous of OsGRF4, while BdGRF5 and 11, and ZmGRF1, 5 and 6 are putative orthologs of OsGRF4. Also, OsGRF6 and OsGRF9 are contained in a syntenic block of duplication and seem to be paralogous, and the probable orthologs of OsGRF6 are BdGRF1, ZmGRF17 and ZmGRF18. AtGRF5 have been related to higher rates of photosynthesis¹⁵ and regulation of leaf size and shape^{11,40}. The genome of soybean contains two probable orthologs of AtGRF5, GmGRF11 and GmGRF12, that could be suitable candidates to be manipulated to modulate the photosynthetic rate.

Regarding the stress responses, AtGRF7 has been implicated in the regulation of osmotic stress responsive genes to prevent growth inhibition under stress conditions⁴. We found probable orthologs of AtGRF7 in the genomes of tomato, SIGRF8, and soybean, GmGRF7. The expression of AtGRF7 or its orthologs, in combination with osmotic defense genes, could be utilized to balance growth and defense processes during stress.

Alterations in the expression of AtGRF1 and 2 in response to the infection with cyst nematodes were already related to the development of the *syncytium*, a feeding structure that enables nematode establishment in roots²³. Modulation of the expression of both genes, or their putative orthologs SIGRF5 and 6, and GmGRF5, 6, 7 and 8, could be important to prevent the formation of the feeding structure, avoiding nematode infection.

All these genes are promising candidates for genetic engineering of important agronomic traits and could be further investigated in future studies.

Previous works reported the presence of QLQ in both SNF2 and GRF genes^{1,10,33,52,53}, but, to date, no study had been dedicated to explore the divergence between these important families. GIFs are known to be molecular partners of GRFs in the regulation of cell proliferation¹¹, ear development⁸, flower development¹³ and plant longevity¹⁴. Also, it is already known that the interaction of GRFs and GIFs occurs via QLQ and SNH domains, respectively. SNF2 proteins interact with SYT proteins, the GIF homologs. Since the region of the interaction of SNF2 with SYT was already described, we analyzed the

protein sequences and found that the regions correspond to QLQ and SNH domains respectively. Beyond that, AtGIF1 is shown to interact with SWI/SNF complexes through the interaction with BRM and SYD⁵⁵. These dimer formations prompted us to investigate the divergence between GRFs and SNF2 genes.

In this work, we suggest that GRFs arose from a duplication of SNF2 in the charophyte ancestor, and the divergence between these families appear to have occurred early in the evolution. Our phylogenetic analysis revealed that SNF2 and GRF genes are grouped into distinct clades with the presence of algae and mosses sequences in both clades. It suggests that the divergence between both SNF2 and GRF genes occurred before the emergence of land plants and after the divergence between the Chlorophyte and Charophyte lineages.

GIF proteins were already present in green algae⁹ and AtGIF1 was shown to interact with BRM and SYD, both members of SNF2 family⁵⁵. This indicates that the partnership with GIF proteins or its homologs is conserved even after the divergence between the families in the Charophyte ancestor. Since SNF2 exists in all eukaryotes, and GRFs are specific to Viridiplantae species, we propose that the origin of GRFs was due to a duplication event of SNF2 that occurred probably in a Charophyte ancestor, with the subsequent gain of the other domains that were maintained in GRFs. While SNF2 remained as chromatin remodeling proteins, GRFs evolved as specific transcription factors.

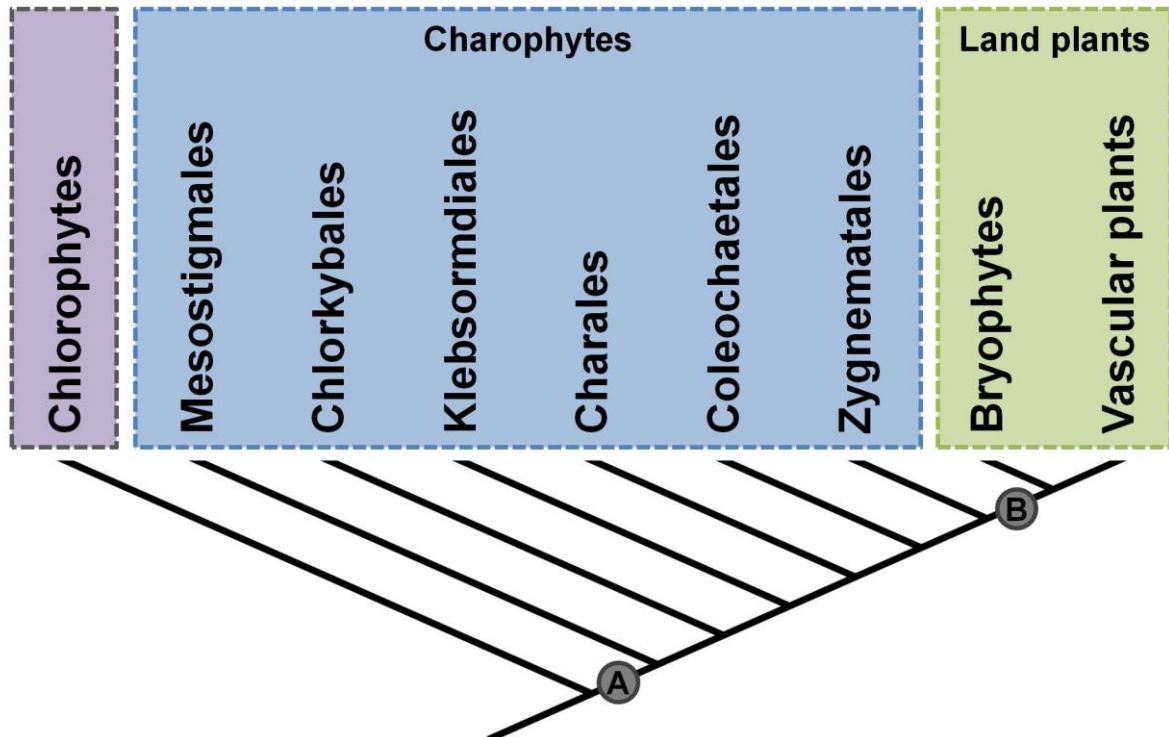


Figure 5 – Emergence and expansion of GRF family in Viridiplantae. (A) GRF emerged in a charophyte ancestor previous to Mesostigmatales. (B) The expansion of GRF family occurred in land plants. Diagram of the relationships between algae and plant lineages based on data already published⁴³.

METHODS

Sequence retrieve

The sequences were retrieved from the public databases Phytozome v12.0⁵⁶ (www.phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html), Metazome v3.2 (available at www.metazome.jgi.doe.gov/pz/portal.html), NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and *Klebsormidium nitens* NIES_2285 genome project v1.1⁴⁰ (available at: www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium). A detailed list of all species and *loci* used in this work is provided in Tables S1, S2, and S3.

For GRF sequences, two previously identified sequences, OsGRF1¹ and AtGRF1⁶, were used as queries in blastp, besides searches for QLQ and WRC annotated domains in the Phytozome database. The searches were conducted

against 36 sequenced plant genomes (Table S2) and 4 Chlorophyta genomes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Micromonas* sp. RCC299 and *Ostreococcus lucimarinus*), available at Phytozome. We also conducted blast search against the *Klebsormidium nitens* NIES 2285 genome to check the presence of GRFs in this organism. As the *K. nitens* is the unique Charophyte algae with sequenced genome available, and we wanted to know whether this family is conserved among these species, we decided to perform blast searches using transcriptome data in three other charophytes, *Spirogyra pratensis*, *Nitella mirabilis*, and *Mesostigma viridis*. The blast search was conducted in NCBI database using GRF sequence from *K. nitens* as query. However, to avoid misinterpretations due to alternative splicing derived forms and poorly expressed genes not represented in the transcriptomes, we did not include these sequences in our analysis. A tree of the 37 species was reconstructed with phyloT (available at <http://phylo.t.biobyte.de>), based on NCBI Taxonomy, to facilitate the visualization of GRF expansion in different species (Table 1).

The retrieved sequences were analyzed in ScanProsite to verify the presence of both QLQ and WRC domains. Complete protein sequences were subjected to domain analysis in ScanProsite⁵⁷, and only sequences presenting both domains were considered GRFs. We found GRFs only in Charophytes and land plants. From a total of 395 GRF sequences, 3 were discarded from the phylogenies due low score domains or bad quality alignments.

For SNF2 analysis, SNF2 from *Saccharomyces cerevisiae* was used as the query for blastp in NCBI database against 9 fungi species. For metazoan sequences, the same SNF2 was used as the query for searches against 11 complete sequenced genomes available at Metazome. Plant and *K. nitens* sequences were searched using the SNF2-related BRAHMA (BRM) from arabidopsis as query in blastp against the genomes of 7 plant and 5 algae species in Phytozome and *K. nitens* genome.

Sequence alignments and phylogenetic analysis

Sequence alignments were conducted using MUSCLE algorithm⁵⁸ with default parameters, available at MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)⁵⁹. The alignments were performed using CDS sequences. The

sequences were checked to find QLQ and WRC domains, which were used for phylogenetic analysis. Phylogenetic trees were reconstructed using nucleotide sequences of QLQ and WRC domains by Bayesian inference using BEAST2.4.5⁶⁰. For GRF sequences, the best fit model for nucleotide evolution was GTR with invariable sites and gamma-distributed rates. A smaller tree containing sequences from arabidopsis, rice and the moss *P. patens* was reconstructed with the same parameters to allow a better understanding of the gene structure analysis.

For SNF2-GRF analysis the best fit model for nucleotide evolution was TPM2 with invariable sites and gamma-distributed rates. Both models were selected with jModeltest v2.1.7 (<http://jmodeltest.org/>). The Birth and Death Model was selected as tree prior, and 100,000,000 generations were performed with Markov Chain Monte Carlo algorithm (MCMC)⁶¹ for evaluation of posterior distributions in all cases. After manual inspection of the alignments, 392 sequences were used based on alignment quality and the presence of both QLQ and WRC domains for GRF analysis, totaling 243 DNA sites, 108 corresponding to QLQ and 135 corresponding to WRC. For SNF2-GRF analysis, a total of 131 sequences from QLQ domains with 108 DNA sites were used. In both cases, convergence was verified with Tracer v.1.6⁶² (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>), and consensus trees were generated using TreeAnnotator, available at BEAST package. Resulting trees were viewed and edited using FigTree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Only posterior probability values above 0.7 are shown.

Domain architecture and gene structure analysis

Complete protein sequences of the 392 GRFs used in the phylogeny were submitted to MEME Suite v4.12.0⁶³ (<http://meme-suite.org/>), to search for 5 different motifs in any number of repetitions, in order to find different combinations of QLQ, WRC, FFD, TQL and GGPL in GRF proteins. We set a cut-off E-value of 10^{-6} to avoid false positives. The specific positions of the domains were used to construct a diagram presented in Fig. S1.

Protein sequences corresponding to the domains of all genes used in phylogeny analysis were used to construct the logos of the five domains on WebLogo3⁶⁴ (<http://weblogo.threeplusone.com>).

For gene structure analysis, we used genomic sequences of three representative species, arabidopsis, rice and *P. patens*. The informations about intron/exon organization were retrieved from Phytozome and used to construct the diagram presented on Fig. 3A.

Syntenic analysis and chromosomal locations

To better understand the pattern of expansion of GRFs, we conducted syntenic analysis on Plant Genome Duplication Database (PGDD)³⁶ (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>). Synteny is based on the occurrence of collinear blocks between genomes and these blocks are identified by the presence of homolog genes, also referred as anchors, in both genomes or in different segments inside a genome. Small blocks are former with a few anchors, while bigger blocks have a higher number of collinear homologs³⁶.

The loci of GRFs from arabidopsis, soybean, tomato, rice, maize, and purple false brome were searched in PGDD to find syntenic regions between different GRFs. A region of 100kb was searched for potential anchors with default parameters. The syntenic relationships between the genomes were illustrated using CIRCOS⁶⁵ (<http://circos.ca/>) (Fig. 4A and 4B). The chromosomal positions and duplications of arabidopsis and rice GRFs were drawn from information of NCBI and PGDD databases respectively (Fig. 4C and 4D).

We conducted *ka/ks* analysis in the PGDD database, with default settings, for all the putative ortholog pairs. The *Ka/Ks* ratio is important to help understanding the evolutionary dynamics of protein-coding sequences in different species. Negative *Ka/Ks* ratio suggest a purifying selection, while a positive value suggest diversifying selection and equal values of *Ka* and *Ks* indicate neutral mutation rates³⁶.

Identification of OsGRF putative targets

To identify putative targets of the rice GRFs we determined the location of the conserved motif “TGTCAG” or the reverse complement “CTGACA” in the rice genome using fuzznuc tool from EMBOSS³⁸. All the hits were annotated back in the rice genome using ChIPpeakAnno package⁶⁶ for R environment. Genes containing at least 2 motifs within 1500bp upstream ATG were selected using a customized R script. The functional annotation of Gene Ontology terms and a statistical overrepresentation test were performed using PANTHER 11³⁹ database with default settings and only results with $P < 0.05$ were considered.

Data availability

All the accession codes are available in Tables S1, S2, S3, S5 and Figure S1. The datasets generated during the current study are available from the corresponding author upon request.

REFERENCES

1. Van der Knaap, E., Kim, J. H. & Kende, H. A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol* **122**, 695–704 (2000).
2. Raventós, D. *et al.* HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *J Biol Chem* **273**, 23313–23320 (1998).
3. Osnato, M. *et al.* Cross talk between the KNOX and ethylene pathways is mediated by intron-binding transcription factors in barley. *Plant Physiol* **154**, 1616–1632 (2010).
4. Kim, J.-S. *et al.* Arabidopsis growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *Plant Cell* **24**, 3393–3405 (2012).
5. Kuijt, S. J. H. *et al.* Interaction between the GROWTH-REGULATING FACTOR and KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN families of transcription factors. *Plant Physiol* **164**, 1952–1966 (2014).

6. Kim, J. H., Choi, D. & Kende, H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J* **36**, 94–104 (2003).
7. Wang, F. *et al.* Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* **15**, 807 (2014).
8. Zhang, D.-F. *et al.* Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in Maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci* **175**, 809–817 (2008).
9. Hoe Kim, J. & Tsukaya, H. Regulation of plant growth and development by the GROWTH-REGULATING FACTOR and GRF-INTERACTING FACTOR duo. *J Exp Bot* **66**, 6093–6107 (2015).
10. Omidbakhshfard, M. A., Proost, S., Fujikura, U. & Mueller-Roeber, B. Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Mol Plant* **8**, 998–1010 (2015).
11. Horiguchi, G., Kim, G.-T. & Tsukaya, H. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **43**, 68–78 (2005).
12. Kim, J. H. & Lee, B. H. GROWTH-REGULATING FACTOR4 of Arabidopsis thaliana is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *Journal of Plant Biology* **49**, 463–468 (2006).
13. Liu, H. *et al.* OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJMJ706 and OsCR4. *Plant Physiol* **165**, 160–174 (2014).
14. Debernardi, J. M. *et al.* Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. *Plant J* **79**, 413–426 (2014).
15. Vercruyssen, L. *et al.* GROWTH REGULATING FACTOR5 stimulates Arabidopsis chloroplast division, photosynthesis, and leaf longevity. *Plant Physiol* **167**, 817–832 (2015).
16. Liu, J. *et al.* The BnGRF2 gene (GRF2-like gene from Brassica napus) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis. *J Exp Bot* **63**, 3727–3740 (2012).
17. Hu, J. *et al.* A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant* **8**, 1455–1465 (2015).

18. Duan, P. *et al.* Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nature Plants* **2**, 15203 (2015).
19. Che, R. *et al.* Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature Plants* **2**, 15195 (2015).
20. Li, S. *et al.* The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnol J* **14**, 2134–2146 (2016).
21. Sun, P. *et al.* OsGRF4 controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice. *J Integr Plant Biol* **58**, 836–847 (2016).
22. Tsuda, K. & Hake, S. Diverse functions of KNOX transcription factors in the diploid body plan of plants. *Curr Opin Plant Biol* **27**, 91–96 (2015).
23. Hewezi, T., Maier, T. R., Nettleton, D. & Baum, T. J. The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiol* **159**, 321–335 (2012).
24. Soto-Suárez, M., Baldrich, P., Weigel, D., Rubio-Somoza, I. & San Segundo, B. The Arabidopsis miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens. *Sci Rep* **7**, 44898 (2017).
25. Kim, J. H. & Kende, H. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13374–13379 (2004).
26. Rodriguez, R. E. *et al.* Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development* **137**, 103–112 (2010).
27. Wang, L. *et al.* miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *J Exp Bot* **62**, 761–773 (2011).
28. Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A. & Zheng, C.-C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA* **14**, 836–843 (2008).
29. Zhou, J. *et al.* Expression profile of miRNAs in Populus cathayana L. and Salix matsudana Koidz under salt stress. *Mol Biol Rep* **39**, 8645–8654 (2012).
30. Casadevall, R., Rodriguez, R. E., Debernardi, J. M., Palatnik, J. F. & Casati, P. Repression of growth regulating factors by the microRNA396

inhibits cell proliferation by UV-B radiation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **25**, 3570–3583 (2013).

31. Schommer, C., Debernardi, J. M., Bresso, E. G., Rodriguez, R. E. & Palatnik, J. F. Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Mol Plant* **7**, 1533–1544 (2014).
32. Nagai, M. *et al.* Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3843–3848 (2001).
33. Cao, Y., Han, Y., Jin, Q., Lin, Y. & Cai, Y. Comparative Genomic Analysis of the GRF Genes in Chinese Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd), Poplar (*Populus*), Grape (*Vitis vinifera*), Arabidopsis and Rice (*Oryza sativa*). *Front Plant Sci* **7**, 1750 (2016).
34. Filiz, E., Koç, İ. & Tombuloğlu, H. Genome-wide identification and analysis of growth regulating factor genes in *Brachypodium distachyon*: in silico approaches. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY* **38**, 296–306 (2014).
35. Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* **43**, D257–60 (2015).
36. Lee, T.-H., Tang, H., Wang, X. & Paterson, A. H. PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Res* **41**, D1152–8 (2013).
37. O'Malley, R. C. *et al.* Cistrome and episcistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell* **165**, 1280–1292 (2016).
38. Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. EMBOSS: the european molecular biology open software suite. *Trends Genet* **16**, 276–277 (2000).
39. Mi, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* **45**, D183–D189 (2017).
40. Hori, K. *et al.* *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun* **5**, 3978 (2014).
41. Delwiche, C. F. & Cooper, E. D. The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Curr Biol* **25**, R899–910 (2015).
42. Harholt, J., Moestrup, Ø. & Ulvskov, P. Why Plants Were Terrestrial from the Beginning. *Trends Plant Sci* **21**, 96–101 (2016).
43. Jill Harrison, C. Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **372**, (2017).

44. Renny-Byfield, S. & Wendel, J. F. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *Am J Bot* **101**, 1711–1725 (2014).
45. Wu, L. *et al.* Overexpression of the maize GRF10, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height. *J Integr Plant Biol* **56**, 1053–1063 (2014).
46. Aoyama, T. *et al.* AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **139**, 3120–3129 (2012).
47. Wynn, A. N., Rueschhoff, E. E. & Franks, R. G. Transcriptomic characterization of a synergistic genetic interaction during carpel margin meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **6**, e26231 (2011).
48. Tsuda, K., Ito, Y., Sato, Y. & Kurata, N. Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice. *Plant Cell* **23**, 4368–4381 (2011).
49. Ortiz-Ramírez, C. *et al.* A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Mol Plant* **9**, 205–220 (2016).
50. Bazin, J. *et al.* miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **74**, 920–934 (2013).
51. Delaux, P.-M. *et al.* Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 13390–13395 (2015).
52. Fina, J. *et al.* UV-B Inhibits Leaf Growth through Changes in Growth Regulating Factors and Gibberellin Levels. *Plant Physiol* **174**, 1110–1126 (2017).
53. Khatun, K. *et al.* Molecular characterization and expression profiling of tomato GRF transcription factor family genes in response to abiotic stresses and phytohormones. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
54. Gao, F. *et al.* Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture. *Nature Plants* **2**, 15196 (2015).
55. Vercruyssen, L. *et al.* ANGUSTIFOLIA3 binds to SWI/SNF chromatin remodeling complexes to regulate transcription during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* **26**, 210–229 (2014).
56. Goodstein, D. M. *et al.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40**, D1178–86 (2012).

57. De Castro, E. *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* **34**, W362–5 (2006).
58. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792–1797 (2004).
59. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870–1874 (2016).
60. Bouckaert, R. *et al.* BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003537 (2014).
61. Gilks, W. R. in *Encyclopedia of Biostatistics* (eds. Armitage, P. & Colton, T.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2005). doi:10.1002/0470011815.b2a14021
62. Rambaut, A., Suchard, M., Xie, D. & Drummond, A. *Tracer v1.6*. (not shown, 2014). at <<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>>
63. Bailey, T. L. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202–8 (2009).
64. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188–1190 (2004).
65. Krzywinski, M. *et al.* Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* **19**, 1639–1645 (2009).
66. Zhu, L. J. *et al.* ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics* **11**, 237 (2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

LSF and was supported by a PhD grant from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior), PMB was supported by the post-doc grant SFRH/BPD/86742/2012 awarded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), CCC was supported by a PhD grant from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), MABM was supported by a PIBIC grant (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) from CNPq, ACTZ and MMP were supported by CNPq grants (306202/2016-6 and 304991/2014-7, respectively). NJMS was supported by FCT through FCT Investigator (IF/01126/2012) and R&D unit, UID/Multi/04551/2013 (GREEN-IT). The latter also supported PMB.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LSF, PMB, CCC and ACTZ planned experiments; LSF, PMB and MABM conducted experiments; LSF, PMB, CCC, NJMS, ACTZ and MMP analyzed the results; LSF prepared figures and tables; LSF, NJMS, ACTZ and MMP wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

SUPPLEMENTARY INFORMATION:

Supplementary Table S1 – Species, loci and taxa terminologies of SNF2-type genes

	Organism	Genome version	Loci	Names used in the tree
Fungi	<i>Allomyces macrogynus</i> ATCC 38327	GCA_000151295.1	AMAG12941; AMAG20005	Ama_12941; Ama_20005
	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	ASM14920v1	XM_654790	Ani_XM654790
	<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	GCA_000275845.1	XM_007364686; XM_007368367	Dsq_XM007364686; Dsq_XM007368367
	<i>Eremothecium gossypii</i> ATCC 10895	ASM9102v4	NM_212245	Ego_NM212245
	<i>Pneumocystis carinii</i> B80	GCA_001477545.1	XM_018369289	Pca_XM018369289
	<i>Penicillium digitatum</i> Pd1	GCA_000315645.2	XM_014678523	Pdi_XM014678523
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	GCA_000146045.2	NM_001183709	Sce_NM001183709
	<i>Ustilago maydis</i> 521	GCA_000328475.2	XM_011389107	Uma_XM011389107
	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	GCA_000185945.1	XM_0031965851	Cga_XM0031965851
Algae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	v5.5	CRE07.G325700	Cre_07G325700
	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	v3.0	EUGENE.0200010520; EUGENE.0600010227	Msp_0200010520; Msp_0600010227
	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	v3	MICPUC2.EUGENE.0000090245	Mpu_0000090245
	<i>Volvox carteri</i>	v2.1	VOCAR.002150108	Vca_002150108
	<i>Klebsormidium nitens</i>	v1.1	kfi00148_0270	Kfi_001480270
Land Plants	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TAIR10	AT2G28290 (SYD); AT2G46020 (BRM)	Ath_AT2G28290; Ath_AT2G46020
	<i>Brachypodium distachyon</i>	v3.1	BRAD11G44177; BRAD13G01297	Bdi_1G44177; Bdi_3G01297
	<i>Brassica rapa</i>	FPsc v1.3	BRARA.C02316; BRARA.D02781	Bra_C02316; Bra_D02781
	<i>Oryza sativa</i>	v7_JGI	LOC_Os02g02290	Osa_Os02g02290
	<i>Physcomitrella patens</i>	v3.3	Pp3c13_14440; Pp3c14_90; Pp3c3_15820	Ppa_3c1314440; Ppa_3c1490; Ppa_3c315820
	<i>Populus trichocarpa</i>	v3.1	POTRI.002G160900; POTRI.008G195900; POTRI.010G019400; POTRI.014G086500	Ptr_002G160900; Ptr_008G195900; Ptr_010G019400; Ptr_014G086500
	<i>Sphagnum fallax</i>	v0.5	SPHFALX002950063; SPHFALX005850094	Sfa_0029s0063; Sfa_0058s0094
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Metazome v3	WBGENE00004204	Cel_00004204
	<i>Canis familiaris</i>	Metazome v3	LOC476335; LOC476710	Cfa_LOC476335; Cfa_LOC476710
	<i>Danio rerio</i>	Metazome v3	ENSDARG0000004314; ENSDARG0000008904; ENSDARG00000046105	Dre_0000004314; Dre_0000008904; Dre_00000046105
Metazoans	<i>Gallus gallus</i>	Metazome v3	ENSGALG00000010164	Gga_00000010164
	<i>Homo sapiens</i>	Metazome v3	ENSG00000080503; ENSG00000127616	Hsa_00000080503; Hsa_00000127616
	<i>Monodelphis domestica</i>	Metazome v3	ENSMODG0000003578; ENSMODG0000006287	Mdo_0000003578; Mdo_0000006287
	<i>Nematostella vectensis</i>	Metazome v3	178940	Nve_178940
	<i>Rattus norvegicus</i>	Metazome v3	ENSRNOG0000009271; ENSRNOG0000011931	Rno_0000009271; Rno_0000011931
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Metazome v3	LOC589355; LOC756605	Stp_LOC589355; Stp_LOC756605
	<i>Tribolium castaneum</i>	Metazome v3	LOC655742	Trc_LOC655742
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Metazome v3	461216; 470898	Xtr_461216; Xtr_470898

Supplementary Table S2 - Species, loci and taxa terminologies of GRF genes used in the trees

Organism and genome version	GRFs	Loci	Names used on trees
<i>Aquilegia coerulea</i> v3.1	7	Acqoe1G454000 ; Acqoe2G129900; Acqoe3G214400; Acqoe5G457000 ; Acqoe6G259800; Acqoe7G060800; Acqoe7G112900	Aco_1G454000; Aco_2G129900; Aco_3G214400; Aco_5G457000; Aco_6G259800; Aco_7G060800; Aco_7G112900
<i>Arabidopsis lyrata</i> v2.1	9	AL3G26150; AL3G43750; AL4G12420; AL4G32560; AL4G44650; AL5G33700; AL7G12940; AL7G29140; AL8G28610	Aly_3G26150; Aly_3G43750; Aly_4G12420; Aly_4G32560; Aly_4G44650; Aly_5G33700; Aly_7G12940; Aly_7G29140; Aly_8G28610
<i>Arabidopsis thaliana</i> TAIR10	9	AT2G06200; AT2G22840; AT2G36400; AT2G45480; AT3G13960; AT3G52910; AT4G24150; AT4G37740; AT5G53660	Ath_AT2G06200; Ath_AT2G22840; Ath_AT2G36400; Ath_AT2G45480; Ath_AT3G13960; Ath_AT3G52910; Ath_AT4G24150; Ath_AT4G37740; Ath_AT5G53660
<i>Boechea stricta</i> v1.2	8	Bostr.23794s0452; Bostr.24399s0028; Bostr.25993s0227; Bostr.26833s0909; Bostr.28625s0309; Bostr.7867s0220; Bostr.7867s1635; Bostr.19427s0054	Bos_23794s0452; Bos_24399s0028; Bos_25993s0227; Bos_26833s0909; Bos_28625s0309; Bos_7867s0220; Bos_7867s1635; Bos_9427s0054
<i>Brachypodium distachyon</i> v3.1	12	Bradi1g09900; Bradi1g12650; Bradi1g28400; Bradi1g46427; Bradi1g50597; Bradi2g14320; Bradi3g51685; Bradi3g52547; Bradi3g57267; Bradi4g16450; Bradi5g18961; Bradi5g20607	Bdi_1g09900; Bdi_1g12650; Bdi_1g28400; Bdi_1g46427; Bdi_1g50597; Bdi_2g14320; Bdi_3g51685; Bdi_3g52547; Bdi_3g57267; Bdi_4g16450; Bdi_5g18961; Bdi_5g20607
<i>Brachypodium stacei</i> v1.1	12	Brast02G260100; Brast02G292700; Brast04G093600; Brast04G039200; Brast04G104800; Brast06G139500; Brast07G020400; Brast07G067500; Brast08G002800; Brast09G178600; Brast09G195300; Brast10G125600	Bst_02G260100; Bst_02G292700; Bst_04G0936000; Bst_04G039200; Bst_04G104800; Bst_06G139500; Bst_07G020400; Bst_07G067500; Bst_08G002800; Bst_09G178600; Bst_09G195300; Bst_10G125600
<i>Brassica rapa</i> FPsc v1.3	16	Brara.A00122; Brara.A01418; Brara.A03222; Brara.B01438; Brara.C01828; Brara.C02492; Brara.C03502; Brara.D02218; Brara.D02744; Brara.E00841; Brara.E02725; Brara.G00464; Brara.G01562; Brara.I03590; Brara.K00742; Brara.K01237	Bra_A00122; Bra_A01418; Bra_A03222; Bra_B01438; Bra_C01828; Bra_C02492; Bra_C03502; Bra_D02218; Bra_D02744; Bra_E00841; Bra_E02725; Bra_G00464; Bra_G01562; Bra_I03590; Bra_K00742; Bra_K01237
<i>Capsella grandiflora</i> v1.1	8	Cagra.0228s0030; Cagra.0612s0011; Cagra.0736s0034; Cagra.0757s0005; Cagra.2460s0032; Cagra.4290s0006; Cagra.9757s0010; Cagra.1226s0080	Cgr_0228s0030; Cgr_0612s0011; Cgr_0736s0034; Cgr_0757s0005; Cgr_2460s0032; Cgr_4290s0006; Cgr_9757s0010; Cgr_1226s0080
<i>Capsella rubella</i> v1.0	8	Carubv10004544m.g; Carubv10007298m.g; Carubv10013860m.g; Carubv10015887m.g; Carubv10017366m.g; Carubv10022975m.g; Carubv10025172m.g; Carubv10026610m.g	Cru_10004544; Cru_10007298; Cru_10013860; Cru_10015887; Cru_10017366; Cru_10022975; Cru_10025172; Cru_10026610
<i>Citrus clementina</i> v1.0	9	Ciclev10001613m.g; Ciclev10008922m.g; Ciclev10011856m.g; Ciclev10019529m.g; Ciclev10019828m.g; Ciclev10022033m.g; Ciclev10025209m.g; Ciclev10025855m.g; Ciclev10032065m.g Acqoe7G060800	Ccl_10001613; Ccl_10008922; Ccl_10011856; Ccl_10019529; Ccl_10019828; Ccl_10022033; Ccl_10025209; Ccl_10025855; Ccl_10032065Aco_7G060800
<i>Citrus sinensis</i> v1.1	9	orange1.1g007514m.g; orange1.1g009918m.g; orange1.1g010979m.g; orange1.1g018208m.g; orange1.1g020051m.g; orange1.1g023105m.g; orange1.1g028751m.g; orange1.1g047108m.g; orange1.1g040599m.g†	Csi_g007514m; Csi_g009918m; Csi_g010979m; Csi_g018208m; Csi_g020051m; Csi_g023105m; Csi_g028751m; Csi_g047108m;
<i>Cucumis sativus</i> v1.0	8	Cucsa.017410; Cucsa.257800; Cucsa.378420; Cucsa.395430; Cucsa.103390; Cucsa.117300; Cucsa.141640; Cucsa.192190	Csa_017410; Csa_257800; Csa_378420; Csa_395430; Csa_103390; Csa_117300; Csa_141640; Csa_192190
<i>Eucalyptus grandis</i> v2.0	5	Eucgr.A01418; Eucgr.A01534; Eucgr.C00823; Eucgr.F00097; Eucgr.F04420	Egr_A01418; Egr_A01534; Egr_C00823; Egr_F00097; Egr_F04420
<i>Eutrema salsugineum</i> v1.0	9	Thhalv10000124m.g; Thhalv10001460m.g; Thhalv10002643m.g; Thhalv10010453m.g; Thhalv10013862m.g; Thhalv10016778m.g; Thhalv10020873m.g; Thhalv10024915m.g; Thhalv10025371m.g	Esa_10000124; Esa_10001460; Esa_10002643; Esa_10010453; Esa_10013862; Esa_10016778; Esa_10020873; Esa_10024915; Esa_10025371
<i>Fragaria vesca</i> v1.1	10	gene01886v1.0hybrid; gene02620v1.0hybrid; gene05636v1.0hybrid; gene07429v1.0hybrid; gene12474v1.0hybrid; gene12549v1.0hybrid; gene12741v1.0hybrid; gene13517v1.0hybrid; gene19384v1.0hybrid; gene30232v1.0hybrid	Fve_01886; Fve_02620; Fve_05636; Fve_07429; Fve_12474; Fve_12549; Fve_12741; Fve_13517; Fve_19384; Fve_30232
<i>Glycine max</i> Wm82.a2.v1	24	Glyma.01G148600; Glyma.01G234400; Glyma.03G192200; Glyma.04G230600; Glyma.06G134600; Glyma.07G038400; Glyma.09G068700; Glyma.09G212500; Glyma.U028600; Glyma.U028700; Glyma.10G067200; Glyma.11G008500; Glyma.11G110700; Glyma.11G208800; Glyma.12G014700; Glyma.13G109500;	Gma_01G148600; Gma_01G234400; Gma_03G192200; Gma_04G230600; Gma_06G134600; Gma_07G038400; Gma_09G068700; Gma_09G212500; Gma_U028600; Gma_U028700; Gma_10G067200; Gma_11G008500; Gma_11G110700; Gma_11G208800; Gma_12G014700; Gma_13G109500;

Cont. Supplementary Table S2 - Species, *loci* and taxa terminologies of GRF genes used in the trees

Organism and genome version	GRFs	<i>Loci</i>	Names used on trees
		Glyma.15G176500; Glyma.16G007600; Glyma.17G050200; Glyma.17G232600; Glyma.17G232700; Glyma.03G021900; Glyma.01G144900; Glyma.19G192700	Gma_15G176500; Gma_16G007600; Gma_17G050200; Gma_17G232600; Gma_17G232700; Gma_03G021900; Gma_01G144900; Gma_19G192700
<i>Gossypium raimondii</i> v2.1	18	Gorai.003G032300; Gorai.003G057700; Gorai.004G204600; Gorai.005G098700; Gorai.006G157300; Gorai.007G092400; Gorai.008G241800; Gorai.008G259500; Gorai.008G265600; Gorai.009G035200; Gorai.009G222200; Gorai.009G277500; Gorai.009G406500; Gorai.010G027700; Gorai.011G058800; Gorai.011G108400; Gorai.013G184200; Gorai.013G225300	Gra_003G032300; Gra_003G057700; Gra_004G204600; Gra_005G098700; Gra_006G157300; Gra_007G092400; Gra_008G241800; Gra_008G259500; Gra_008G265600; Gra_009G035200; Gra_009G222200; Gra_009G277500; Gra_009G406500; Gra_010G027700; Gra_011G058800; Gra_011G108400; Gra_013G184200; Gra_013G225300
<i>Klebsormidium nitens</i> v1.1	1	kfl00186_0090	Kfl_001860090
<i>Manihot esculenta</i> v6.1	15	Manes.01G041800; Manes.01G070800; Manes.01G264700; Manes.02G031200; Manes.03G039500; Manes.04G144700; Manes.05G043700; Manes.05G183900; Manes.08G022300; Manes.08G160800; Manes.09G059500; Manes.11G020200; Manes.12G117600; Manes.16G096400; Manes.18G049600	Mes_01G041800; Mes_01G070800; Mes_01G264700; Mes_02G031200; Mes_03G039500; Mes_04G144700; Mes_05G043700; Mes_05G183900; Mes_08G022300; Mes_08G160800; Mes_09G059500; Mes_11G020200; Mes_12G117600; Mes_16G096400; Mes_18G049600
<i>Medicago truncatula</i> Mt4.Ov1	9	Medtr0001s0490; Medtr1g017490; Medtr2g041430; Medtr3g092330; Medtr4g125490; Medtr5g027030; Medtr7g104050; Medtr8g020560; Medtr8g035910	Mtr_0001s0490; Mtr_1g017490; Mtr_2g041430; Mtr_3g092330; Mtr_4g125490; Mtr_5g027030; Mtr_7g104050; Mtr_8g020560; Mtr_8g035910
<i>Oryza sativa</i> v7_JGI	12	LOC_Os02g45570; LOC_Os02g47280; LOC_Os02g53690; LOC_Os03g47140; LOC_Os03g51970; LOC_Os04g48510; LOC_Os04g51190; LOC_Os06g02560; LOC_Os06g10310; LOC_Os07g28430; LOC_Os11g35030; LOC_Os12g29980	Osa_Os02g45570; Osa_Os02g47280; Osa_Os02g53690; Osa_Os03g47140; Osa_Os03g51970; Osa_Os04g48510; Osa_Os04g51190; Osa_Os06g02560; Osa_Os06g10310; Osa_Os07g28430; Osa_Os11g35030; Osa_Os12g29980
<i>Panicum hallii</i> v2.0	10	Pahal.A02912; Pahal.A03059; Pahal.A03557; Pahal.B03870; Pahal.D02874; Pahal.G02182; Pahal.H01224; Pahal.H02316; Pahal.I01892; Pahal.I02265	Pha_A02912; Pha_A03059; Pha_A03557; Pha_B03870; Pha_D02874; Pha_G02182; Pha_H01224; Pha_H02316; Pha_I01892; Pha_I02265
<i>Panicum virgatum</i> v1.1	19	Pavir.Aa00789; Pavir.Aa00919; Pavir.Ab02786; Pavir.Ba01449; Pavir.Bb02610; Pavir.Da01847; Pavir.Da02366; Pavir.Db02048†; Pavir.Db02421; Pavir.Ga00724; Pavir.Gb00674; Pavir.Ha01401; Pavir.Hb00712; Pavir.Ia01043; Pavir.J03212; Pavir.J06517; Pavir.J11763; Pavir.J14128; Pavir.J29705	Pvi_Aa00789; Pvi_Aa00919; Pvi_Ab02786; Pvi_Ba01449; Pvi_Bb02610; Pvi_Da01847; Pvi_Da02366; Pvi_Db02421; Pvi_Ga00724; Pvi_Gb00674; Pvi_Ha01401; Pvi_Hb00712; Pvi_Ia01043; Pvi_J03212; Pvi_J06517; Pvi_J11763; Pvi_J14128; Pvi_J29705
<i>Phaseolus vulgaris</i> v2.1	11	Phvul.001G031000; Phvul.001G187500; Phvul.002G041800; Phvul.002G131700; Phvul.003G131800; Phvul.007G222300; Phvul.009G047000; Phvul.009G228000; Phvul.010G048400; Phvul.010G130000; Phvul.011G017700	Pvu_001G031000; Pvu_001G187500; Pvu_002G041800; Pvu_002G131700; Pvu_003G131800; Pvu_007G222300; Pvu_009G047000; Pvu_009G228000; Pvu_010G048400; Pvu_010G130000; Pvu_011G017700
<i>Physcomitrella patens</i> v3.3	2	Pp3c12_3720; Pp3c17_1780	Ppa_3c123720; Ppa_3c171780
<i>Populus trichocarpa</i> v3.1	19	Potri.001G082700; Potri.001G114000; Potri.001G132600; Potri.001G169100; Potri.002G115100; Potri.003G065000; Potri.003G100800; Potri.003G118100; Potri.006G115200; Potri.006G143200; Potri.007G007100; Potri.012G022600; Potri.013G077500; Potri.014G007200; Potri.014G012800; Potri.014G071800; Potri.015G006200; Potri.018G065400; Potri.019G042300	Pptr_001G082700; Pptr_001G114000; Pptr_001G132600; Pptr_001G169100; Pptr_002G115100; Pptr_003G065000; Pptr_003G100800; Pptr_003G118100; Pptr_006G115200; Pptr_006G143200; Pptr_007G007100; Pptr_012G022600; Pptr_013G077500; Pptr_014G007200; Pptr_014G012800; Pptr_014G071800; Pptr_015G006200; Pptr_018G065400; Pptr_019G042300
<i>Prunus persica</i> v2.1	10	Prupe.2G148100; Prupe.2G317500; Prupe.2G329200; Prupe.3G041800; Prupe.5G021400; Prupe.5G131600; Prupe.6G217000; Prupe.7G115500; Prupe.7G201000; Prupe.1G419000	Ppe_2G148100; Ppe_2G317500; Ppe_2G329200; Ppe_3G041800; Ppe_5G021400; Ppe_5G131600; Ppe_6G217000; Ppe_7G115500; Ppe_7G201000; Ppe_1G419000
<i>Ricinus communis</i> v0.1	9	27496.t00001; 28976.t00005; 29700.t000017; 29706.t000013;	Rco_27496m000094; Rco_28976m000158; Rco_29700m000761; Rco_29706m001283;

Cont. Supplementary Table S2 - Species, *loci* and taxa terminologies of GRF genes used in the trees

Organism and genome version	GRFs	<i>Loci</i>	Names used on trees
		29739.t000211; 30068.t000078; 30170.t000085; 30174.t000307; 30190.t000302	Rco_29739m003775; Rco_30068m002588; Rco_30170m013673; Rco_30174m008910; Rco_30190m011066
<i>Salix purpurea</i> v1.0	21	SapurV1A.0002s0920; SapurV1A.0004s0240; SapurV1A.0045s0430; SapurV1A.0051s0520; SapurV1A.0059s0450; SapurV1A.0063s0420; SapurV1A.0087s0080; SapurV1A.0094s0370; SapurV1A.0177s0310; SapurV1A.0208s0190; SapurV1A.0235s0230; SapurV1A.0260s0250; SapurV1A.0326s0130; SapurV1A.0532s0070; SapurV1A.0568s0060; SapurV1A.0608s0150; SapurV1A.0611s0190; SapurV1A.0616s0110; SapurV1A.0755s0030; SapurV1A.3102s0020; SapurV1A.3612s0010	Spu_0002s0920; Spu_0004s0240; Spu_0045s0430; Spu_0051s0520; Spu_0059s0450; Spu_0063s0420; Spu_0087s0080; Spu_0094s0370; Spu_0177s0310; Spu_0208s0190; Spu_0235s0230; Spu_0260s0250; Spu_0326s0130; Spu_0532s0070; Spu_0568s0060; Spu_0608s0150; Spu_0611s0190; Spu_0616s0110; Spu_0755s0030; Spu_3102s0020; Spu_3612s0010
<i>Selaginella moellendorffii</i> v1.0	4	412762; 417311; 420739; 442384	Smo_412762; Smo_417311; Smo_420739; Smo_442384
<i>Setaria italica</i> v2.2	10	Seita.2G309100; Seita.4G012400; Seita.4G086400; Seita.7G224500; Seita.8G149500; Seita.9G107700; Seita.9G141900; Seita.1G271800; Seita.1G287100; Seita.1G338700	Sit_2G309100; Sit_4G012400; Sit_4G086400; Sit_7G224500; Sit_8G149500; Sit_9G107700; Sit_9G141900; Sit_1G271800; Sit_1G287100; Sit_1G338700
<i>Solanum lycopersicum</i> iTAG.2.4	13	Solyc01g091540.1; Solyc02g092070.2; Solyc03g082430.1; Solyc04g077510.2; Solyc07g041640.2; Solyc08g005430.2; Solyc08g068760.1; Solyc08g075950.1; Solyc08g079800.2; Solyc08g083230.1; Solyc09g009200.1; Solyc10g083510.1; Solyc12g096070.1	Sly_01g091540; Sly_02g092070; Sly_03g082430; Sly_04g077510; Sly_07g041640; Sly_08g005430; Sly_08g068760; Sly_08g075950; Sly_08g079800; Sly_08g083230; Sly_09g009200; Sly_10g083510; Sly_12g096070
<i>Solanum tuberosum</i> v4.3	9	PGSC0003DMG400003220; PGSC0003DMG400004942; PGSC0003DMG400012233; PGSC0003DMG400012767; PGSC0003DMG400018491; PGSC0003DMG400021403; PGSC0003DMG400028259; PGSC0003DMG400029384; PGSC0003DMG400030881	Stu_400005813; Stu_400008794; Stu_400021643; Stu_400022619; Stu_400032217; Stu_400037092; Stu_400049127; Stu_400051174; Stu_400053791
<i>Sphagnum fallax</i> v0.5	4	Sphfalx0018s0181; Sphfalx0019s0149; Sphfalx0126s0017; Sphfalx0221s0016	Sfa_0018s0181; Sfa_0019s0149; Sfa_0126s0017; Sfa_0221s0016
<i>Theobroma cacao</i> v1.1	10	Thecc1EG000838; Thecc1EG005483; Thecc1EG015497; Thecc1EG015625; Thecc1EG016120; Thecc1EG022490; Thecc1EG025561; Thecc1EG029130; Thecc1EG034655; Thecc1EG037550	Tca_000838; Tca_005483; Tca_015497; Tca_015625; Tca_016120; Tca_022490; Tca_025561; Tca_029130; Tca_034655; Tca_037550
<i>Vitis vinifera</i> <i>Genoscope.12X</i>	10	GSVIVG01007165001; GSVIVG01009299001; GSVIVG01015095001; GSVIVG01016762001; GSVIVG01019913001; GSVIVG01024326001; GSVIVG01033800001; GSVIVG01038629001; GSVIVG01019667001; GSVIVG01027535001	Vvi_01007165001; Vvi_01009299001; Vvi_01015095001; Vvi_01016762001; Vvi_01019913001; Vvi_01024326001; Vvi_01033800001; Vvi_01038629001; Vvi_01019667001 (VviGRF9)*; Vvi_01027535001 (VviGRF10)*
<i>Zea mays</i> <i>Ensembl-18</i>	16	GRMZM2G004619; GRMZM2G018414; GRMZM2G034876; GRMZM2G041223; GRMZM2G045977; GRMZM2G067743; GRMZM2G096709; GRMZM2G098594; GRMZM2G099862; GRMZM2G105335; GRMZM2G124566; GRMZM2G129147; GRMZM2G178261; GRMZM5G850129; GRMZM5G853392; GRMZM5G893117†	Zma_2G004619; Zma_2G018414; Zma_2G034876; Zma_2G041223; Zma_2G045977; Zma_2G067743; Zma_2G096709; Zma_2G098594; Zma_2G099862; Zma_2G105335; Zma_2G124566; Zma_2G129147; Zma_2G178261; Zma_5G850129; Zma_5G853392

† Genes not used the trees due to low confidence or bad alignment of QLQ or WRC domains.

*Genes named in this work.

Supplementary Table S3 - GRF numbers and *loci* used in the syntenic analysis

GRF n°	<i>Glycine max</i>³⁰	<i>Zea mays</i>^{8,*}	<i>Solanum lycopersicum</i>⁵³	<i>Brachypodium distachyon</i>^{35,*}	<i>Oryza sativa</i>⁶⁸	<i>Arabidopsis thaliana</i>⁶
GRF1	Glyma.15G176500	GRMZM2G034876	Solyc12g096070	Bradi1g09900	LOC_Os02g53690	AT2G22840
GRF2	Glyma.09G068700	GRMZM2G099862	Solyc08g005430	Bradi1g12650	LOC_Os06g10310	AT4G37740
GRF3	Glyma.13G109500	GRMZM2G105335	Solyc08g075950	Bradi2g14320	LOC_Os04g51190	AT2G36400
GRF4	Glyma.17G050200	GRMZM2G004619	Solyc07g041640	Bradi4g16450	LOC_Os02g47280	AT3G52910
GRF5	Glyma.17G232700	GRMZM2G129147	Solyc04g077510	Bradi5g20607	LOC_Os06g02560	AT3G13960
GRF6	Glyma.U028700	GRMZM2G041223	Solyc02g092070	Bradi1g28400	LOC_Os03g51970	AT2G06200
GRF7	Glyma.17G232600	GRMZM5G850129	Solyc08g083230	Bradi1g46427	LOC_Os12g29980	AT5G53660
GRF8	Glyma.U028600	GRMZM2G033612†	Solyc03g082430	Bradi1g50597	LOC_Os11g35030	AT4G24150
GRF9	Glyma.04G230600	GRMZM5G893117	Solyc08g068760	Bradi3g51685	LOC_Os03g47140	AT2G45480
GRF10	Glyma.06G134600	GRMZM2G096709	Solyc01g091540	Bradi3g57267	LOC_Os02g45570	
GRF11	Glyma.16G007600	GRMZM2G067743	Solyc09g009200	Bradi3g52547*	LOC_Os07g28430	
GRF12	Glyma.07G038400	GRMZM2G119359†	Solyc10g083510	Bradi5g18961*	LOC_Os04g48510	
GRF13	Glyma.11G110700	GRMZM2G018414	Solyc08g079800			
GRF14	Glyma.12G014700	GRMZM2G098594				
GRF15	Glyma.01G234400	GRMZM2G045977*				
GRF16	Glyma.11G008500	GRMZM2G124566*				
GRF17	Glyma.09G212500	GRMZM2G178261*				
GRF18	Glyma.01G148600	GRMZM5G853392*				
GRF19	Glyma.03G192200					
GRF20	Glyma.19G192700					
GRF21	Glyma.10G067200					
GRF22	Glyma.11G208800					
GRF23	Glyma.01G144900					
GRF24	Glyma.03G021900					

† ZmGRF8: possess only a partial WRC and QLQ was not found

† ZmGRF12: QLQ and WRC were not found

* Genes named in this work.

Supplementary Table S4 – GO terms and enrichment analysis of putative targets of GRFs in rice

Gene Ontology biological process	Fold Enrichment	+/-	P value
response to gamma radiation	34.29	+	2.87E-02
response to stimulus	1.32	+	3.36E-03
regulation of leaf development	34.29	+	2.87E-02
regulation of endosperm development	34.29	+	2.87E-02
regulation of adaxial/abaxial pattern formation	34.29	+	2.87E-02
glycolipid translocation	34.29	+	2.87E-02
single-organism process	1.25	+	1.67E-04
cellular component organization	1.30	+	2.58E-02
cellular process	1.17	+	2.83E-04
cellular component organization or biogenesis	1.28	+	2.50E-02
single-organism cellular process	1.29	+	2.52E-03
glycolipid transport	34.29	+	2.87E-02
triglyceride catabolic process	34.29	+	2.87E-02
cellular lipid metabolic process	1.58	+	2.59E-02
lipid metabolic process	1.58	+	7.93E-03
organic substance metabolic process	1.23	+	2.51E-05
metabolic process	1.21	+	7.78E-06
primary metabolic process	1.22	+	6.87E-05
single-organism metabolic process	1.37	+	1.18E-04
cellular metabolic process	1.23	+	6.46E-05
acylglycerol catabolic process	34.29	+	2.87E-02
neutral lipid catabolic process	34.29	+	2.87E-02
cellular lipid catabolic process	5.28	+	1.14E-03
lipid catabolic process	2.64	+	1.88E-02
organic substance catabolic process	1.44	+	5.56E-03
catabolic process	1.44	+	2.40E-03
cellular catabolic process	1.39	+	1.71E-02
glycerolipid catabolic process	17.15	+	6.29E-03
pollen tube guidance	34.29	+	2.87E-02
reproductive process	1.65	+	4.32E-02
reproduction	1.65	+	4.32E-02
positive chemotaxis	34.29	+	2.87E-02
chemotaxis	34.29	+	2.87E-02
taxis	34.29	+	2.87E-02
locomotion	11.43	+	1.36E-02
developmental process involved in reproduction	2.47	+	1.24E-02
anatomical structure development	1.60	+	3.72E-02
protein-FAD linkage	34.29	+	2.87E-02
cellular protein modification process	1.24	+	1.87E-02
protein modification process	1.24	+	1.87E-02
protein metabolic process	1.27	+	1.70E-03
macromolecule metabolic process	1.23	+	2.90E-04
organonitrogen compound metabolic process	1.25	+	9.26E-04
nitrogen compound metabolic process	1.19	+	1.02E-03
macromolecule modification	1.18	+	3.91E-02
cellular protein metabolic process	1.20	+	2.40E-02
cellular macromolecule metabolic process	1.19	+	4.19E-03
7-methylguanosine cap hypermethylation	34.29	+	2.87E-02
RNA capping	9.80	+	1.82E-02
cell projection morphogenesis	34.29	+	2.87E-02
cell part morphogenesis	34.29	+	2.87E-02
phytochromobilin biosynthetic process	34.29	+	2.87E-02
phytochromobilin metabolic process	34.29	+	2.87E-02
cofactor metabolic process	2.00	+	6.54E-03
cofactor biosynthetic process	2.08	+	2.53E-02
self proteolysis	34.29	+	2.87E-02
proteolysis	1.50	+	2.58E-03
Rho protein signal transduction	34.29	+	2.87E-02

Cont. Supplementary Table S4 – GO terms and enrichment analysis of putative targets of GRFs in rice

Gene Ontology biological process	Fold Enrichment	+/-	P value
cellular response to stimulus	1.27	+	3.52E-02
cyanate metabolic process	34.29	+	2.87E-02
organic acid metabolic process	1.55	+	9.31E-03
small molecule metabolic process	1.42	+	1.03E-02
mitochondrial respiratory chain complex II assembly	34.29	+	2.87E-02
respiratory chain complex II assembly	34.29	+	2.87E-02
mitochondrial respiratory chain complex II biogenesis	34.29	+	2.87E-02
regulation of double-strand break repair via homologous recombination	34.29	+	2.87E-02
regulation of DNA recombination	34.29	+	2.87E-02
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	0.76	-	3.38E-02
meiotic telophase I	34.29	+	2.87E-02
telophase	34.29	+	2.87E-02
regulation of meristem structural organization	34.29	+	2.87E-02
plant epidermal cell fate specification	34.29	+	2.87E-02
megasporogenesis	22.86	+	3.61E-03
embryo sac development	13.72	+	9.64E-03
gametophyte development	5.28	+	7.54E-03
plant-type sporogenesis	13.72	+	9.64E-03
meiotic cell cycle process	3.24	+	2.07E-02
meiotic cell cycle	3.17	+	1.30E-02
cell cycle	2.13	+	4.62E-03
cell cycle process	2.36	+	5.98E-03
sexual sporulation	13.72	+	9.64E-03
sexual reproduction	5.08	+	8.58E-03
multi-organism reproductive process	5.08	+	8.58E-03
sporulation	13.72	+	9.64E-03
phospholipid catabolic process	17.15	+	7.82E-04
phosphate-containing compound metabolic process	1.25	+	2.09E-02
phosphorus metabolic process	1.26	+	1.68E-02
organophosphate catabolic process	5.41	+	1.88E-02
cellular response to nitrate	17.15	+	6.29E-03
cellular response to reactive nitrogen species	17.15	+	6.29E-03
response to nitrate	11.43	+	1.36E-02
cellular response to inorganic substance	5.72	+	4.86E-02
microsporogenesis	13.72	+	9.64E-03
pollen development	5.49	+	6.60E-03
NADP biosynthetic process	13.72	+	9.64E-03
nicotinamide nucleotide biosynthetic process	5.72	+	4.86E-02
pyridine nucleotide biosynthetic process	5.72	+	4.86E-02
pyridine nucleotide metabolic process	2.18	+	4.49E-02
oxidoreduction coenzyme metabolic process	2.49	+	1.19E-02
coenzyme metabolic process	2.18	+	6.24E-03
coenzyme biosynthetic process	2.24	+	3.97E-02
single-organism biosynthetic process	1.46	+	4.80E-03
nicotinamide nucleotide metabolic process	2.18	+	4.49E-02
embryo development ending in seed dormancy	12.86	+	1.77E-03
embryo development	12.86	+	1.77E-03
seed development	4.29	+	3.41E-02
fruit development	3.96	+	4.16E-02
attachment of GPI anchor to protein	11.43	+	1.36E-02
GPI anchor biosynthetic process	4.68	+	2.74E-02
GPI anchor metabolic process	4.68	+	2.74E-02
lipid biosynthetic process	1.64	+	3.14E-02
phosphatidylinositol biosynthetic process	4.42	+	1.36E-02
apoptotic process	11.43	+	1.36E-02
meiotic DNA double-strand break formation	11.43	+	1.36E-02

Cont. Supplementary Table S4 – GO terms and enrichment analysis of putative targets of GRFs in rice

Gene Ontology biological process	Fold Enrichment	+/-	P value
protein deneddylation	10.29	+	3.32E-03
histone H3-K9 demethylation	9.80	+	1.82E-02
histone lysine demethylation	7.62	+	2.90E-02
histone demethylation	6.86	+	3.51E-02
protein demethylation	6.23	+	4.16E-02
protein dealkylation	6.23	+	4.16E-02
threonine biosynthetic process	9.80	+	1.82E-02
carboxylic acid metabolic process	1.46	+	2.71E-02
oxoacid metabolic process	1.51	+	1.47E-02
threonine metabolic process	8.57	+	2.33E-02
nitrate transport	9.80	+	1.82E-02
7-methylguanosine RNA capping	9.80	+	1.82E-02
anther wall tapetum development	9.80	+	1.82E-02
anther development	6.86	+	3.51E-02
RNA (guanine-N7)-methylation	7.62	+	2.90E-02
regulation of cell proliferation	6.86	+	3.51E-02
DNA catabolic process	6.23	+	4.16E-02
DNA metabolic process	1.63	+	3.28E-02
hexose catabolic process	5.72	+	4.86E-02
single-organism carbohydrate metabolic process	1.80	+	8.19E-03
carbohydrate metabolic process	1.41	+	2.54E-02
single-organism carbohydrate catabolic process	2.33	+	3.35E-02
carbohydrate catabolic process	1.83	+	2.90E-02
3'-UTR-mediated mRNA destabilization	5.72	+	4.86E-02
mRNA destabilization	5.72	+	4.86E-02
regulation of mRNA stability	5.72	+	4.86E-02
RNA destabilization	5.72	+	4.86E-02
glucuronoxylan biosynthetic process	5.72	+	4.86E-02
glucuronoxylan metabolic process	5.72	+	4.86E-02
xylan metabolic process	3.71	+	2.42E-02
hemicellulose metabolic process	3.23	+	4.00E-03
cell wall polysaccharide metabolic process	3.23	+	4.00E-03
polysaccharide metabolic process	2.17	+	1.03E-03
cell wall macromolecule metabolic process	2.45	+	1.86E-02
xylan biosynthetic process	4.90	+	2.43E-02
cell wall polysaccharide biosynthetic process	4.90	+	2.43E-02
cellular polysaccharide biosynthetic process	2.64	+	8.38E-03
cellular polysaccharide metabolic process	2.40	+	2.77E-03
cellular carbohydrate metabolic process	1.87	+	1.19E-02
polysaccharide biosynthetic process	2.35	+	1.20E-02
carbohydrate biosynthetic process	1.75	+	4.65E-02
cellular carbohydrate biosynthetic process	2.07	+	2.62E-02
cell wall macromolecule biosynthetic process	4.47	+	3.06E-02
cellular component macromolecule biosynthetic process	4.47	+	3.06E-02
cell wall biogenesis	2.94	+	4.28E-03
glycogen metabolic process	5.14	+	2.15E-02
cellular glucan metabolic process	2.26	+	1.13E-02
glucan metabolic process	2.38	+	5.73E-03
energy reserve metabolic process	5.14	+	2.15E-02
generation of precursor metabolites and energy	1.67	+	4.69E-02
oxidation-reduction process	1.36	+	6.80E-03
one-carbon metabolic process	5.08	+	8.58E-03
root development	4.47	+	3.06E-02
root system development	4.47	+	3.06E-02
methionine metabolic process	4.29	+	3.41E-02
branched-chain amino acid biosynthetic process	4.12	+	3.77E-02
DNA duplex unwinding	3.57	+	1.42E-02

Cont. Supplementary Table S4 – GO terms and enrichment analysis of putative targets of GRFs in rice

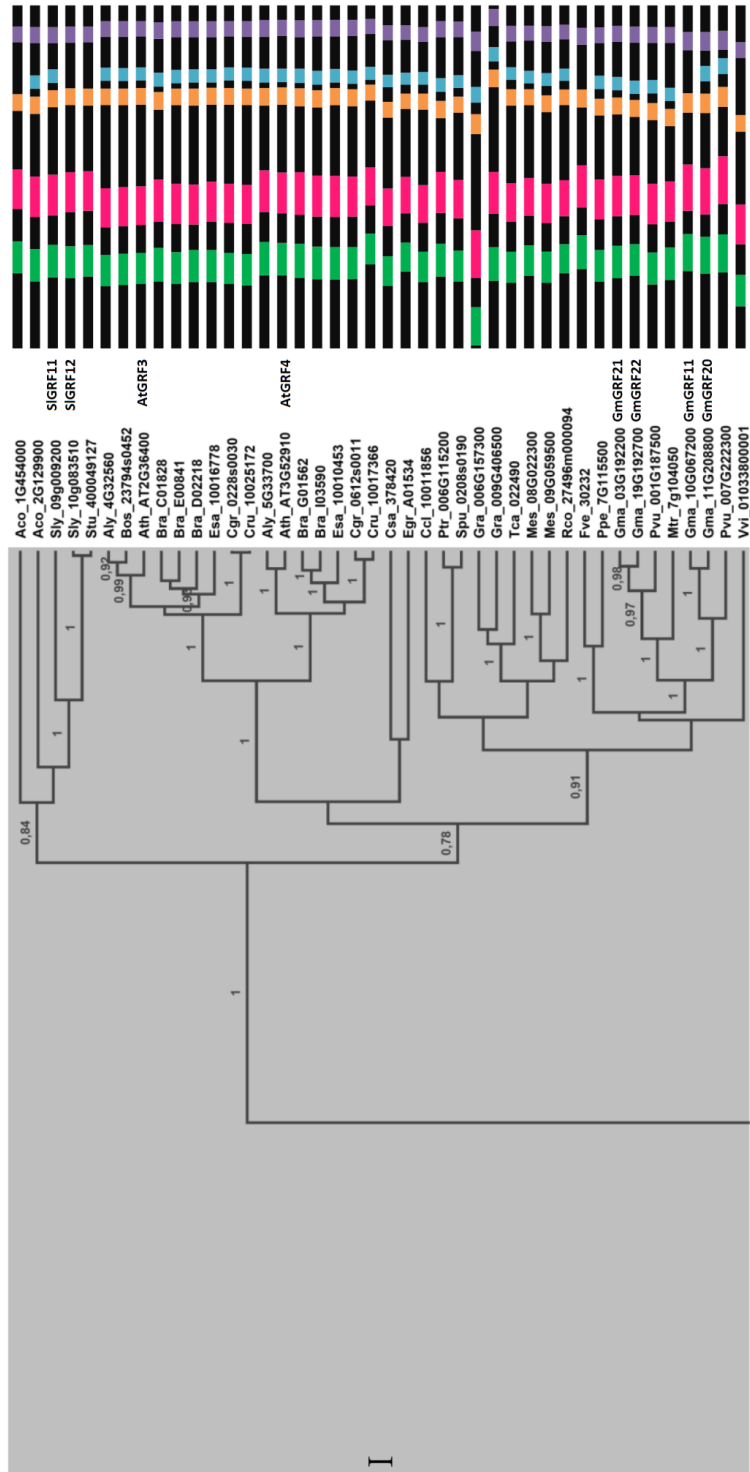
Gene Ontology biological process	Fold Enrichment	+/-	P value
DNA geometric change	3.43	+	1.66E-02
ribonucleoprotein complex export from nucleus	3.43	+	3.09E-02
protein export from nucleus	3.05	+	4.42E-02
ribonucleoprotein complex localization	3.43	+	3.09E-02
double-strand break repair via homologous recombination	3.27	+	3.59E-02
recombinational repair	3.27	+	3.59E-02
DNA repair	1.95	+	1.52E-02
cellular response to DNA damage stimulus	1.86	+	2.17E-02
response to stress	1.43	+	7.36E-03
DNA recombination	3.99	+	2.79E-04
double-strand break repair	2.72	+	3.90E-02
plant-type cell wall biogenesis	2.72	+	3.90E-02
plant-type cell wall organization or biogenesis	1.97	+	3.43E-02
pyruvate metabolic process	2.53	+	2.31E-02
cell division	2.43	+	1.95E-02
microtubule-based process	2.18	+	4.49E-02
hydrogen peroxide catabolic process	2.05	+	4.56E-02
hydrogen peroxide metabolic process	2.05	+	4.56E-02
protein dephosphorylation	1.98	+	3.32E-02
dephosphorylation	1.64	+	4.06E-02
cell wall organization	1.64	+	3.08E-02
external encapsulating structure organization	1.62	+	3.50E-02
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.38	-	1.96E-02
regulation of transcription, DNA-templated	0.76	-	3.56E-02
regulation of nucleic acid-templated transcription	0.75	-	3.10E-02
regulation of RNA biosynthetic process	0.75	-	3.10E-02
regulation of RNA metabolic process	0.75	-	2.77E-02

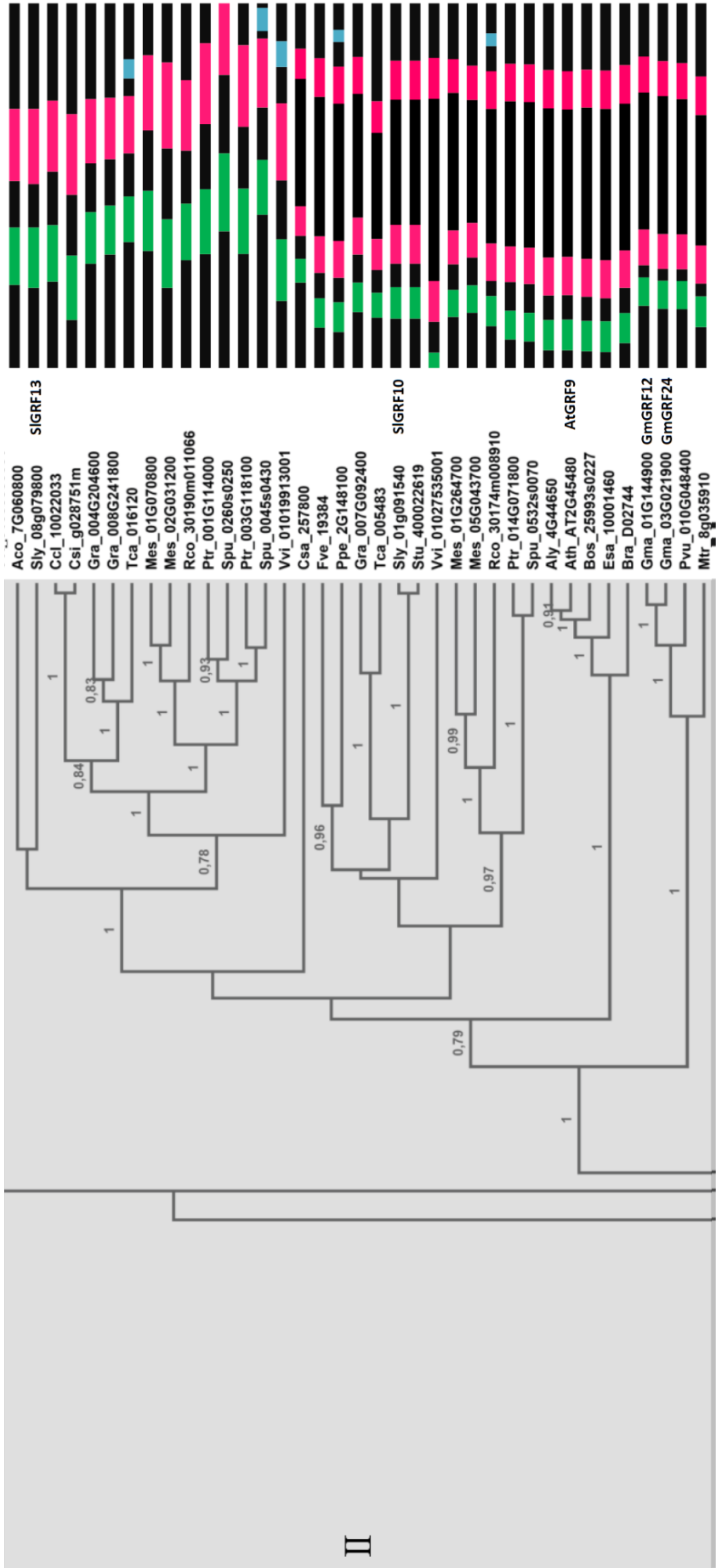
Supplementary Table S5 – Annotation of 1270 putative targets of GRFs in rice genome

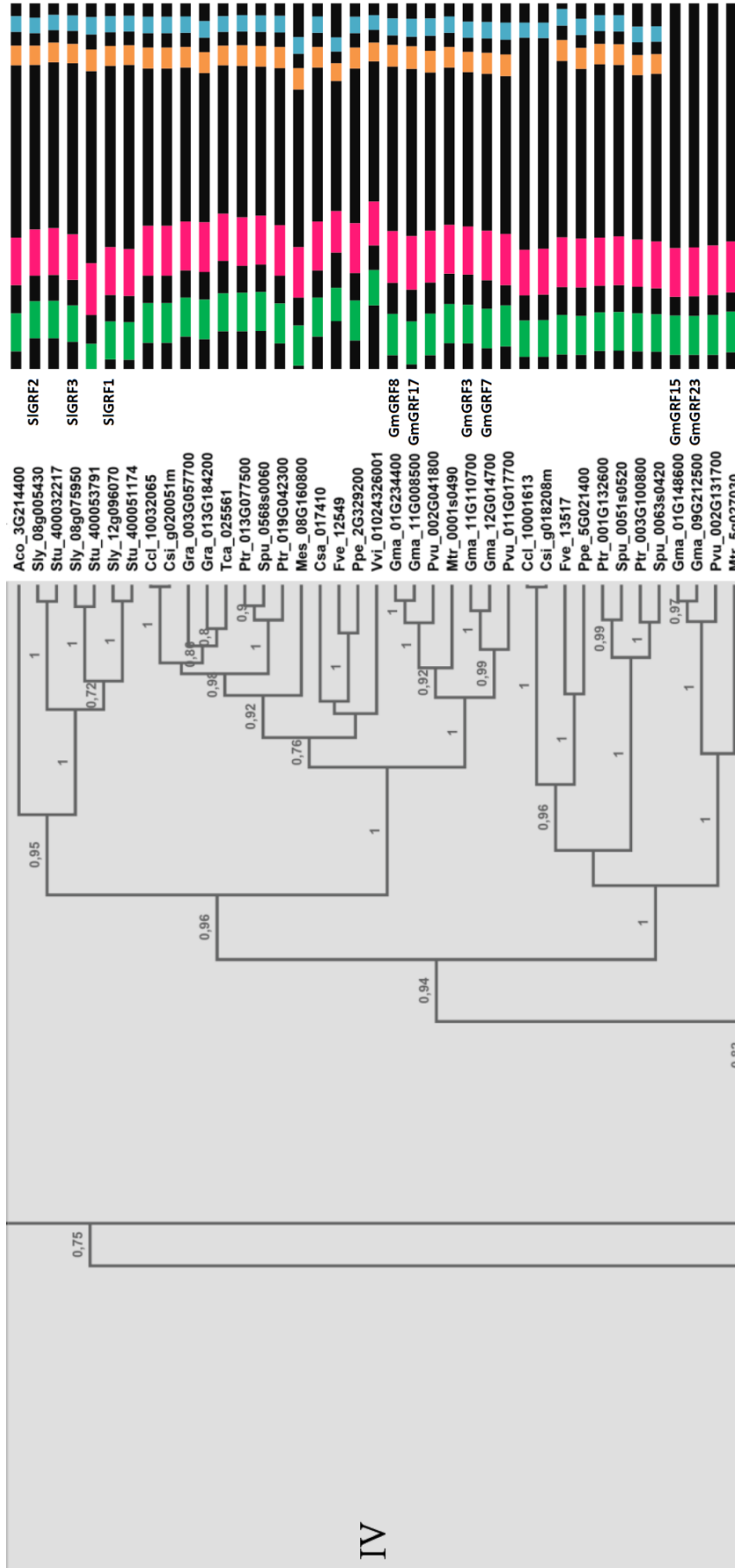
OS03G0724600	OS02G0612900	OS02G0674400	OS06G0346600	OS08G0202300	OS10G0499200
OS03G0803700	OS01G0117900	OS11G0260200	OS08G0360100	OS08G0561250	OS11G0173366
OS12G0637100	OS02G0223200	OS01G0348700	OS11G0252400	OS02G0514500	OS10G0190600
OS08G0120500	OS05G0154800	OS06G0681200	OS12G0169400	OS07G0490800	OS05G0358400
OS02G0158500	OS09G0530300	OS10G0537450	OS09G0472700	OS12G0133700	OS09G0418800
OS05G0404000	OS01G0209000	OS07G0125500	OS02G0805300	OS05G0131000	OS04G0331650
OS06G0691800	OS04G0502800	OS12G0443000	OS04G0551500	OS04G0599300	OS11G0644000
OS01G0609501	OS01G0503400	OS07G0502550	OS10G0342650	OS07G0272300	OS07G0588900
OS10G0539200	OS02G0280400	OS05G0207900	OS06G0102750	OS05G0454400	OS07G0564533
OS07G0148800	OS01G0750666	OS01G0919200	OS11G0275900	OS10G0170200	OS08G0190500
OS04G0121200	OS12G0110150	OS03G0312500	OS03G0269700	OS12G0539751	OS02G0465000
OS02G0146400	OS05G0499300	OS10G0480900	OS03G0701900	OS12G0589400	OS04G0530801
OS03G0383800	OS12G0236800	OS05G0481400	OS09G0410300	OS07G0673801	OS03G0803800
OS09G0399502	OS11G0119311	OS02G0184450	OS09G0536300	OS09G0440600	OS12G0284800
OS03G0818400	OS07G0523150	OS02G0299600	OS09G0443400	OS07G0294700	OS10G0148400
OS03G0821900	OS11G0268300	OS05G0393200	OS09G0423500	OS02G0102900	OS07G0599201
OS09G0539500	OS03G0106300	OS09G0439600	OS07G0294600	OS03G0751400	OS05G0534400
OS08G0248300	OS04G0559400	OS09G0407950	OS02G0658300	OS07G0191600	OS03G0193901
OS01G0263300	OS06G0217600	OS02G0621700	OS03G0837100	OS01G0575400	OS10G0345701
OS02G0764700	OS12G0631100	OS04G0450500	OS01G0182900	OS07G0563700	OS02G0756200
OS04G0656800	OS06G0508950	OS01G0897200	OS02G0787250	OS03G0126450	OS03G0643611
OS01G0653800	OS12G0132900	OS02G0128000	OS02G0655750	OS09G0498000	OS02G0806350
OS11G0130800	OS01G0128100	OS07G0567801	OS06G0186400	OS09G0397800	OS04G0623600
OS10G0581000	OS02G0211200	OS03G0805700	OS12G0578600	OS06G0153000	OS04G0679400
OS06G0679750	OS09G0283600	OS03G0742400	OS02G0316200	OS08G0529100	OS08G0307300
OS10G0518400	OS09G0322100	OS05G0390100	OS08G0499300	OS06G0136900	OS10G0359500
OS07G0627000	OS01G0185000	OS05G0198100	OS04G0407350	OS01G0167750	OS07G0591400
OS10G0493600	OS07G0139700	OS01G0223500	OS08G0206700	OS10G0464300	OS04G0423200
OS09G0411500	OS01G0286500	OS03G0770900	OS08G0524600	OS02G0684900	OS01G0714225
OS11G0105750	OS03G0797000	OS01G0531200	OS07G0423700	OS09G0135100	OS05G0326600
OS02G0724600	OS06G0676400	OS01G0238850	OS04G0630551	OS12G0166100	OS02G0574600
OS01G0621900	OS08G0461100	OS09G0432231	OS12G0143300	OS02G0682700	OS03G0846400
OS06G0493700	OS09G0324000	OS10G0146901	OS01G0694000	OS01G0511100	OS01G0824500
OS03G0235400	OS11G0676200	OS05G0137400	OS08G0164300	OS03G0579900	OS01G0207300
OS04G0252850	OS02G0811101	OS01G0118700	OS04G0444050	OS05G0567600	OS03G0213700
OS10G0434650	OS11G0435500	OS10G0159600	OS12G0438300	OS06G0657750	OS03G0130400
OS01G0656400	OS09G0496250	OS06G0298400	OS06G0688300	OS10G0560000	OS05G0150000
OS06G0597200	OS12G0237900	OS11G0133300	OS02G0141100	OS12G0264500	OS10G0559200
OS03G0370800	OS02G0208400	OS10G0130500	OS06G0153100	OS05G0558400	OS07G0644400
OS06G0621100	OS06G0643800	OS03G0604700	OS02G0760000	OS05G0203912	OS03G0243750
OS03G0302800	OS01G0928000	OS11G0591700	OS07G0578333	OS08G0509400	OS11G0578100
OS12G0290600	OS04G0310900	OS05G0443500	OS12G0582666	OS08G0468300	OS07G0597500
OS03G0158000	OS10G0406100	OS03G0745700	OS06G0677600	OS12G0183450	OS07G0667100
OS07G0160050	OS04G0604300	OS03G0105700	OS01G0242500	OS04G0657600	OS01G0164300
OS03G0756000	OS06G0140200	OS02G0604600	OS10G0498800	OS10G0422401	OS05G0564700
OS01G0833500	OS01G0220801	OS02G0467700	OS03G0298300	OS06G0663600	OS07G0187300
OS12G0233300	OS01G0219200	OS01G0279200	OS02G0614966	OS08G0506000	OS11G0188100
OS06G0134750	OS08G0510900	OS08G0379000	OS05G0151300	OS02G0125600	OS07G0623000
OS08G0386900	OS05G0192500	OS03G0221600	OS05G0451200	OS07G0619100	OS12G0503200
OS02G0782500	OS01G0656250	OS04G0581600	OS07G0546400	OS08G0437050	OS02G0106100
OS06G0152400	OS04G0652450	OS10G0341700	OS10G0513300	OS02G0111800	OS07G0255900
OS06G0651300	OS05G0494200	OS10G0519500	OS05G0126501	OS03G0219300	OS05G0507300
OS12G0631600	OS02G0187300	OS07G0577500	OS02G0144800	OS01G0728200	OS02G0115900
OS02G0149500	OS01G0915000	OS10G0570200	OS07G0176200	OS11G0107500	OS05G0110100
OS12G0477200	OS10G0522200	OS02G0780600	OS06G0266266	OS03G0836200	OS08G0285301
OS03G0639233	OS01G0337180	OS06G0627001	OS12G0105300	OS02G0245800	OS01G0159800
OS03G0654500	OS07G0456700	OS03G0200400	OS10G0500600	OS07G0577801	OS12G0580500
OS06G0121200	OS11G0506150	OS06G0350700	OS05G0227901	OS02G0248200	OS08G0374100
OS12G0577900	OS02G0778300	OS11G0183800	OS02G0565500	OS02G0595800	OS03G0134550
OS10G0548200	OS12G0164800	OS03G0283500	OS01G0605400	OS08G0240566	OS08G0149566

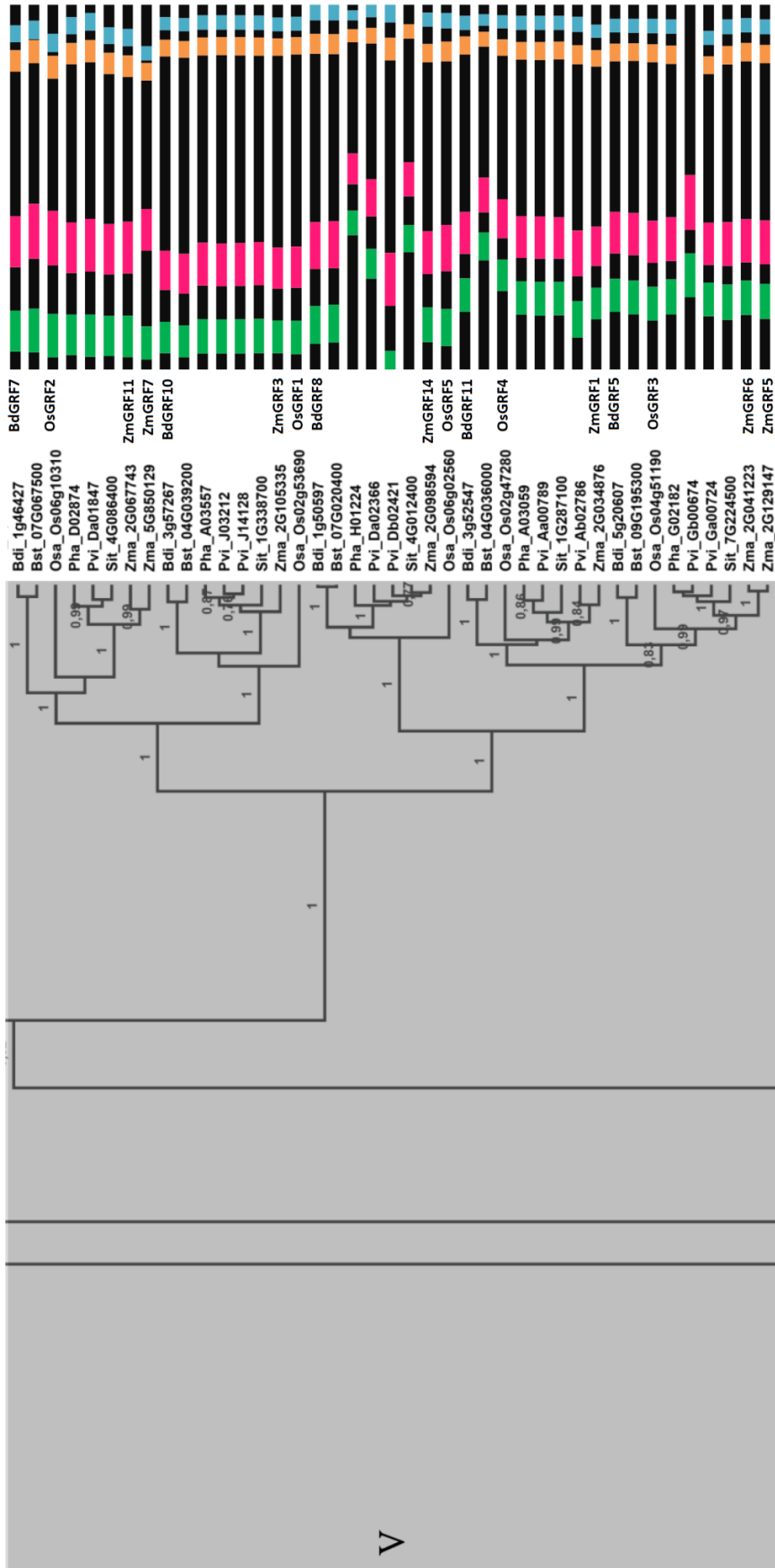
Supplementary Figure 1 – Phylogenetic tree of *GRFs* and protein domain composition.

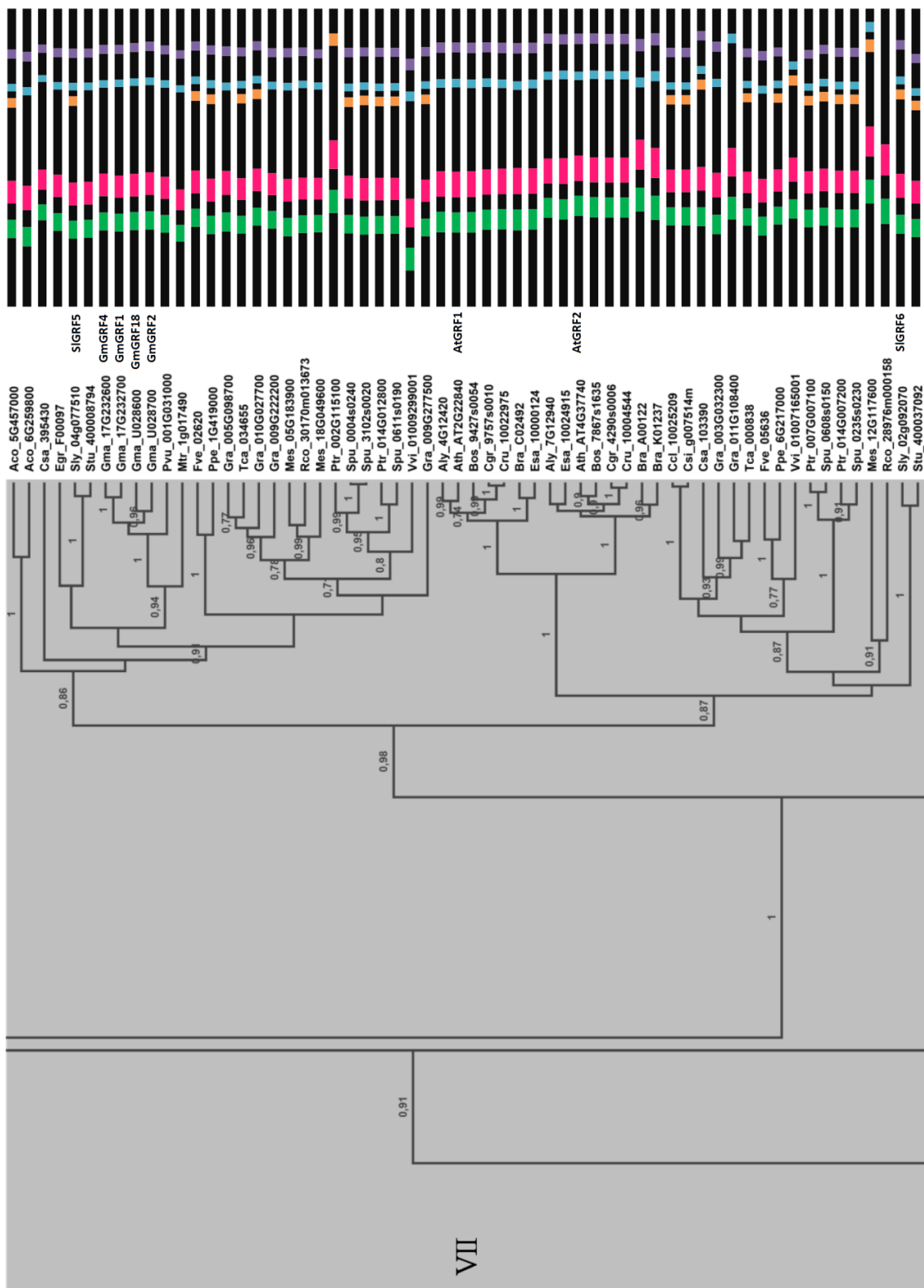
In the tree, the names are indicated by the first letter of the genus and the first two letters of the species, followed by the simplified transcript name. In the protein diagram, the domains are shown in different colors: QLQ (green), WRC (pink), FFD (orange), TQL (blue) and GPL (purple). For scale, QLQ corresponds to 36 aa. In the protein diagram, the species are indicated by the first letter of the genus and the first letter of the species.



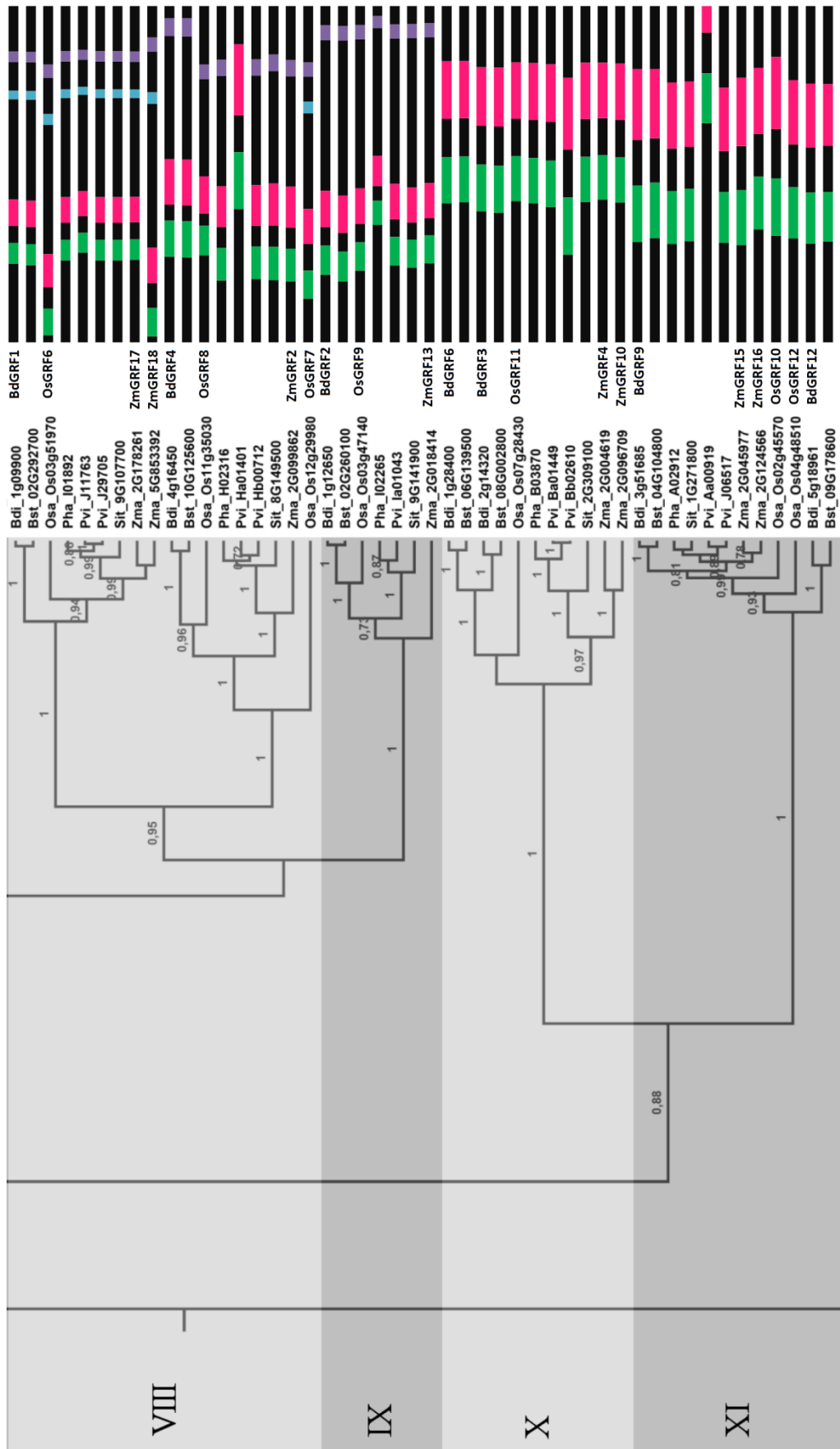




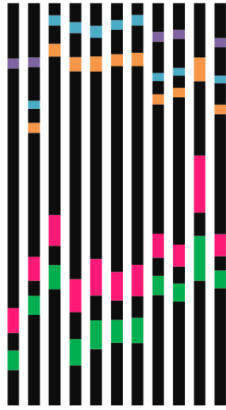
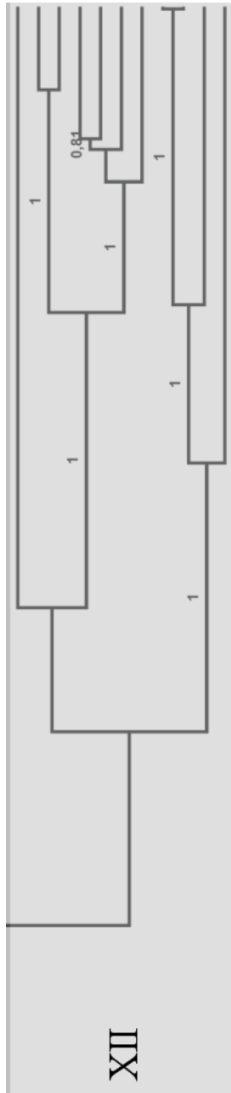




VII



Kfl_001860090
 Ppa_3c123720
 Ppa_3c171780
 Sfa_0018s0181
 Sfa_0019s0149
 Sfa_0126s0017
 Sfa_0221s0016
 Smo_412762
 Smo_417311
 Smo_420739
 Smo_442384



DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho contribuiu com a caracterização de cinco fatores de transcrição em arroz, *OsbHLH35* e quatro reguladores putativos da sua expressão, *OsGRF3*, *OsGRF4*, *OsGRF11* e *IDEF1*. A expressão do gene *OsbHLH35* foi induzida em resposta a diferentes estresses como salinidade, dessecação, exposição ao ABA, à luz UV-B e ao peróxido de hidrogênio exógeno e, apesar de não existirem indícios de que esse gene esteja diretamente envolvido em respostas a estresses, sua expressão também estava aumentada em plantas de arroz silenciadas nas *APX1* e *APX2*, com níveis aumentados de peróxido de hidrogênio.

Em experimentos de mono-híbrido em levedura utilizando fragmentos do promotor de *bHLH35* como isca, nosso grupo identificou quatro fatores de transcrição como possíveis reguladores da expressão desse gene, *OsGRF3*, *OsGRF4*, *OsGRF11* e *OsIDEF1* (CASTILHOS 2014; CASTILHOS & LAZZAROTTO, dados não publicados). No intuito de caracterizar a funcionalidade da ligação desses FT ao promotor de *bHLH35*, foram realizados experimentos de transativação, em protoplastos, com *GRF11* e *IDEF1* como efetores. Nesses experimentos, *GRF11* foi capaz de reprimir a transcrição do gene repórter sob controle do promotor de *bHLH35*, enquanto que não foi observado efeito de *IDEF1* na transcrição do gene repórter nas condições nas quais esses experimentos foram realizados.

A regulação negativa de *bHLH35* por *GRF11* corrobora com a hipótese de atividade repressora de GRFs, relatada em trabalhos anteriores em *Arabidopsis*, arroz e cevada (KIM *et al.*, 2012; KUIJT *et al.*, 2014). Além disso, uma das hipóteses é de que GRF atue como repressor de genes de resposta a estresses durante o desenvolvimento normal, garantindo o desenvolvimento da planta na ausência de estresse (KIM *et al.*, 2012). O fato de que *bHLH35* possa ser um gene de resposta a estresses também colabora com essa hipótese, porém, a caracterização desse gene ainda deve ser mais explorada.

OsIDEF1 não apresentou atividade reguladora do promotor de *OsbHLH35* nos experimentos de transativação, embora tenha interagido com a sequência isca F1.2 (CASTILHOS 2014; CASTILHOS & LAZZAROTTO, dados

não publicados), na qual estão presentes seus *cis*-elemento alvo (KOBAYASHI *et al.*, 2007, 2009). Sabe-se que IDEF1 controla a expressão de genes de resposta a condições de deficiência de ferro e que em condições normais a proteína é majoritariamente degradada (KOBAYASHI *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014).

A expressão do gene repórter foi ativada na ausência do efector IDEF1, mostrando que o fragmento do promotor de *OsbHLH35* utilizado é funcional, mesmo em condições de suficiência de ferro. Isso sugere que possa existir um elemento adicional de regulação, como a degradação IDEF1, tendo em vista a ausência de IBP1 em arabidopsis, a funcionalidade do *cis*-elemento somente em condições de deficiência de ferro, ou mesmo a inabilidade de IDEF1 em transativar a expressão do gene repórter controlado pelo promotor de *OsbHLH35*.

Como alternativa para contornar esse problema, e verificar a funcionalidade da interação de IDEF1 com o promotor de *bHLH35*, pode ser padronizado um protocolo de obtenção de protoplastos a partir de raízes de plantas de arroz em deficiência de ferro, assim, estariam presentes as duas condições nas quais a atividade de IDEF1 foi relatada em trabalhos anteriores, a deficiência de ferro e a presença de IBP, inibidores da degradação de IDEF1 (KOBAYASHI & NISHIZAWA, 2014; KOBAYASHI *et al.*, 2007, 2009, 2012; TAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014).

Neste trabalho, a superexpressão de *OsGRF11* e de *OsbHLH35* não parece ter gerado fenótipos aberrantes durante a fase vegetativa, porém, as plantas não originaram sementes, apesar de gerarem panículas. A falta de sementes pode ser devida a um atraso, como reportado por Kuijt e colaboradores (2014) para as plantas superexpressando *OsGRF3* e *OsGRF10*, ou pode ser devido a um fenótipo de esterilidade. Como uma tentativa para responder a esta pergunta, pode-se cultivar a rebrota das plantas em condições que propiciem a formação de sementes, com temperatura, luminosidade e fotoperíodo otimizados e controlados, além de um suporte adequado de nutrientes e de água, no intuito de descartar alguma variação ambiental como a causa da falta de geração de sementes. Se confirmada a esterilidade, as plantas serão propagadas vegetativamente para permitir o

estudo detalhado do fenótipo e permitir a continuidade da caracterização desses fatores de transcrição.

Além da caracterização funcional desses fatores de transcrição, foi realizado um estudo evolutivo da família GRF em Viriplantae. No intuito de explorar a origem desses fatores de transcrição, foram analisados o genoma e os transcriptomas disponíveis de algas carófitas, um grupo de algas verdes mais próximas das plantas em comparação com as clorófitas (HARHOLT *et al.*, 2016; HARRISON, 2017). Essas análises mostraram que o gene está presente pelo menos desde as carófitas Mesostigmales, e não desde as embriófitas, como previamente reportado (HOE KIM & TSUKAYA, 2015; OMIDBAKHSHFARD *et al.*, 2015). Além disso, a análise do genoma de diversas espécies de plantas terrestres possibilitou avanços no entendimento da expansão desta família. Os dados deste trabalho mostram que a expansão da família começou a ocorrer nas espécies de briófitas, com duplicações taxa específicas, enquanto que uma expansão considerável ocorreu nas plantas vasculares, com duplicações principalmente nos ancestrais das monocotiledôneas e das eudicotiledôneas, com os grupos evoluindo de forma independente nessas classes, além de importantes eventos de WGD em algumas espécies.

Sabe-se que os GRFs compartilham um domínio em comum com os genes SNF2, subunidades do complexo de remodelamento da cromatina SWI2/SNF2. Esse domínio apresenta, além da similaridade de sequência, a função de interação com proteínas. Os domínios QLQ presentes tanto em GRF quanto em SNF2 interagem com os domínios SNH, presente nas proteínas GIF e SYT, respectivamente. O fato de a sequência QLQ ser conservada, estando presente na porção N-terminal das duas famílias de proteínas, e de GRF e SNF2 manterem a função de interação com proteínas homólogas, GIF (GRF-interacting factor) e SYT (Synovial sarcoma translocated), levanta a hipótese de que elas possam ter uma relação evolutiva comum. O gene *SNF2* está presente pelo menos em fungos, em animais e em plantas, enquanto que os *GRFs* são encontrados somente em Viridiplantae, sugerindo que *SNF2* seja mais ancestral que *GRF*. Ao analisar a relação entre as duas famílias por meio de uma abordagem filogenética, observou-se que as famílias agrupam em clados distintos na árvore, desde as algas carófitas. Em virtude disso, foi

proposto que o gene GRF ancestral surgiu a partir de uma duplicação no ancestral das carófitas, e que, desde então, as famílias evoluíram de forma independente, com GRFs atuando como fatores de transcrição específicos.

Além disso, por meio de análises de sintonia, foram sugeridos ortólogos para alguns GRFs caracterizados de arroz e de arabidopsis em soja, tomate, milho e braquipódio. Ainda, a análise de promotores em busca do *cis*-elemento de ligação de GRFs em arabidopsis revelou 1270 alvos putativos de GRFs em arroz, incluindo *Os**b**H**L**H35* (ENSEMBL OS01G0159800), sugerindo a conservação da sequência regulatória nesta espécie. Os dados gerados nessas análises podem contribuir com outros estudos funcionais no intuito de avançar com a caracterização funcional dos genes da família GRF e de seus alvos.

Embora este trabalho tenha contribuído com a caracterização dos fatores de transcrição *Os**b**H**L**H35*, *Os**I**D**E**F1* e GRFs, este projeto ainda tem muitas perguntas a serem respondidas. Como perspectivas imediatas para a continuação deste trabalho, estão as análises fenotípicas das plantas superexpressando *Os**b**H**L**H35* e *Os**G**R**F**11*, no intuito de verificar o possível fenótipo de esterilidade. Como perspectivas futuras, a análise da funcionalidade de *I**D**E**F**1* como ativador ou repressor da expressão de *b**H**L**H**35* em protoplastos obtidos de raízes de plantas de arroz cultivadas em baixas concentrações de ferro. Além disso, o avanço na caracterização dos genes em resposta a estresses, por meio de experimentos realizados com as plantas superexpressando *Os**b**H**L**H35* e *Os**G**R**F**11*, e o estudo do promotor de *Os**b**H**L**H35* em resposta a estresses, por meio da transformação de plantas com a utilização de genes repórteres sob o controle do seu promotor.

BIBLIOGRAFIA

1. ANJUM, N. A., SHARMA, P., GILL, S. S., HASANUZZAMAN, M., KHAN, E. A., KACHHAP, K., MOHAMED, A. A., THANGAVEL, P., DEVI, G. D., VASUDHEVAN, P., SOFO, A., KHAN, N. A., MISRA, A. N., LUKATKIN, A. S., SINGH, H. P., PEREIRA, E., & TUTEJA, N. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(19): 19002-19029, 2016.
2. ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 50: 601-639, 1999.
3. ATCHLEY, W. R., & FITCH, W. M. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10): 5172-5176, 1997.
4. BALDONI, E., GENGA, A., & COMINELLI, E. Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7): 15811-15851, 2015.
5. BAO, M., BIAN, H., ZHA, Y., LI, F., SUN, Y., BAI, B., CHEN, Z., WANG, J., ZHU, M., & HAN, N. miR396a-Mediated basic helix-loop-helix transcription factor bHLH74 repression acts as a regulator for root growth in Arabidopsis seedlings. *Plant & Cell Physiology*, 55(7): 1343-1353, 2014.
6. BATTAGLIA, M., & COVARRUBIAS, A. A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 4: 190, 2013.
7. BOLDUC, N., YILMAZ, A., MEJIA-GUERRA, M. K., MOROHASHI, K., O'CONNOR, D., GROTEWOLD, E., E HAKE, S. Unraveling the KNOTTED1 regulatory network in maize meristems. *Genes & Development*, 26(15): 1685-1690, 2012.
8. BOLLHÖNER, B., PRESTELE, J., & TUOMINEN, H. Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *Journal of Experimental Botany*, 63(3): 1081-1094, 2012.
9. BONIFACIO, A., MARTINS, M. O., RIBEIRO, C. W., FONTENELE, A. V., CARVALHO, F. E. L., MARGIS-PINHEIRO, M., & SILVEIRA, J. A. G. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 34(10): 1705-1722, 2011.
10. BUCK, M. J., & ATCHLEY, W. R. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 56(6): 742-750, 2003.
11. CALDWELL, C. R., TURANO, F. J., & MCMAHON, M. B. Identification of two cytosolic ascorbate peroxidase cDNAs from soybean leaves and

- characterization of their products by functional expression in *E. coli*. *Planta*, 204(1): 120-126, 1998.
12. CAO, Y., HAN, Y., JIN, Q., LIN, Y., & CAI, Y. Comparative Genomic Analysis of the GRF Genes in Chinese Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd), Poplar (*Populus*), Grape (*Vitis vinifera*), Arabidopsis and Rice (*Oryza sativa*). *Frontiers in Plant Science*, 7: 1750, 2016.
 13. CARRETERO-PAULET, L., GALSTYAN, A., ROIG-VILLANOVA, I., MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F., BILBAO-CASTRO, J. R., & ROBERTSON, D. L. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiology*, 153(3): 1398-1412, 2010.
 14. CASADEVALL, R., RODRIGUEZ, R. E., DEBERNARDI, J. M., PALATNIK, J. F., & CASATI, P. Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in Arabidopsis leaves. *The Plant Cell*, 25(9): 3570-3583, 2013.
 15. CASATI, P. Analysis of UV-B regulated miRNAs and their targets in maize leaves. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10): e26758, 2013.
 16. CASTILHOS, G. O papel dos fatores de transcrição bHLH162 e bHLH63 na adaptação das plantas ao estresse hídrico e ao ataque do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2014.
 17. CASTILHOS, G., LAZZAROTTO, F., SPAGNOLO-FONINI, L., BODANESE-ZANETTINI, M. H., & MARGIS-PINHEIRO, M. Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant Science*, 223: 1-7, 2014.
 18. CASTILLON, A., SHEN, H., & HUQ, E. Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science*, 12(11): 514-521, 2007.
 19. CAVERZAN, A., BONIFACIO, A., CARVALHO, F. E. L., ANDRADE, C. M. B., PASSAIA, G., SCHÜNEMANN, M., MARASCHIN, F. D. S., MARTINS, M. O., TEIXEIRA, F. K., RAUBER, R., MARGIS, R., SILVEIRA, J. A. G., & MARGIS-PINHEIRO, M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. *Plant Science*, 214: 74-87, 2014.
 20. CAVERZAN, A., PASSAIA, G., ROSA, S. B., RIBEIRO, C. W., LAZZAROTTO, F., & MARGIS-PINHEIRO, M. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and molecular biology*, 35(4): 1011-1019, 2012.
 21. CHAUDHARY, J., & SKINNER, M. K. Basic helix-loop-helix proteins can act at the E-box within the serum response element of the c-fos promoter to influence hormone-induced promoter activation in Sertoli cells. *Molecular Endocrinology*, 13(5): 774-786, 1999.

22. CHE, R., TONG, H., SHI, B., LIU, Y., FANG, S., LIU, D., XIAO, Y., HU, B., LIU, L., WANG, H., ZHAO, M., & CHU, C. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature Plants*, 2: 15195, 2015.
23. CHINNUSAMY, V., OHTA, M., KANRAR, S., LEE, B.-H., HONG, X., AGARWAL, M., & ZHU, J.-K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development*, 17(8): 1043-1054, 2003.
24. CHINNUSAMY, V., ZHU, J., & ZHU, J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12(10): 444-451, 2007.
25. CHOI, C. Q. The fate of the plant embryo's suspensor: balancing life and death. *PLoS Biology*, 11(9): e1001656, 2013.
26. CHOI, D., KIM, J. H., & KENDE, H. Whole genome analysis of the OsGRF gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant & Cell Physiology*, 45(7): 897-904, 2004.
27. CLAEYS, H., & INZÉ, D. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology*, 162(4), 1768-1779, 2013.
28. CONLON, M., & DIXON, S. J. Ferroptosis-like death in plant cells. *Molecular & Cellular Oncology*, 4(3): e1302906, 2017.
29. COUNCE, P. A., SIEBENMORGEN, T. J., & AMBARDEKAR, A. A. Rice reproductive development stage thermal time and calendar day intervals for six US rice cultivars in the Grand Prairie, Arkansas, over 4 years. *The Annals of Applied Biology*, 167(2): 262-276, 2015.
30. COUNCE, P., KEOSÇONG, T. C., MITCHELL, A., KEISLING, T., & MITCHELL, C. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science*, 40(2): 436-443, 2000.
31. D'ARCY-LAMETA, A., FERRARI-ILIOU, R., CONTOUR-ANSEL, D., PHAM-THI, A.-T., & ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany*, 97(1): 133-140, 2006.
32. DEBERNARDI, J. M., MECCHIA, M. A., VERCRUYSSSEN, L., SMACZNIAK, C., KAUFMANN, K., INZE, D., RODRIGUEZ, R. E., & PALATNIK, J. F. Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. *The Plant Journal*, 79(3): 413-426, 2014.
33. DIETZ, K. J. Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9):1356-1372, 2014.
34. DISTÉFANO, A. M., MARTIN, M. V., CÓRDOBA, J. P., BELLIDO, A. M., D'IPPÓLITO, S., COLMAN, S. L., SOTO, D., ROLDÁN, J. A., BARTOLI, C. G., ZABALETA, E. J., FIOL, D. F., STOCKWELL, B. R., DIXON, S. J., & PAGNUSSAT, G. C. Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. *The Journal of Cell Biology*, 216(2): 463-476, 2017.

35. DIXON, S. J., LEMBERG, K. M., LAMPRECHT, M. R., SKOUTA, R., ZAITSEV, E. M., GLEASON, C. E., PATEL, D. N., BAUER, A. J., CANTLEY, A. M., YANG, W. S., MORRISON, B., & STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5): 1060-1072, 2012.
36. DIXON, S. J., WINTER, G. E., MUSAVI, L. S., LEE, E. D., SNIJDER, B., REBSAMEN, M., SUPERTI-FURGA, G., & STOCKWELL, B. R. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death. *ACS Chemical Biology*, 10(7): 1604-1609, 2015.
37. DOSSA, K., WEI, X., LI, D., FONCEKA, D., ZHANG, Y., WANG, L., YU, J., BOSHOU, L., DIOUF, D., CISSÉ, N., & ZHANG, X. Insight into the AP2/ERF transcription factor superfamily in sesame and expression profiling of DREB subfamily under drought stress. *BMC Plant Biology*, 16(1): 171, 2016.
38. DREWS, G. N., & KOLTUNOW, A. M. G. The female gametophyte. The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists, 9:e0155, 2011.
39. DUAN, J., & KASPER, D. L. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*, 21(4): 401-409, 2011.
40. DUAN, P., NI, S., WANG, J., ZHANG, B., XU, R., WANG, Y., CHEN, H., ZHU, X., & LI, Y. Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nature Plants*, 2:15203, 2015.
41. EAMENS, A., WANG, M.-B., SMITH, N. A., & WATERHOUSE, P. M. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology*, 147(2): 456-468, 2008.
42. FAIRMAN, R., BERAN-STEED, R. K., & HANDEL, T. M. Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and secondary structure of the basic region-helix-loop-helix domain of E47. *Protein Science*, 6(1): 175-184, 1997.
43. FAWAL, N., LI, Q., SAVELLI, B., BRETTE, M., PASSAIA, G., FABRE, M., MATHÉ, C., & DUNAND, C. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D441-4, 2013.
44. FIGUEIREDO, D. D., BARROS, P. M., CORDEIRO, A. M., SERRA, T. S., LOURENÇO, T., CHANDER, S., OLIVEIRA, M. M., & SAIBO, N. J. M. Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene OsDREB1B. *Journal of Experimental Botany*, 63(10): 3643-3656, 2012.
45. FIGUEIREDO, D. D. Novel Transcription Factors Regulating the Expression of the Rice Gene OsDREB1B. Tese de Doutorado, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal, 2012.
46. FIMOIGNARI, C. Role of Oxidative RNA Damage in Chronic-Degenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 358713, 2015.

47. FLEMING, A. M., ALSHYKHLY, O., ZHU, J., MULLER, J. G., & BURROWS, C. J. Rates of chemical cleavage of DNA and RNA oligomers containing guanine oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, 28(6): 1292-1300, 2015.
48. FORREST, S., & MCNAMARA, C. Id family of transcription factors and vascular lesion formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11): 2014-2020, 2004.
49. FOYER, C. H., & NOCTOR, G. Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2087-2090, 2013.
50. FOYER, C. H., & NOCTOR, G. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant, Cell & Environment*, 39(5): 951-964, 2016.
51. HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. *Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology*, 141(2):312-322,2006.
52. FRY, S. C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal*, 332(2): 507-515, 1998.
53. GANGAPPA, S. N., BERRIRI, S., & KUMAR, S. V. PIF4 coordinates thermosensory growth and immunity in arabidopsis. *Current Biology*, 27(2): 243-249, 2017.
54. GAO, M., MONIAN, P., PAN, Q., ZHANG, W., XIANG, J., & JIANG, X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 26(9):1021-1032, 2016.
55. GECHEV, T. S., VAN BREUSEGEM, F., STONE, J. M., DENEV, I., & LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 28(11): 1091-1101, 2006.
56. GHEZZI, P., & BONETTO, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics*, 3(7): 1145-1153, 2003.
57. GIETZ, D., ST JEAN, A., WOODS, R. A., & SCHIESTL, R. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 20(6): 1425, 1992.
58. GILL, S. S., & TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930, 2010.
59. GILROY, S., BIAŁASEK, M., SUZUKI, N., GÓRECKA, M., DEVIREDDY, A. R., KARPIŃSKI, S., & MITTLER, R. ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology*, 171(3): 1606-1615, 2016.
60. GIRI, M. K., SWAIN, S., GAUTAM, J. K., SINGH, S., SINGH, N., BHATTACHARJEE, L., & NANDI, A. K. The Arabidopsis thaliana At4g13040 gene, a unique member of the AP2/EREBP family, is a positive regulator for salicylic acid accumulation and basal defense

- against bacterial pathogens. *Journal of Plant Physiology*, 171(10): 860-867, 2014.
61. VIOLA, I. L. & GONZALEZ D. H. Chapter 2 - Methods to Study Transcription Factor Structure and Function, In *Plant Transcription Factors*, Academic Press, Boston. Pages 13-33, 2016.
 62. GUNAWARDENA, A. H. L. A. N., GREENWOOD, J. S., & DENGLER, N. G. Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *The Plant Cell*, 16(1): 60-73, 2004.
 63. HAKE, S., SMITH, H. M. S., HOLTAN, H., MAGNANI, E., MELE, G., & RAMIREZ, J. The role of knox genes in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 125-151, 2004.
 64. HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2): 312-322, 2006.
 65. HANNAPEL, D. J. Chapter 23 - Intercellular Movement of Plant Transcription Factors, Coregulators, and Their mRNAs, In *Plant Transcription Factors*, edited by Daniel H. Gonzalez. Academic Press, Boston, Pages 359-371, 2016.
 66. HARHOLT, J., MOESTRUP, Ø. & ULVSKOV, P. Why Plants Were Terrestrial from the Beginning. *Trends in Plant Science*, 21(2): 96-101, 2016.
 67. HARPER, J. W., ADAMI, G. R., WEI, N., KEYOMARSI, K., & ELLEDGE, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4): 805-816, 1993.
 68. HAY, A. & TSIANTIS, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development*, 137(19): 3153-3165, 2010.
 69. HEIM, M. A., JAKOBY, M., WERBER, M., MARTIN, C., WEISSHAAR, B., & BAILEY, P. C. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5):735-747, 2003.
 70. HEINE, G. F., HERNANDEZ, J. M. & GROTEWOLD, E. Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(36): 37878-37885, 2004.
 71. HERMS, D. A. & MATTSON, W. J. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3): 283-335, 1992.
 72. HERRON, S. R., BENEN, J. A., SCAVETTA, R. D., VISSER, J. & JURNAK, F. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16): 8762-8769, 2000.
 73. HEWEZI, T., MAIER, T. R., NETTLETON, D. & BAUM, T. J. The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiology*, 159(1): 321-335, 2012.

74. HIEI, Y., OHTA, S., KOMARI, T. & KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2): 271-282, 1994.
75. HIEI, Y. & KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols*, 3(5): 824-834, 2008.
76. HOE KIM, J. & TSUKAYA, H. Regulation of plant growth and development by the GROWTH-REGULATING FACTOR and GRF-INTERACTING FACTOR duo. *Journal of Experimental Botany*, 66(20): 6093-6107, 2015.
77. HONG-BO, S., ZONG-SUO, L. & MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 45(3-4): 131-135, 2005.
78. HORIGUCHI, G., KIM, G.T. & TSUKAYA, H. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 43(1): 68-78, 2005.
79. HU, J., WANG, Y., FANG, Y., ZENG, L., XU, J., YU, H., SHI, Z., PAN, J., ZHANG, D., KANG, S., ZHU, L., DONG, G., GUO, L., ZENG, D., ZHANG, G., XIE, L., XIONG, G., LI, J. & QIAN, Q. A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. *Molecular Plant*, 8(10): 1455-1465, 2015.
80. HUNDERTMARK, M. & HINCHA, D. K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9:118, 2008.
81. HUOT, B., YAO, J., MONTGOMERY, B. L. & HE, S. Y. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8): 1267-1287, 2014.
82. ISHIDA, M., TANAKA, S., OHKI, M. & OHTA, T. Transcriptional co-activator activity of SYT is negatively regulated by BRM and Brg1. *Genes To Cells*, 9(5): 419-428, 2004.
83. ISHIKAWA, T., SAKAI, K., TAKEDA, T. & SHIGEOKA, S. Cloning and expression of cDNA encoding a new type of ascorbate peroxidase from spinach. *FEBS Letters*, 367(1):28-32, 1995.
84. IWATA Y. & KOIZUMI N., Chapter 25 - Membrane-Bound Transcription Factors in Plants: Physiological Roles and Mechanisms of Action, In *Plant Transcription Factors*, edited by Daniel H. Gonzalez. Academic Press, Boston. Pages 385-394, 2016.
85. JAIN, M., NIJHAWAN, A., ARORA, R., AGARWAL, P., RAY, S., SHARMA, P., KAPOOR, S., TYAGI, A. K. & KHURANA, J. P. F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiology*, 143(4):1467-1483, 2007.

86. JAMES, A. M., JAYASENA, A. S., ZHANG, J., BERKOWITZ, O., SECCO, D., KNOTT, G. J., WHELAN, J., BOND, C. S. & MYLNE, J. S. Evidence for Ancient Origins of Bowman-Birk Inhibitors from *Selaginella moellendorffii*. *The Plant Cell*, 29(3): 461-473, 2017.
87. JILL HARRISON, C. Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1713), 2017.
88. JONES, S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology*, 5(6): 226, 2004.
89. JONES-RHOADES, M. W. & BARTEL, D. P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14(6): 787-799, 2004.
90. KARIMI, M., INZÉ, D. & DEPICKER, A. GATEWAYTM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5): 193-195, 2002.
91. KIM, J. H., CHOI, D. & KENDE, H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 36(1): 94-104, 2003.
92. KIM, J. H. & KENDE, H. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36): 13374-13379, 2004.
93. KIM, J. H. & LEE, B. H. GROWTH-REGULATING FACTOR4 of Arabidopsis thaliana is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *Journal of Plant Biology*, 49(6): 463-468, 2006.
94. KIM, J.S., MIZOI, J., KIDOKORO, S., MARUYAMA, K., NAKAJIMA, J., NAKASHIMA, K., MITSUDA, N., TAKIGUCHI, Y., OHME-TAKAGI, M., KONDOU, Y., YOSHIZUMI, T., MATSUI, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *The Plant Cell*, 24(8): 3393-3405, 2012.
95. KOBAYASHI, T., ITAI, R. N., AUNG, M. S., SENOURA, T., NAKANISHI, H. & NISHIZAWA, N. K. The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status. *The Plant Journal*, 69(1): 81-91, 2012.
96. KOBAYASHI, T., ITAI, R. N., OGO, Y., KAKEI, Y., NAKANISHI, H., TAKAHASHI, M. & NISHIZAWA, N. K. The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. *The Plant Journal*, 60(6): 948-961, 2009.
97. KOBAYASHI, T., NAKANISHI, H. & NISHIZAWA, N. K. Dual regulation of iron deficiency response mediated by the transcription factor IDEF1. *Plant Signaling & Behavior*, 5(2):157-159 , 2010.

98. KOBAYASHI, T. & NISHIZAWA, N. K. Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Science*, 224: 36-43, 2014.
99. KOBAYASHI, T., OGO, Y., AUNG, M. S., NOZOYE, T., ITAI, R. N., NAKANISHI, H., YAMAKAWA, T. & NISHIZAWA, N. K. The spatial expression and regulation of transcription factors IDEF1 and IDEF2. *Annals of Botany*, 105(7): 1109-1117, 2010.
100. KOBAYASHI, T., OGO, Y., ITAI, R. N., NAKANISHI, H., TAKAHASHI, M., MORI, S. & NISHIZAWA, N. K. The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(48): 19150-19155, 2007.
101. KÖNIG, J., MUTHURAMALINGAM, M. & DIETZ, K.J. Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3): 261-268, 2012.
102. KUBO, A., SAJI, H., TANAKA, K. & KONDO, N. Genomic DNA structure of a gene encoding cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 315(3): 313-317, 1993.
103. KUIJT, S. J. H., GRECO, R., AGALOU, A., SHAO, J., T HOEN, C. C. J., OVERNÄS, E., OSNATO, M., CURIALE, S., MEYNARD, D., VAN GULIK, R., DE FARIA MARASCHIN, S., ATALLAH, M., DE KAM, R. J., LAMERS, G. E. M., GUIDERDONI, E., ROSSINI, L., MEIJER, A. H. & OUWERKERK, P. B. F. Interaction between the GROWTH-REGULATING FACTOR and KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN families of transcription factors. *Plant Physiology*, 164(4): 1952-1966, 2014.
104. KULCHESKI, F. R., MOLINA, L. G., DA FONSECA, G. C., DE MORAIS, G. L., DE OLIVEIRA, L. F. V. & MARGIS, R. Novel and conserved microRNAs in soybean floral whorls. *Gene*, 575(2): 213-223, 2016.
105. LEDENT, V. & VERVOORT, M. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Research*, 11(5): 754-770, 2001.
106. LI, M., XU, W., YANG, W., KONG, Z. & XUE, Y. Genome-wide gene expression profiling reveals conserved and novel molecular functions of the stigma in rice. *Plant Physiology*, 144(4): 1797-1812, 2007.
107. LI, S., GAO, F., XIE, K., ZENG, X., CAO, Y., ZENG, J., HE, Z., REN, Y., LI, W., DENG, Q., WANG, S., ZHENG, A., ZHU, J., LIU, H., WANG, L. & LI, P. The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 14(11): 2134-2146, 2016.
108. LI, X., DUAN, X., JIANG, H., SUN, Y., TANG, Y., YUAN, Z., GUO, J., LIANG, W., CHEN, L., YIN, J., MA, H., WANG, J. & ZHANG, D. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(4): 1167-1184, 2006.

109. LI Y. & LOAKE, G. J. Chapter 24 - Redox-Regulated Plant Transcription Factors, In *Plant Transcription Factors*, edited by Daniel H. Gonzalez, Academic Press, Boston, Pages 373-384, 2016.
110. LIU, D. & YU, D. MicroRNA (miR396) negatively regulates expression of ceramidase-like genes in *Arabidopsis*. *Progress in Natural Science*, 19(6): 781-785, 2009.
111. LIU, H., GUO, S., XU, Y., LI, C., ZHANG, Z., ZHANG, D., XU, S., ZHANG, C. & CHONG, K. OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJMJ706 and OsCR4. *Plant Physiology*, 165(1): 160-174, 2014.
112. Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., e Zheng, C.-C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14(5): 836-843, 2008.
113. LIU, J., RICE, J. H., CHEN, N., BAUM, T. J. & HEWEZI, T. Synchronization of developmental processes and defense signaling by growth regulating transcription factors. *Plos One*, 9(5): e98477, 2014.
114. LIU, J.X. & HOWELL, S. H. bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(3): 782-796, 2010.
115. LIU, T., OHASHI-ITO, K. & BERGMANN, D. C. Orthologs of *Arabidopsis thaliana* stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development*, 136(13): 2265-2276, 2009.
116. LIU, W., ZHOU, Y., LI, X., WANG, X., DONG, Y., WANG, N., LIU, X., CHEN, H., YAO, N., CUI, X., JAMEEL, A., WANG, F. & LI, H. Tissue-Specific Regulation of Gma-miR396 Family on Coordinating Development and Low Water Availability Responses. *Frontiers in Plant Science*, 8:1112, 2017.
117. LIU, Y., XIONG, Y. & BASSHAM, D. C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7): 954-963, 2009.
118. LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4): 402-408, 2001.
119. LOAKE, G. & GRANT, M. Salicylic acid in plant defence-the players and antagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5): 466-472, 2007.
120. LONG, T. A., TSUKAGOSHI, H., BUSCH, W., LAHNER, B., SALT, D. E. & BENFEY, P. N. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 22(7):2219-2236, 2010.
121. MA, P. C., ROULD, M. A., WEINTRAUB, H. & PABO, C. O. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, 77(3): 451-459, 1994.

122. MA, X., LI, C. & WANG, M. Wheat NF-YA10 functions independently in salinity and drought stress. *Bioengineered*, 6(4): 245-247, 2015.
123. MACH, J. M. & GREENBERG, J. T. Free radicals and oxidative stress. Plant cell death processes (pp. 203-214). Elsevier, 2004.
124. MANN, D. G. J., LAFAYETTE, P. R., ABERCROMBIE, L. L., KING, Z. R., MAZAREI, M., HALTER, M. C., POOVAIAH, C. R., BAXTER, H., SHEN, H., DIXON, R. A., PARROTT, W. A. & NEAL STEWART, C. Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. *Plant Biotechnology Journal*, 10(2): 226-236, 2012.
125. MARSCHNER, V. & RÖMHELD, H. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil*, 165(2): 261–274, 1994.
126. MEIJER, A. H., OUWERKERK, P. B. & HOGE, J. H. Vectors for transcription factor cloning and target site identification by means of genetic selection in yeast. *Yeast*, 14(15): 1407-1415, 1998.
127. MIGNOLET-SPRUYT, L., XU, E., IDÄNHEIMO, N., HOEBERICHTS, F. A., MÜHLENBOCK, P., BROSCHE, M., VAN BREUSEGEM, F. & KANGASJÄRVI, J. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 67(13): 3831-3844, 2016.
128. MILLAR, A. H. & LEAVER, C. J. The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *FEBS Letters*, 481(2): 117-121, 2000.
129. MITTLER, R. & ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(30): 21802-21807, 1992.
130. MITTLER, R. & ZILINSKAS, B. A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*, 5(3): 397-405, 1994.
131. MITTLER, R. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1):11-19, 2017.
132. MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M. & VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498, 2004.
133. MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., SUZUKI, N., MILLER, G., TOGNETTI, V. B., VANDEPOELE, K., GOLLERY, M., SHULAEV, V. & VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6): 300-309, 2011.
134. MIYAKE, C. & ASADA, K. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 37(4): 423-430, 1996.

135. MØLLER, I. M., JENSEN, P. E. & HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual review of plant biology*, 58: 459-481, 2007.
136. MORRISSEY, J. & GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Reviews*, 109(10): 4553-4567, 2009.
137. MOU, Z., FAN, W. & DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7): 935-944, 2003.
138. MUELLER, S., MILLONIG, G., E WAITE, G. N. The GOX/CAT system: a novel enzymatic method to independently control hydrogen peroxide and hypoxia in cell culture. *Advances in medical sciences*, 54(2): 121-135, 2009.
139. MÜLLER, K., CARSTENS, A. C., LINKIES, A., TORRES, M. A. & LEUBNER-METZGER, G. The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *The New Phytologist*, 184(4): 885-897, 2009.
140. MURRE, C., MCCAW, P. S. & BALTIMORE, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 56(5): 777-783, 1989.
141. MUSHEGIAN, A. A. Ferroptosis-like cell death in plants. *Science Signaling*, 10(468), 2017.
142. NADEAU, J. A. Stomatal development: new signals and fate determinants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(1): 29-35, 2009.
143. NAGAI, M., TANAKA, S., TSUDA, M., ENDO, S., KATO, H., SONOBE, H., MINAMI, A., HIRAGA, H., NISHIHARA, H., SAWA, H. & NAGASHIMA, K. Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7): 3843-3848, 2001.
144. NAIKA, M., SHAMEER, K., MATHEW, O. K., GOWDA, R. & SOWDHAMINI, R. STIFDB2: an updated version of plant stress-responsive transcription factor database with additional stress signals, stress-responsive transcription factor binding sites and stress-responsive genes in Arabidopsis and rice. *Plant & Cell Physiology*, 54(2): e8, 2013.
145. NAJAMI, N., JANDA, T., BARRIAH, W., KAYAM, G., TAL, M., GUY, M. & VOLOKITA, M. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(2): 171-182, 2008.
146. NEELEY, W. L. & ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, 19(4): 491-505, 2006.
147. NESI, N., DEBEAUJON, I., JOND, C., PELLETIER, G., CABOCHE, M. & LEPINIEC, L. The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain

- protein required for expression of DFR and BAN genes in Arabidopsis siliques. *The Plant Cell*, 12(10):1863-1878, 2000.
148. Nishimura, A., Aichi, I., e Matsuoka, M. A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice. *Nature Protocols*, 1(6): 2796-2802, 2006.
 149. NOCTOR, G. & FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 49: 249-279, 1998.
 150. NOCTOR, G. & FOYER, C. H. Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling. *Plant Physiology*, 171(3): 1581-1592, 2016.
 151. NOLAN, T. M., BRENNAN, B., YANG, M., CHEN, J., ZHANG, M., LI, Z., WANG, X., BASSHAM, D. C., WALLEY, J. & YIN, Y. Selective autophagy of BES1 mediated by DSK2 balances plant growth and survival. *Developmental Cell*, 41(1): 33-46.e7, 2017.
 152. NORDBERG, J. & ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11): 1287-1312, 2001.
 153. O'MALLEY, R. C., HUANG, S.S. C., SONG, L., LEWSEY, M. G., BARTLETT, A., NERY, J. R., GALLI, M., GALLAVOTTI, A. & ECKER, J. R. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell*, 165(5): 1280-1292, 2016.
 154. OGO, Y., ITAI, R. N., KOBAYASHI, T., AUNG, M. S., NAKANISHI, H. & NISHIZAWA, N. K. OsIRO2 is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil. *Plant Molecular Biology*, 75(6): 593-605, 2011.
 155. OGO, Y., ITAI, R. N., NAKANISHI, H., INOUE, H., KOBAYASHI, T., SUZUKI, M., TAKAHASHI, M., MORI, S. & NISHIZAWA, N. K. Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(11): 2867-2878, 2006.
 156. OGO, Y., ITAI, R. N., NAKANISHI, H., KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, M., MORI, S. & NISHIZAWA, N. K. The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *The Plant Journal*, 51(3): 366-377, 2007.
 157. OMIDBAKHSHFARD, M. A., PROOST, S., FUJIKURA, U. & MUELLER-ROEBER, B. Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular Plant*, 8(7): 998-1010, 2015.
 158. OUWERKERK, P. B. F. & MEIJER, A. H. Current protocols in molecular biology. (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, Eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2001.
 159. OZAWA, K. Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 176(4): 522-527, 2009.

160. OZAWA, K. A high-efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Methods in Molecular Biology*, 847: 51-57, 2012.
161. PANGESTI, N., PINEDA, A., PIETERSE, C. M. J., DICKE, M. & VAN LOON, J. J. A. Two-way plant mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 4: 414, 2013.
162. PASQUALI, G., OUWERKERK, P. B. & MEMELINK, J. Versatile transformation vectors to assay the promoter activity of DNA elements in plants. *Gene*, 149(2): 373-374, 1994.
163. PASSAIA, G., FONINI, L. S., CAVERZAN, A., JARDIM-MESSEDER, D., CHRISTOFF, A. P., GAETA, M. L., DE ARAUJO MARIATH, J. E., MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science*, 208: 93-101, 2013.
164. PASSARDI, F., COSIO, C., PENEL, C. & DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5): 255-265, 2005.
165. PATEL, R. V., NAHAL, H. K., BREIT, R. & PROVART, N. J. BAR expressolog identification: expression profile similarity ranking of homologous genes in plant species. *The Plant Journal*, 71(6): 1038-1050, 2012.
166. PAYNE, C. T., ZHANG, F. & LLOYD, A. M. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics*, 156(3): 1349-1362, 2000.
167. PIRES, N. & DOLAN, L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 27(4): 862-874, 2010a.
168. PIRES, N. & DOLAN, L. Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 5(7): 911-912, 2010b.
169. PRASANNA, V., PRABHA, T. N. & THARANATHAN, R. N. Fruit ripening phenomena--an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1): 1-19, 2007.
170. RAUBER, R. Identificação e caracterização dos genes da família de fatores transcricionais E2F em arroz (*Oryza sativa* L.). Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2012.
171. RIBEIRO, C. W., CARVALHO, F. E. L., ROSA, S. B., ALVES-FERREIRA, M., ANDRADE, C. M. B., RIBEIRO-ALVES, M., SILVEIRA, J. A. G., MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. *Plant Biology*, 14(6): 944-955, 2012.
172. RODRIGUEZ, R. E., MECCHIA, M. A., DEBERNARDI, J. M., SCHOMMER, C., WEIGEL, D. & PALATNIK, J. F. Control of cell

- proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development*, 137(1): 103-112, 2010.
173. ROSA, S. B., CAVERZAN, A., TEIXEIRA, F. K., LAZZAROTTO, F., SILVEIRA, J. A. G., FERREIRA-SILVA, S. L., ABREU-NETO, J., MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry*, 71(5-6): 548-558, 2010.
 174. SAILSBERY, J. K. & DEAN, R. A. Accurate discrimination of bHLH domains in plants, animals, and fungi using biologically meaningful sites. *BMC Evolutionary Biology*, 12:154, 2012.
 175. SAKAMOTO, T., KAMIYA, N., UEGUCHI-TANAKA, M., IWAHORI, S. & MATSUOKA, M. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes & Development*, 15(5): 581-590, 2001.
 176. SAKUMA, Y., LIU, Q., DUBOUZET, J. G., ABE, H., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3): 998-1009, 2002.
 177. SAKUMA, Y., MARUYAMA, K., QIN, F., OSAKABE, Y., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49): 18822-18827, 2006.
 178. SATO, H., MIZOI, J., TANAKA, H., MARUYAMA, K., QIN, F., OSAKABE, Y., MORIMOTO, K., OHORI, T., KUSAKABE, K., NAGATA, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits. *The Plant Cell*, 26(12): 4954-4973, 2014.
 179. SATO, Y., MURAKAMI, T., FUNATSUKI, H., MATSUBA, S., SARUYAMA, H. & TANIDA, M. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 52(354): 145-151, 2001.
 180. SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7): 995-1014, 2005.
 181. SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101(1): 7-12, 1993.
 182. SCHOMMER, C., DEBERNARDI, J. M., BRESSO, E. G., RODRIGUEZ, R. E. & PALATNIK, J. F. Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular Plant*, 7(10): 1533-1544, 2014.
 183. SCOFIELD, S., DEWITTE, W. & MURRAY, J. A. A model for *Arabidopsis* class-1 KNOX gene function. *Plant Signaling & Behavior*, 3(4): 257-259, 2008.

184. SERNA, L. Cell fate transitions during stomatal development. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 31(8), 865-873, 2009.
185. SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32(3-4): 307-326, 2000.
186. SHAIKHALI, J., NORÉN, L., DE DIOS BARAJAS-LÓPEZ, J., SRIVASTAVA, V., KÖNIG, J., SAUER, U. H., WINGSLE, G., DIETZ, K.-J. & STRAND, Å. Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the G-group of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33): 27510-27525, 2012.
187. SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y. & YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1305-1319, 2002.
188. SHIMIZU, T., TOUMOTO, A., IHARA, K., SHIMIZU, M., KYOGOKU, Y., OGAWA, N., OSHIMA, Y. & HAKOSHIMA, T. Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *The EMBO Journal*, 16(15): 4689-4697, 1997.
189. SHRINGARPURE, R. & DAVIES, K. J. A. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11): 1084-1089, 2002.
190. SINGH, K., FOLEY, R. C. & OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5): 430-436, 2002.
191. SIVITZ, A., GRINVALDS, C., BARBERON, M., CURIE, C. & VERT, G. Proteasome-mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses. *The Plant Journal*, 66(6): 1044-1052, 2011.
192. SONG, L., HUANG, S.-S. C., WISE, A., CASTANON, R., NERY, J. R., CHEN, H., WATANABE, M., THOMAS, J., BAR-JOSEPH, Z. & ECKER, J. R. A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science*, 354(6312), 2016.
193. SOTO-SUÁREZ, M., BALDRICH, P., WEIGEL, D., RUBIO-SOMOZA, I. & SAN SEGUNDO, B. The Arabidopsis miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens. *Scientific reports*, 7: 44898, 2017.
194. SUN, P., ZHANG, W., WANG, Y., HE, Q., SHU, F., LIU, H., WANG, J., WANG, J., YUAN, L. & DENG, H. OsGRF4 controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice. *Journal of integrative plant biology*, 58(10): 836-847, 2016.
195. SUN, X. H., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A. & BALTIMORE, D. Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11): 5603-5611, 1991.

196. SUZUKI, N, MILLER, G., MORALES, J., SHULAEV, V., TORRES, M. A. & MITTLER, R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6): 691-699, 2011.
197. SUZUKI, NOBUHIRO, KOUSSEVITZKY, S., MITTLER, R. & MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(2): 259-270, 2012.
198. TAN, S., LIU, F., PAN, X.-X., ZANG, Y.-P., JIN, F., ZU, W.-X., QI, X.-T., XIAO, W. & YIN, L.-P. CSN6, a subunit of the COP9 signalosome, is involved in early response to iron deficiency in *Oryza sativa*. *Scientific reports*, 6:25485, 2016.
199. TEIXEIRA, F. K., MENEZES-BENAVENTE, L., GALVÃO, V. C., MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224(2): 300-314, 2006.
200. TEIXEIRA, F. K., MENEZES-BENAVENTE, L., GALVÃO, V. C. & MARGIS-PINHEIRO, M. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3): 529-538, 2005.
201. TEIXEIRA, F. K., MENEZES-BENAVENTE, L., MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution*, 59(6): 761-770, 2004.
202. TOLEDO-ORTIZ, G., HUQ, E. & QUAIL, P. H. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, 15(8): 1749-1770, 2003.
203. TRON, A. E., BERTONCINI, C. W., CHAN, R. L. & GONZALEZ, D. H. Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38): 34800-34807, 2002.
204. TSUDA, K. & HAKE, S. Diverse functions of KNOX transcription factors in the diploid body plan of plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 27: 91-96, 2015.
205. TSUDA, K., ITO, Y., SATO, Y. & KURATA, N. Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice. *The Plant Cell*, 23(12): 4368-4381, 2011.
206. VAAHTERA, L., BROSCHE, M., WRZACZEK, M. & KANGASJÄRVI, J. Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9): 1422-1441, 2014.
207. VAN DER KNAAP, E., KIM, J. H. & KENDE, H. A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiology*, 122(3): 695-704, 2000.
208. VAN DOORN, W. G., BEERS, E. P., DANGL, J. L., FRANKLIN-TONG, V. E., GALLOIS, P., HARA-NISHIMURA, I., JONES, A. M., KAWAI-YAMADA, M., LAM, E., MUNDY, J., MUR, L. A. J., PETERSEN, M., SMERTENKO, A., TALIANSKY, M., VAN BREUSEGEM, F., WOLPERT, T., WOLTERING, E., ZHIVOTOVSKY, B. & BOZHKOVA, P. V.

- Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18(8): 1241-1246, 2011.
209. VAN HAUTEGEM, T., WATERS, A. J., GOODRICH, J. & NOWACK, M. K. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science*, 20(2): 102-113, 2015.
 210. VANDEN BERGHE, T., LINKERMANN, A., JOUAN-LANHOUE, S., WALCZAK, H. & VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2): 135-147, 2014.
 211. VERCRUYSSSEN, L., TOGNETTI, V. B., GONZALEZ, N., VAN DINGENEN, J., DE MILDE, L., BIELACH, A., DE RYCKE, R., VAN BREUSEGEM, F. & INZÉ, D. GROWTH REGULATING FACTOR5 stimulates Arabidopsis chloroplast division, photosynthesis, and leaf longevity. *Plant Physiology*, 167(3): 817-832, 2015.
 212. VIOLA, I. L., GÜTTLEIN, L. N. & GONZALEZ, D. H. Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family. *Plant Physiology*, 162(3): 1434-1447, 2013.
 213. WANG, H.-Y., KLATTE, M., JAKOBY, M., BÄUMLEIN, H., WEISSHAAR, B. & BAUER, P. Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 226(4): 897-908, 2007.
 214. WANG, L., GU, X., XU, D., WANG, W., WANG, H., ZENG, M., CHANG, Z., HUANG, H. & CUI, X. miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 62(2): 761-773, 2011.
 215. WANG, N., CUI, Y., LIU, Y., FAN, H., DU, J., HUANG, Z., YUAN, Y., WU, H. & LING, H.Q. Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant*, 6(2): 503-513, 2013.
 216. Wang, Y. & Wu, W.H. Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual review of plant biology*, 64: 451-476, 2013.
 217. WINGER, A. M., TAYLOR, N. L., HEAZLEWOOD, J. L., DAY, D. A. & MILLAR, A. H. The Cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(52): 37436-37447, 2007.
 218. WISEMAN, H. & HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical Journal*, 313(1): 17-29, 1996.
 219. WU, L., ZHANG, D., XUE, M., QIAN, J., HE, Y. & WANG, S. Overexpression of the maize GRF10, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height. *Journal of integrative Plant Biology*, 56(11): 1053-1063, 2014.

220. XIE, Y., HOU, W., SONG, X., YU, Y., HUANG, J., SUN, X., KANG, R. & TANG, D. Ferroptosis: process and function. *Cell Death and Differentiation*, 23(3): 369-379, 2016.
221. XU, G. & CHANCE, M. R. Radiolytic modification and reactivity of amino acid residues serving as structural probes for protein footprinting. *Analytical Chemistry*, 77(14): 4549-4555, 2005.
222. YANG, D.L., YAO, J., MEI, C.S., TONG, X.H., ZENG, L.J., LI, Q., XIAO, L.T., SUN, T., LI, J., DENG, X.W., LEE, C. M., THOMASHOW, M. F., YANG, Y., HE, Z. & HE, S. Y. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19): E1192-200, 2012.
223. YANG, W. S., KIM, K. J., GASCHLER, M. M., PATEL, M., SHCHEPINOV, M. S. & STOCKWELL, B. R. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34): E4966-75, 2016.
224. YI, J. & AN, G. Utilization of T-DNA tagging lines in rice. *Journal of Plant Biology*, 56(2):85-90, 2013.
225. YOSHIDA, S., FORNO, D.A., COCK, J.H. & GOMEZ, K.A. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. 3rd Edition. The International Rice Research Institute, Manila. - References - Scientific Research Publish. (n.d.), 1976.
226. YUAN, Y., WU, H., WANG, N., LI, J., ZHAO, W., DU, J., WANG, D. & LING, H.Q. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Research*, 18(3): 385-397., 2008.
227. ZECHMANN, B. Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 5:566, 2014.
228. ZHANG, D. F., LI, B., JIA, G.Q., ZHANG, T.F., DAI, J.R., LI, J.S. & WANG, S.C. Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in Maize (*Zea mays L.*). *Plant Science*, 175(6): 809-817, 2008.
229. ZHANG, F., GONZALEZ, A., ZHAO, M., PAYNE, C. T. & LLOYD, A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development*, 130(20): 4859-4869, 2003.
230. ZHANG, L., NAKANISHI ITAI, R., YAMAKAWA, T., NAKANISHI, H., NISHIZAWA, N. K. & KOBAYASHI, T. The Bowman–Birk Trypsin Inhibitor IBP1 Interacts with and Prevents Degradation of IDEF1 in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(4): 841-851, 2014.
231. ZHANG, X., JIANG, H., WANG, H., CUI, J., WANG, J., HU, J., GUO, L., QIAN, Q. & XUE, D. Transcriptome analysis of rice seedling roots in response to potassium deficiency. *Scientific Reports*, 7(1): 5523, 2017.
232. ZHENG, L., YING, Y., WANG, L., WANG, F., WHELAN, J. & SHOU, H. Identification of a novel iron regulated basic helix-loop-helix protein

- involved in Fe homeostasis in *Oryza sativa*. *BMC Plant Biology*, 10: 166, 2010.
233. ZHOU, J., LIU, M., JIANG, J., QIAO, G., LIN, S., LI, H., XIE, L. & ZHUO, R. Expression profile of miRNAs in *Populus cathayana* L. and *Salix matsudana* Koidz under salt stress. *Molecular Biology Reports*, 39(9): 8645-8654, 2012.

Anexo 1 – Lista de primers

Gene	Finalidade	Sequências
<i>OsbHLH35</i>	Amplificação da CDS e clonagens	5' F: <u>CACCATGGCTGAATGCCAACCTCTG</u> 5' R: CTATATGGACATAATTGAGCAATG
<i>OsbHLH35</i> (promotor)	Amplificação do fragmento do promotor para clonagem em pGUSxx e genotipagem da linhagem PFG_2D-10137.L	5'F:ATGGATCCGCTAAAGGCCAAGACTGTC 5'R:GCAAGCTTTGCAAACAGCGTCTTGTTA
<i>OsbHLH35</i>	Experimentos de RT-qPCR	5'F: GCCGACAAGAACCAGTTAGG 5'R: AGCAGAATTGGGCCTCTGTA
<i>OsGRF3</i>	Amplificação da CDS e clonagens	5'F: <u>CACCATGGCGATGCCCTTTGCCTC</u> 5'R: TTACCGGGAGTATATACCGTTGTG
<i>OsGRF4</i>	Amplificação da CDS e clonagens	5'F: <u>CACCATGGCGATGCCGATGCCTC</u> 5'R: TCAGTCACCATTAGTTGATCGAGA
<i>OsGRF11</i>	Amplificação da CDS e clonagens	5'F: <u>CACCATGGCGGCGGAGGGGGAGGC</u> 5'R: TCATGTAGACTCCACAGCAGCTGG
<i>OsIDEF1</i>	Amplificação da CDS e clonagens	5'F: <u>CACCATGGGGCAAATGGACGGCGGC</u> 5'R: CTAGGGATTTGTTGTCTGCTGATG
T-DNA RB1	Genotipagem da linhagem PFG_2D-10137.L	5'R: CCACAGTTTTTCGCGATCCAGACTG
<i>Gal4-AD</i>	Confirmação e sequenciamento de insertos em HybriZAP-2.1 (biblioteca de cDNA)	5'F:AGGGATGTTTTAATACCACTAC 5'R:GCACAGTTGAAGTGAACCTGC
<i>FDH</i>	Experimentos de RT-qPCR (UV-B e H ₂ O ₂)	5'F: CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC 5'R: TTCCAATGCATTCAAAGCTG
<i>UBI</i>	Experimentos de RT-qPCR (UV-B e H ₂ O ₂)	5' F: ACCACTTCGACCGCCACTACT 5' R: ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
<i>eF1α</i>	Experimentos de RT-qPCR (UV-B e H ₂ O ₂)	5'F: TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT 5'R: GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA
<i>eF1α</i>	Experimentos de RT-qPCR (frio, salinidade, dessecação, ABA, estresse mecânico, variação diária)	5'F: ACCCTCCTCTTGGTCGTTTT 5'R: AAATACCCGCATTCCACAAC
<i>UBC2</i>	Experimentos de RT-qPCR (frio, salinidade, dessecação, ABA, estresse mecânico, variação diária)	5'F: CAAAATTTTCCACCCGAATG 5'R: ATCACATGAATCAGCCATGC

Anexo 2

1. Soluções estoque para transformação de calos de arroz

Macro elementos N6	10 x concentrado
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,6 g/l
KNO ₃	28,3 g/l
KH ₂ PO ₄	4 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,9 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,7 g/l
H ₂ O até 1 litro	Manter a 4º C

Micro elementos N6	1000 x concentrado
MnSO ₄ .H ₂ O	333,4 mg/100ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O	150 mg/100ml
H ₃ BO ₃	160 mg/100ml
KI	80 mg/100ml
H ₂ O até 100 ml	Manter a 4º C

Vitaminas N6	100 x concentrado
Tiamina-HCl	100 mg/l
Piridoxina-HCl	50 mg/l
Ácido Nicotínico	50 mg/l
Glicina	200 mg/l
H ₂ O até 1 litro	Manter a 4º C

Micro elementos B5	100 x concentrado
MnSO ₄ .H ₂ O	1000 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/l
H ₃ BO ₃	300 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	200 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	3,87 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5 mg/l
KI	75 mg/l
H ₂ O até 1 litro	Manter a 4º C

Vitaminas B5	100 x concentrado
Mio-inositol	10 g/l
Tiamina-HCl	1 g/l
Piridoxina-HCl	0,1 g/l
Ácido Nicotínico	0,1 g/l
H ₂ O até 1 litro	Manter a 4º C

Fe-EDTA	100 x concentrado
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78 g/l
EDTA dissódico	3,73 g/l
Diluir o FeSO ₄ .7H ₂ O em água destilada quente. Adicionar o EDTA dissódico e resfriar a 25º C.	
H ₂ O até 1 litro	Manter a 4º C

2,4-D	1 mg/ml
Dissolver 100mg em 1 ml de etanol absoluto. Adicionar 3 ml de KOH 1M. Ajustar o pH 6 com HCl 1M. Completar com H ₂ O até 100 ml. Manter a 4º C.	

Acetosseringona – 100 mM
Dissolver 196mg em 5 ml de etanol absoluto. Adicionar 5 ml de água destilada. Filtrar. Manter a 4º C no escuro.

Higromicina – 50 mg/ml
Solução pronta a 50 mg/ml: usar 1 ml por litro de meio. Manter a 4º C no escuro

Timentina – 300 mg/ml
300 mg/ml em H ₂ O. Filtrar. Manter a -20º C no escuro.

Cefotaxina – 200 mg/ml
200mg/ml em água. Filtrar. Manter a -20º C no escuro

ABA – 10 mg/ml
Dissolver 200mg em gotas de NaOH 1M e completar com água destilada até 20 ml. Filtrar.

BAP – 10 mg/ml
Dissolver 200 mg em gotas de NaOH 1M e completar com água destilada até 20ml. Pode ser autoclavado.

ANA – 10 mg/ml
Dissolver 200 mg em gotas de NaOH 0,1M e completar com água destilada até 20 ml. Pode ser autoclavado.

Kinetina – 10 mg/ml
Dissolver 200 mg em gotas de NaOH 0,1M e completar com água destilada até 20ml. Pode ser autoclavado.

Anexo 2 – Soluções e meios de cultura para arroz

2. Meios de cultura para transformação de calos de arroz

N6D - Indução de calos	1 litro
Macro elementos N6 (10 x)	100 ml
Micro elementos N6 (1000 x)	1 ml
Vitaminas N6 (100x)	10 ml
FeEDTA (20 mM)	100 ml
Mio-inositol	0,1 g
Caseína hidrolisada	0,3 g
Prolina	2,9 g
2,4-D (1 mg/ml)*	2 ml
Sacarose	30 g
Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M	
Fitigel	3 g
H ₂ O até 1 litro	Autoclavar

NB - Sub cultivo	1 litro
Macro elementos N6 (10x)	100 ml
Micro elementos B5 (100x)	10 ml
Vitaminas B5 (100x)	10 ml
FeEDTA (20mM)	10 ml
2,4-D (1mg/ml)	2 ml
Sacarose	30 g
Prolina	0,5 g
Glutamina	0,5 g
Caseína hidrolisada	0,3 g
Ajustar pH para 5,8-5,85 com KOH 1M	
Fitigel	3g
H ₂ O até 1 litro	Autoclavar

NBA - Co-cultivo	1 litro
Meio NB	1 litro
Acetosseringona (1000x)	1 ml

HTC - Seleção	1 litro	
Meio NB autoclavado	1 litro	
Higromicina (50 mg/ml)	HTC30	HTC50
	600 µl	1 ml
Timentina (300 mg/ml)	500 µl	
Cefotaxina (200 mg/ml)	500 µl	

Etapas de regeneração
Utilizar meios PRHT50+RHT50 ou omitir a pré-regeneração e usar somente meio MS-Reg (OZAWA 2009):

PRHT50 – Pré-regeneração	1 litro
Meio NB sem 2,4-D	1 litro
BAP (10mg/ml)	200 µl (2 mg)
ANA (10mg/ml)	100 µl (1 mg)
ABA (10mg/ml)	500 µl (5 mg)
Higromicina (50mg/ml)	1 ml
Timentina (300mg/ml)	500 µl

RHT50 – Regeneração*	1 litro
Meio NB sem 2,4-D	1 litro
BAP (10mg/ml)	300 µl (3 mg)
ANA (10mg/ml)	50 µl (0,5 mg)
*Higromicina (50mg/ml)	1 ml
Timentina (300mg/ml)	500 µl

Ozawa - Regeneração	1 litro
MS basal medium	4,4 g
Caseína Hidrolisada	2 g
Sacarose	30 g
Sorbitol	20 g
KINETIN (100 mg/l)	25 ml
ANA (200mg/l)	500 µl
Ajustar pH para 5,8-5,85 com KOH 1M	
Fitigel	4 g
H ₂ O até 1 litro	Autoclavar

MS+Hig	1 litro
MS basal medium	4,4 g
Higromicina (50mg/ml)	1 ml

*Pode-se omitir o uso de Higromicina nesta etapa.

CURRÍCULO

FONINI, L.S.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Leila Spagnolo Fonini

E-mail: leila.fonini@gmail.com

2. FORMAÇÃO

- 2013 - 2017** **Doutorado em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM - UFRGS**
Bolsista da CAPES
- 2012 a 2013** **Mestrado em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM - UFRGS**
Bolsista do CNPq
- 2008 a 2012** **Graduação em Biomedicina – UFRGS**

3. TRAJETÓRIA PROFISSIONAL

- 2013 - 2017** **Doutorado em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM - UFRGS**
Bolsista da CAPES
Local: Laboratório de Genética Vegetal - UFRGS, com período sanduíche no GPlants - ITQB - Universidade Nova de Lisboa - Portugal
Atividades: Atuação no planejamento e na execução de projetos de pesquisa, padronização de protocolos, co-orientação de iniciação científica, colaboração com pesquisadores no Brasil e no exterior.
- 2012 a 2013** **Mestrado em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM – UFRGS**
Bolsista do CNPq
Local: Laboratório de Genética Vegetal – UFRGS
Atividades: Atuação no planejamento e na execução de projetos de pesquisa, padronização de protocolos, colaboração com pesquisadores.
- 2011 a 2012** **Estágio Curricular em Análises Clínicas**
Local: Laboratório Endocrimeta de Análises Clínicas
Atividades: Execução de rotinas em análises clínicas com

finalidade diagnóstica.
Carga horária total: 700 horas

2010 a 2012 Estágio de Iniciação Científica
Bolsista do CNPq
Local: Laboratório de Genética Vegetal – UFRGS
Atividades: Execução de projetos de pesquisa sob supervisão.
Carga horária: 20 horas semanais

2009 a 2010 Estágio Voluntário de Iniciação Científica
Local: Laboratório de Genética Vegetal – UFRGS
Atividades: Execução de projetos de pesquisa sob supervisão.
Carga horária: 20 horas semanais

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2011 Destaque do XXIII Salão de Iniciação Científica – UFRGS
Indicação ao Prêmio Jovem Pesquisador – UFRGS

5. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016 Curso geral de propriedade intelectual
Patentes; proteção de novas variedades de vegetais/cultivares.
Oferecimento: Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e
Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI) - à distância
Carga horária: 75 horas

2015 Plant development and hormones: a crash course
Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Carga horária: 15 horas

2013 Signal Transduction in Plants
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Carga horária: 15 horas

2011 Curso Teórico-Prático de Coleta de Sangue
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Carga horária: 6 horas

2010 Extensão universitária em Curso de Extensão em Biologia Molecular Básica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Carga horária: 30 horas

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

NUNES P.R., FONINI L.S., OLIVEIRA M.S., KATAGIRI S.K. Prevalência e perfil de resistência bacteriana em infecções do trato urinário de pacientes ambulatoriais da Grande Porto Alegre, RS. RBAC.2016;48(3 supl.1):92-7, 2016.

CASTILHOS, GRACIELA; LAZZAROTTO, FERNANDA; SPAGNOLO-FONINI, LEILA; BODANESE-ZANETTINI, MARIA HELENA; MARGIS-PINHEIRO, MÁRCIA. Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant Science (Limerick)*, v. 223, p. 1-7, 2014.

PASSAIA, GISELE; SPAGNOLO FONINI, LEILA; CAVERZAN, ANDRÉIA; JARDIM-MESSEDER, DOUGLAS; CHRISTOFF, ANA PAULA; GAETA, MARCOS LETAIF; DE ARAUJO MARIATH, JORGE ERNESTO; MARGIS, ROGÉRIO; MARGIS-PINHEIRO, MARCIA. The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science (Limerick)*, v. 208, p. 93-101, 2013.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

FONINI, L. S.; KÖRBES, A. P.; CAGLIARI, A.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M.. Analysis of the interaction between transcription factors NF-YA and LEC1-type of castor bean (*Ricinus communis* L.). In: IV Simpósio de genética Molecular de Plantas, 2013, Bento Gonçalves. Anais do IV Simpósio de genética Molecular de Plantas, 2013.

CASTILHOS, G.; BÜCKER-NETO, L.; CAMPOS, L. L.; FONINI, L. S.; RECHENMACHER, C.; CABREIRA, C.; WIEBKE-STROHM, B.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; MARGIS-PINHEIRO, M. Characterization of the PPR_2 gene in response to the *Phakopsora pachyrizi* infection in soybean. In: 6th International Crop Science Congress, 2012, Bento Gonçalves. Annals of the 6th International Crop Science Congress.

PASSAIA, G.; Caverzan, A; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of Glutathione peroxidase gene family in rice (*Oryza sativa*). In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

FONINI, L. S.; PASSAIA, G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Gene expression profile of Glutathione peroxidase of rice (*Oryza sativa*) during plant development. In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Resumos do 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011.

PASSAIA, G.; Caverzan, A; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of Glutathione peroxidase gene family in rice (*Oryza sativa*). In: 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011, Budapeste. Abstracts of 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011.

PASSAIA, G.; Caverzan, A; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Avaliação da expressão dos genes de Glutathione peroxidase de arroz sob diferentes estresses abióticos e localização subcelular dos produtos gênicos. In: XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, 2010, La Plata. Libro de Resúmenes, 2010.

PASSAIA, G.; Caverzan, A; FONINI, L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M. Functional characterization of Glutathione peroxidase gene family in rice (*Oryza sativa*). In: 8th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2010, Bento Gonçalves. Complete program, 2010.