

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

FRANCIELI ORTOLAN

UMA ESTRATÉGIA FUNCIONAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DE *OsbHLH35* E
OsGRF11 NO DESENVOLVIMENTO DE ARROZ

Porto Alegre
Novembro de 2018

FRANCIELI ORTOLAN

UMA ESTRATÉGIA FUNCIONAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DE *OsbHLH35* E
OsGRF11 NO DESENVOLVIMENTO DE ARROZ

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Orientadora: Marcia Maria A. N. P. Margis

Co-orientadora: Fernanda Lazzarotto

Porto Alegre

Novembro de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Funcional de Plantas do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - Brasil. As agências financiadoras do Projeto de Pesquisa em que se enquadra o presente trabalho foram a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	O MODELO DE ESTUDO	11
1.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO - ERO	12
1.3	O PAPEL DAS ERO NO DESENVOLVIMENTO E NAS RESPOSTAS A ESTRESSES.....	14
1.4	A FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DO TIPO bHLH (BASIC HELIX-LOOP-HELIX) E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO <i>Os</i> bHLH35	16
1.5	A FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO GRF (GROWTH-REGULATING FACTOR).....	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	MATERIAL VEGETAL	22
3.2	ANÁLISE DA TRANSGENIA E EXPRESSÃO GÊNICA.....	22
3.2.1	Extração de DNA.....	22
3.2.2	Confirmação da inserção do transgene por PCR.....	22
3.2.3	Extração de RNA.....	23
3.2.4	Síntese de cDNA	23
3.2.5	RT-qPCR	23
3.3	CLONAGEM DO PROMOTOR DE <i>Os</i> bHLH35	24
3.4	TRANSFORMAÇÃO DE CALOS DE ARROZ	26
3.4.1	Indução e cultivo de calos embriogênicos.....	26
3.4.2	Transformação dos calos	27
3.5	ENSAIO HISTOQUÍMICO	27
3.6	TESTE DE VIABILIDADE DE PÓLEN.....	28
3.7	MORFOLOGIA DA FLOR.....	28
4	RESULTADOS	29
4.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS PLANTAS SUPEREXPRESSANDO OS GENES <i>Os</i> bHLH35 E <i>Os</i> GRF11	29
4.2	REGULAÇÃO DE <i>Os</i> GRF11 SOBRE <i>Os</i> bHLH35.....	30

4.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS PLANTAS SUPEREXPRESSANDO O GENE <i>OsbHLH35</i>	31
4.4	PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>OsbHLH35</i>	34
4.5	EXPRESSÃO DE GENES EM PANÍCULAS DE ARROZ	36
5	DISCUSSÃO	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXO 1 – TRANSFORMAÇÃO DE ARROZ cv. Nipponbare.....	50
	ANEXO 2 – ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DO ARROZ ...	54
	APÊNDICE – CURRICULUM VITÆ	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP-1 – do inglês *Activator protein-1*
- APX – ascorbato peroxidase
- AS – ácido salicílico
- ASC – ascorbato
- bHLH – do inglês *basic helix-loop-helix*
- cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina
- CAT – Catalase
- CDK – do inglês *Cyclin-dependent kinase*
- cDNA – DNA complementar
- Conab – Companhia nacional de abastecimento
- CREB – do inglês *cAMP response element-binding protein*
- cv – cultivar
- CYC – ciclina
- DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*
- dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DO – densidade óptica
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- eF-1 – do inglês *elongation factor 1*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- FAO – do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division*
- FDH – Formaldeído desidrogenase
- FT – Fator de transcrição
- GFP – do inglês *Green Fluorescent Protein*
- GGPL – glicina – glicina – prolina - leucina
- GIF – do inglês *Growth-Interacting Factor*
- GPX – Glutationa peroxidase
- GRF – fator de transcrição do inglês *Growth Regulating Factor*
- GSH – glutationa
- GST – Glutationa-S-transferase

GUS – β -glucuronidase
miR – microRNA
M-MLV – do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus*
mRNA – RNA mensageiro
MYB – família de fatores de transcrição MYB (*myeloblastosis*)
NAC – família de fatores de transcrição NAC (inicial dos genes NAM-ATAF-CUC)
NADP – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B – do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NLS – do inglês *nuclear localization signal*
NT – não-transformado
OE – do inglês *overexpression*
PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*
PRX – peroxirredoxinas
QTL – glutamina-leucina-glutamina
RFP – do inglês *Red Fluorescent Protein*
RNA – do inglês *ribonucleic acid*
RNAi – RNA de interferência ou interferente
RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real
SDS – do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*
SOD – superóxido dismutase
SPSS – do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*
T-DNA – DNA de transferência
TQL – treonina – glutamina - leucina
Tris – tris-hidroximetilaminometano
WRC – triptofano-arginina-cisteína
WRKY – família de fatores de transcrição WRKY (abreviação do domínio WRKYGQK)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) através de oxigênio.....	13
Figura 2: Estrutura das proteínas bHLH.....	17
Figura 3 - Experimento de transativação do promotor do gene <i>OsHLLH035</i> pelo fator de transcrição <i>OsGRF11</i>	18
Figura 4: Características estruturais das proteínas GRF.....	19
Figura 5: Representação do vetor pANIC6A segundo Mann <i>et al.</i> (2011).....	20
Tabela 1: Lista de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.....	24
Figura 6: Representação gráfica do vetor pHGWSF7.....	26
Figura 7: Confirmação da inserção do T-DNA nas plantas de arroz regeneradas.....	29
Figura 8: Análise por RT-qPCR da expressão de <i>OsHLLH35</i> (A) e <i>OsGRF11</i> (B) nas suas respectivas linhagens transgênicas.....	30
Figura 9: Análise de RT-qPCR do nível de transcrito das plantas de arroz superexpressando <i>OsGRF11</i>	30
Figura 10: Análise fenotípica de panículas de plantas de arroz superexpressando <i>OsHLLH35</i> em aspecto geral e detalhe.....	31
Figura 11: Análise quantitativa da produção expressa pelo número de sementes produzidas sobre o número total de espiguetas de plantas.....	32
Figura 12: Análise de lâminas com material polínico por microscopia óptica.....	32
Figura 13: Flores de plantas NT e três linhagens independentes de plantas transgênicas superexpressando <i>OsHLLH35</i>	33
Figura 14: Geração de plantas transgênicas para o estudo do promotor do gene <i>OsHLLH35</i>	34
Figura 15: Confirmação da transgenia das plantas transformadas.....	35
Figura 16: Marcação histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase em calos transgênicos.....	35
Figura 17: Padrão de expressão de <i>GUS</i> dirigido pela sequência promotora do gene <i>OsHLLH35</i>	36
Figura 18: Análise de RT-qPCR do nível de transcrito dos genes <i>OsHLLH35</i> e <i>OsGRF11</i> nos estágios R3, R4, R5 e R7 do desenvolvimento de panículas de plantas de arroz NT...37	37

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é extremamente versátil, é planta modelo das monocotiledôneas, seu grão é base alimentar de milhões de pessoas ao redor do mundo, e é amplamente cultivado, agregando valor econômico e social à cultura. As proteínas do tipo bHLH (*basic helix-loop-helix*) são membros de uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas e participam da regulação de uma grande variedade de processos. Para entender a função de um membro desta família, foi realizado um ensaio de mono-híbrido em levedura, que permitiu identificar três membros da família GRF (*Growth Regulating Factor*), OsGRF3, OsGRF4 e OsGRF11, como reguladores transcricionais do gene *OsbHLH35*. A fim de fornecer informações adicionais sobre a função de *OsbHLH35* e para confirmar a regulação de OsGRF11 sobre *OsbHLH35 in vivo*, plantas de arroz superexpressando os genes separadamente foram previamente obtidas através de transformação de calos embriogênicos de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. Quatro linhagens de *OsbHLH35* e sete de *OsGRF11* foram obtidas e analisadas molecularmente através da análise da expressão relativa dos genes *OsbHLH35* e *OsGRF11* que confirmou a superexpressão dos genes de interesse. A análise fenotípica das plantas superexpressando *OsbHLH35* mostrou que essas plantas produziam significativamente menor número de sementes que as plantas não transformadas, além de apresentarem fenótipo de pálea e lema abertas, flores não fecundadas e poucas sementes maduras. Ao realizar uma análise detalhada da flor, foram observadas anteras com aspecto curvo. Para abordar em quais tecidos *OsbHLH35* é expresso, um estudo do promotor foi realizado em plantas de arroz expressando o gene repórter da β -glucuronidase sob o controle do promotor de *OsbHLH35*. Através dessa abordagem observou-se a expressão de *OsbHLH35* na antera, nos primórdios florais, na pálea e lema, e no ovário. A análise da expressão relativa de *OsGRF11* e *OsbHLH35* ao longo do desenvolvimento da panícula em plantas do tipo selvagem mostrou que *OsGRF11* é altamente expresso em todos os estágios de desenvolvimento analisados, enquanto a expressão de *OsbHLH35* é baixa nas mesmas condições. Entender como *OsbHLH35* está envolvida no desenvolvimento da antera, quais são os genes regulados por esse fator de transcrição, e como é sua relação com outras bHLHs permitirá elucidar onde este gene está inserido no processo de desenvolvimento floral de arroz.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is not only a monocotyledonous model plant, but also a food base for millions of people, and is widely cultivated having social and economic importance. Basic helix-loop-helix (bHLH) proteins are members of one of the largest families of transcription factors in plants and participate in the regulation of a wide variety of processes. To understand the role of one member of this family, a yeast monohybrid assay was performed which identified three members of the Growth Regulating Factor (GRF) family, OsGRF3, OsGRF4 and OsGRF11, as transcriptional regulators of the *OsbHLH35* gene. In order to provide additional information on *OsbHLH35* function and to confirm the regulation of OsGRF11 on *OsbHLH35 in vivo*, rice plants overexpressing the genes separately were obtained previously by transformation of embryogenic rice calli via *Agrobacterium tumefaciens*. Four lines of *OsbHLH35* and seven lines of *OsGRF11* were obtained and molecularly analyzed. Analysis of relative expression of the *OsbHLH35* and *OsGRF11* genes confirmed overexpression of these genes. Phenotypic analysis of plants overexpressing *OsbHLH35* showed that these plants produced significantly fewer seeds than untransformed plants, besides presenting open palea and lemma phenotype, non-fertilized flowers and few mature seeds. When performing a detailed analysis of the flower, curved anthers were observed. To address which tissues *OsbHLH35* are expressed, a promoter study was performed on rice plants expressing the β -glucuronidase reporter gene under the control of the *OsbHLH35* promoter. Through this approach, the expression of *OsbHLH35* was observed in the anther, floral primordia, palea and lemma, and in the ovary. Analysis of the relative expression of *OsGRF11* and *OsbHLH35* throughout panicle development in wild type plants showed that *OsGRF11* is highly expressed at all developmental stages analyzed, while *OsbHLH35* expression is low under the same conditions. Understanding how *OsbHLH35* is involved in anther development, which genes are regulated by this transcription factor, and how it relates to other bHLHs will allow us to clarify where this gene is inserted in the floral development process of rice.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MODELO DE ESTUDO

O clado das monocotiledôneas é a linhagem mais ancestral dentro do grupo das angiospermas, tendo sua origem há 134 milhões de anos atrás (Bremer, 2000). As principais sinapomorfias encontradas no clado das monocotiledôneas são a presença de um único cotilédono, feixes vasculares distribuídos irregularmente na seção transversal do caule, veias paralelas nas folhas, sistema radicular adventício e ausência de crescimento secundário (Doyle & Donoghue, 1986; Soltis & Soltis, 2004). As duas maiores famílias no grupo das monocotiledôneas são Orchidaceae (orquídeas) e Poaceae (gramíneas), abrangendo cerca de metade das espécies do grupo, dentre as quais o arroz (*Oryza sativa* L.), pertencente à família Poaceae (Soltis & Soltis, 2004).

O sequenciamento do genoma completo da espécie *O. sativa* ssp *japonica* cv. Nipponbare foi finalizado em 2004 pelo *International Rice Genome Sequencing Project*, assim o arroz tornou-se a primeira monocotiledônea e cereal cultivado a ter seu genoma sequenciado (Sasaki, 2005). O genoma do arroz possui 370 Mbp, sendo o menor dentre os cereais cultivados, como o milho e o trigo. Quando comparado ao da planta modelo de dicotiledôneas, *Arabidopsis thaliana*, observou-se que apesar do genoma do arroz ser quase quatro vezes maior que o de *A. thaliana* o número de genes difere pouco (28.540 em arroz e 26.521 em *Arabidopsis*), e que, segundo o *Gene Ontology*, os genes possuem funções similares (Rice Genome Annotation Project; Sakai *et al.* 2014). Devido a todas estas características, o arroz se tornou modelo de estudo para monocotiledôneas e cereais cultivados, e conta hoje com diversas ferramentas de pesquisa específicas para a espécie.

O arroz é ainda o terceiro cereal mais cultivado no mundo segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division*), sendo a base alimentar de regiões de baixa renda do sul da Ásia. O grão é consumido em todo o mundo e no ano de 2005 forneceu 20% do total de calorias consumidas mundialmente, segundo o *International Rice Research Institute* (Normile, 2008). A China é o maior produtor de arroz, produzindo quase 195 milhões de toneladas por ano, seguida pela Tailândia e Filipinas. O Brasil ocupa o 9º lugar no ranking mundial, produzindo pouco mais de 11 milhões de toneladas de acordo com dados da FAO, que geram cerca de R\$ 9 bilhões por ano segundo a Conab (Companhia nacional de abastecimento). O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz irrigado do país sendo responsável por 71,2% da produção nacional, por meio da qual gera

mais de 50 mil empregos diretos no estado, segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO - ERO

As alterações que ocorreram na atmosfera no início do eón Proterozóico, durante o período Pré-Cambriano devido a grande oxidação da atmosfera, resultado da fotossíntese realizada por cianobactérias, criaram as condições necessárias para o surgimento de seres complexos como os que conhecemos hoje (Balthasar & Butterfield, 2009). A utilização da molécula de oxigênio como acceptor final na cadeia transportadora de elétrons permitiu uma forma de obtenção de energia muito mais eficiente que a fermentação realizada por seres anaeróbicos. Além disso, o aumento do nível do oxigênio na atmosfera terrestre trouxe outras vantagens para as formas de vida na Terra, como por exemplo, o surgimento da camada de ozônio, que resultou em proteção contra a intensa radiação ultravioleta (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Apesar de todas as vantagens, o uso do oxigênio molecular pela célula acarreta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem ser extremamente tóxicas para os seres vivos, causando danos as paredes celulares, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Scandalios, 2005). O processo de geração de ERO ocorre durante o metabolismo normal da célula, durante os processos de respiração e fotossíntese, por exemplo, e se dá basicamente quando uma molécula de oxigênio atmosférico (O_2) sofre excitação e forma o oxigênio singleto (1O_2) ou sofre uma redução parcial e forma o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este, através da enzima superóxido dismutase (SOD), é reduzido ou dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao interagir com Fe^{2+} , através da reação de Fenton, gera radicais hidroxila (OH^{\bullet}) (Fig. 1) (Mittler, 2017).

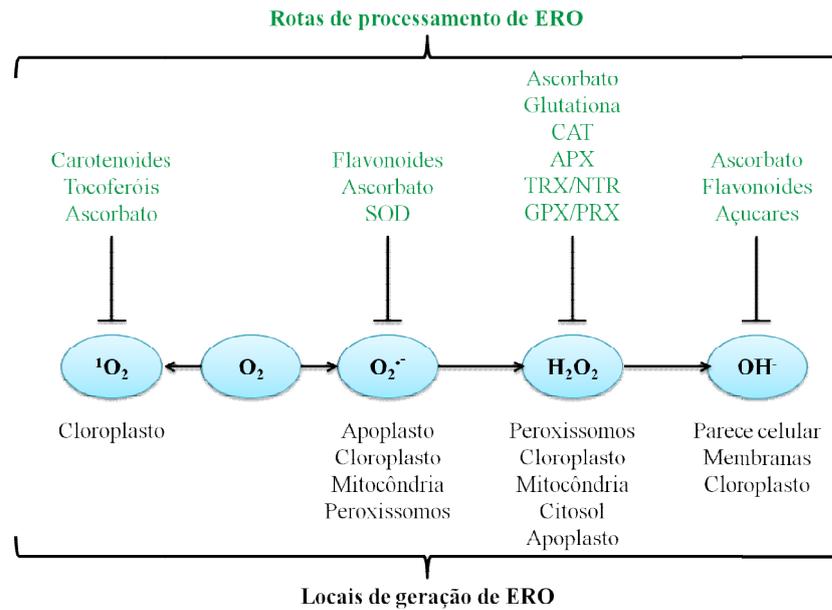


Figura 1: Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) através de oxigênio. Compostos utilizados em cada reação e lugar de processamento de cada ERO, baseado em Mhamdi & Van Breusegem (2018).

Cada ERO possui propriedades químicas únicas que as permitem interagir com diferentes moléculas, em geral oxidam lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. O oxigênio singlete é gerado principalmente no cloroplasto, mais especificamente no centro de reação do fotossistema II por ativação fotodinâmica; o superóxido é produzido durante a respiração mitocondrial, na cadeia transportadora de elétrons e por NADPH oxidases, é capaz de reagir com proteínas Fe-S; Os radicais hidroxila são os mais instáveis, com meia-vida de 1 ns, diferente do H_2O_2 que é a ERO mais estável com meia-vida de 1 ms (Foyer & Noctor, 2009; Mhamdi & Van Breusegem, 2018).

Para neutralizar o efeito nocivo dessas moléculas, os organismos desenvolveram um complexo metabolismo antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos. As moléculas antioxidantes podem ser aminoácidos, açúcares, carotenoides e compostos fenólicos, sendo fonte para as rotas metabólicas do sistema antioxidante, como a produção de NADPH, ou também reagindo diretamente com as ERO. No entanto, o ascorbato e a glutaciona são moléculas-chave do sistema antioxidante, pois são substratos de enzimas antioxidantes específicas (Couée *et al.*, 2006; Noctor, Lelarge-Trouverie & Mhamdi, 2015; Noctor, Reichheld & Foyer, 2018). Dentre as enzimas relacionadas ao metabolismo redox estão: catalases (CATs), ascorbato peroxidases (APXs), glutaciona S-transferases (GSTs), peroxirredoxinas (PRXs), glutaciona peroxidases (GPX) e superóxido dismutases (SODs) (Mhamdi & Van Breusegem, 2018).

1.3 O PAPEL DAS ERO NO DESENVOLVIMENTO E NAS RESPOSTAS A ESTRESSES

Embora sejam consideradas moléculas potencialmente danosas, as ERO também desempenham um importante papel na sinalização em plantas, sendo essenciais para o desenvolvimento e respostas contra diferentes estresses bióticos e abióticos (Mittler *et al.*, 2011; Mittler, 2017). A utilização das ERO como moléculas sinalizadoras trouxe algumas vantagens, dentre elas a capacidade da célula produzir e livrar-se rapidamente dessas moléculas permitindo mudanças dinâmicas em seus níveis (Mittler *et al.*, 2011). Há ainda a possibilidade de produzir e acumular diferentes ERO em diferentes compartimentos subcelulares, ampliando sua participação em vias de sinalização e a capacidade de produzir um sinal autopropagável, rápido, de longa distância, que pode ser transmitido ao longo da planta (Mittler *et al.*, 2011). As ERO medeiam o controle do ciclo celular, interagindo com ciclinas (CYCs) e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), controlando a divisão, expansão e morte da célula (Menon & Goswami, 2007; Diaz-Vivancos *et al.*, 2015); desempenham função na formação das raízes das plantas, controlando o crescimento, a arquitetura da raiz e o alongamento dos pelos radiculares (Foreman *et al.*, 2003; Tsukagoshi, Busch & Benfey, 2010; Sundaravelpandian, Chandrika & Schmidt, 2013); atuam na formação da folha via metabolismo de auxina e também na senescência foliar (Zimmermann *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2014); regulam o desenvolvimento do gametófito masculino e feminino, o controle na germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico (Jiménez-Quesada, Traverso & Alché, 2016; Mhamdi & Van Breusegem, 2018).

Além disso, as ERO desempenham funções essenciais nos mecanismos utilizados pelas plantas para lidar com estresses bióticos e abióticos, principalmente por meio da ação da enzima NADPH oxidase, grande responsável pela geração de explosões oxidativas no apoplasto, elemento chave das respostas sistêmicas a estresses em geral (Noctor, Reichheld & Foyer, 2018). Na defesa contra patógenos, a explosão oxidativa atua de maneira local, diretamente no patógeno causando dano celular, além de induzir na planta o reforço da parede celular e desencadear uma via de sinalização responsável pelo aumento da expressão de diversos fatores de transcrição, como os pertencentes à família WRKY, que, posteriormente, atuam na indução da expressão de genes relacionados à defesa (Scarpeci *et al.*, 2008; González-Bosch, 2018). Os estresses abióticos ativam a sinalização por ácido salicílico (SA), que por sua vez induz tanto a produção quanto a degradação de H₂O₂, além de inicialmente, diminuir os níveis de GSH (Choudhury *et al.*, 2017). O acúmulo de H₂O₂ no estresse abiótico

afeta os níveis e a função de hormônios vegetais, como o ácido abscísico, auxina, brassinosteroides e giberelinas (Mateo *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a aplicação de H₂O₂ exógeno nas plantas confere tolerância à salinidade, seca, baixas e altas temperaturas, e também a metais pesados (Hossain *et al.*, 2015; González-Bosch, 2018).

As ERO são essenciais no processo de sinalização em plantas, sendo o ¹O₂ e o H₂O₂ as principais moléculas sinalizadoras (Czarnocka & Karpiński, 2018). O ¹O₂ é eliciador de várias rotas responsivas a estresse, contribuindo para a produção de mensageiros secundários, estes por sua vez se tornam espécies eletrofilicas reativas, capazes de causar alterações na expressão gênica, por reagir quimicamente com ácidos nucleicos e proteínas (Asada, 2006; Laloi & Havaux, 2015). O H₂O₂ no estroma do cloroplasto interage com sensores que desencadeiam uma sinalização retrógrada que é capaz de regular a expressão de genes no núcleo, como genes codificadores de enzimas e de fatores de transcrição (Sewelam *et al.*, 2014). O H₂O₂ também é capaz de se difundir no envelope cloroplastídico através de aquaporinas (Borisova *et al.*, 2012). O H₂O₂ produzido na mitocôndria consegue facilmente se difundir pela membrana mitocondrial e ativar rotas de sinalização, além disso, mudanças na homeostase redox da mitocôndria desencadeiam uma sinalização retrógrada da mitocôndria para o núcleo, resultando na modulação da expressão de vários genes (Vanlerberghe, 2013; Jardim-Messeder *et al.*, 2015; Czarnocka & Karpiński, 2018).

O H₂O₂ regula a translocação de fatores de transcrição do citoplasma para o núcleo, a transativação, a ligação ao DNA, além de regular a transcrição, a estabilidade do mRNA, a síntese proteica e a degradação de diversos fatores de transcrição (Marinho *et al.*, 2014). Inúmeros fatores de transcrição de metazoários já foram descritos como responsivos a H₂O₂: AP-1 (Activator protein-1) que regula vários processos celulares como proliferação celular, apoptose, sobrevivência e diferenciação; CREB é responsivo a cAMP (Monofosfato cíclico de adenosina) e regula a proliferação celular; NF-κB que desempenha um papel chave na inflamação, resposta imune inata e adaptativa, proliferação e apoptose (Sies, 2017). Em plantas, os fatores de transcrição das famílias NAC, MYB, WRKY e bHLH, são responsivos a mudanças na homeostase redox, e estão relacionados à resposta a diversos tipos de estresse, como o estresse oxidativo, estresse abiótico (seca, salinidade, altas e baixas temperaturas), estresse osmótico e estresses bióticos (ataques de patógenos e insetos) (Tran, 2004; Dubos *et al.*, 2010; Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; De Clercq *et al.*, 2013; Schieber & Chandel, 2014). Em uma análise de microarranjo realizada pelo nosso grupo de pesquisa, verificou-se que um membro ainda não caracterizado da família bHLH é capaz de responder ao acúmulo de H₂O₂ em plantas de arroz (Ribeiro *et al.*, 2012). Este fator de transcrição não

possui função conhecida e está anotado em bancos de dados públicos como OsbHLH35 (LOC_Os01g06640).

1.4 A FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DO TIPO bHLH (BASIC HELIX-LOOP-HELIX) E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO OsbHLH35

As proteínas que possuem o domínio bHLH estão presentes em todos os eucariotos, desde organismos unicelulares (leveduras) até organismos altamente complexos como plantas e mamíferos, indicando que o domínio bHLH é um componente ancestral da regulação transcricional (Heim *et al.*, 2003). O verme *Caenorhabditis elegans* e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* possuem uma grande diversidade de genes codificadores de proteínas do tipo bHLH, a qual é ainda maior em ratos e humanos, com 117 e 130 genes, respectivamente. No entanto, muitos dos genes encontrados em *Arabidopsis* não estão presentes no clado dos metazoários, sugerindo que o ancestral em comum de plantas e animais continha poucas cópias de genes codificadores de bHLH, e que a diversidade encontrada hoje se deu após a diversificação dos eucariotos (Stevens, Roalson & Skinner, 2008; Skinner *et al.*, 2010).

Estas proteínas possuem geralmente duas regiões, a região básica responsável pela ligação à molécula de DNA, e a região hélice-volta-hélice (HLH) responsável pela interação proteína-proteína, que podem formar homo ou heterodímeros (Sun *et al.*, 2007) (Fig. 2). A região básica está localizada na porção amino-terminal e possui em média 15 aminoácidos, sendo 6 aminoácidos básicos (Atchley, Terhalle & Dress, 1998). A região HLH está localizada na porção carboxi-terminal, contém aproximadamente 40-50 aminoácidos dispostos em duas hélices anfipáticas com resíduos hidrofóbicos, ligadas entre si por uma volta que pode ter vários tamanhos (Nair & Burley, 2000). Em arroz há 167 proteínas da família bHLH, as quais podem ser classificadas em dois grandes grupos, tendo como base 17 aminoácidos da região N-terminal. O grupo 1 contém o maior número de bHLHs (141) e possui de cinco a oito resíduos básicos nessa região. Dentro do grupo 1, 114 proteínas são ligantes putativos de sequência E-box (CAGCTG) e 27 outras bHLHs se ligam em outras sequências no DNA (Heim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). O grupo 2 contém apenas 26 proteínas que perderam o domínio básico, sendo, portanto, denominadas proteínas HLH, as quais atuam como reguladores negativos da atividade de fatores de transcrição bHLH, pois como possuem o domínio de interação proteína-proteína (HLH) são capazes de formar

heterodímeros com outras bHLHs e devido a falta da região básica, impedem a ligação ao DNA (Fairman *et al.*, 1993).

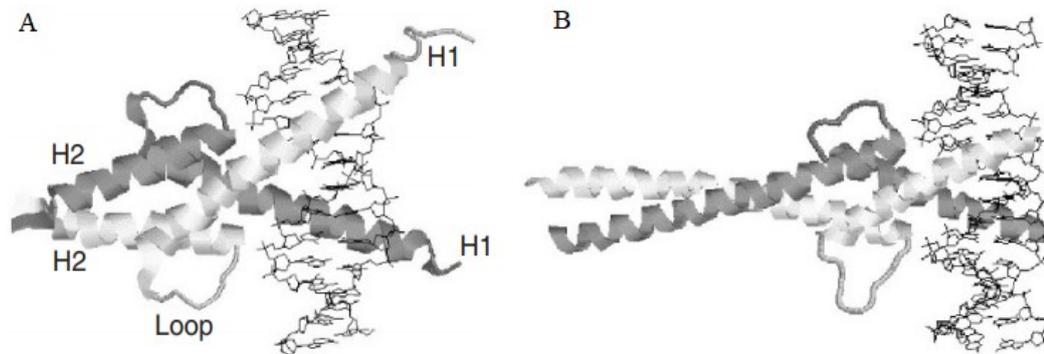


Figura 2: Estrutura das proteínas bHLH. (A) Formação de homodímero ligado ao DNA. (B) Formação de heterodímero ligado ao DNA. H1: Hélice 1, H2: Hélice 2, Loop: volta (Jones-Rhoades & Bartel, 2004).

Em plantas, os membros pertencentes à família bHLH estão relacionados a diversas funções como: respostas hormonais, desenvolvimento do estômato, formação do pelo radicular, respostas a fatores ambientais e a diferentes tipos de estresses (Heim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Xu, Dubos & Lepiniec, 2015). Em arroz, sabe-se que as bHLHs estão relacionadas à formação floral, captação de nutrientes, resposta à seca e crescimento foliar (Li *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). Sabendo da importância dessa família de fatores de transcrição e com o intuito de caracterizar vias de transdução de sinal responsivas ao acúmulo de H_2O_2 , nosso grupo passou a estudar um membro específico desta família, anotado como *OsbHLH35* (LOC_Os01g06640). Inicialmente foi realizado um ensaio de mono-híbrido em levedura, com o objetivo de identificar quais fatores de transcrição estão envolvidos na regulação de *OsbHLH35*. Através deste ensaio foram identificados três membros da família de fatores de transcrição GRF (*Growth Regulating Factor*), os fatores de transcrição GRF3 (LOC_Os04g51190), GRF4 (LOC_Os02g47280) e GRF11 (LOC_Os07g28430) como potenciais reguladores transcricionais de *OsbHLH35*. Ensaio de transativação realizados em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* mostraram que o fator de transcrição OsGRF11 atua como um regulador negativo de *OsbHLH35* em arroz (Fig. 3) (Spagnolo-Fonini, 2017).

GRF11 x bHLH035

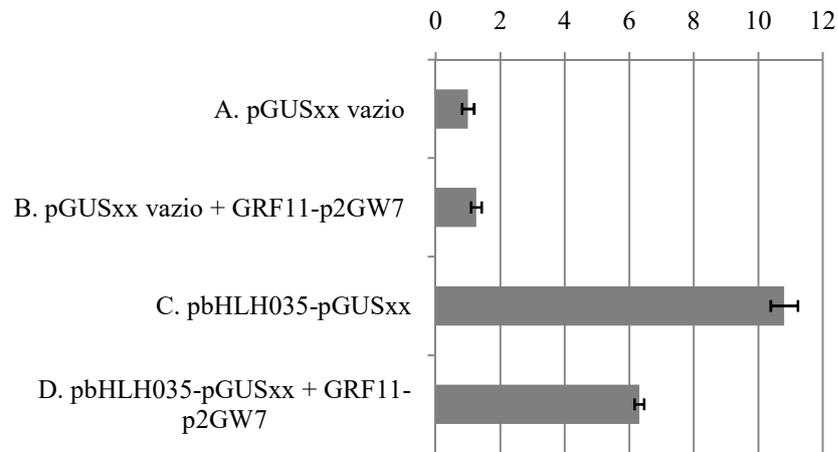


Figura 3 - Experimento de transativação do promotor do gene *Os**bHLH035*** pelo fator de transcrição OsGRF11. (A) Vetor repórter (pGUSxx vazio). (B) Vetor repórter (pGUSxx vazio) e plasmídeo efetor OsGRF11-p2GW7. (C) Plasmídeo repórter (p**OsbHLH35**-pGUSxx). (D) Plasmídeo repórter (pbHLH35-pGUSxx) e plasmídeo efetor (GRF11-p2GW7). (A,B,C,D) Plasmídeo LUC (LUC-p2GW7). * Teste T entre “C” e “D”, com $p < 0,01$ (Spagnolo-Fonini, 2017).

1.5 A FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO GRF (GROWTH-REGULATING FACTOR)

A família de fatores de transcrição GRF é específica de plantas e seus membros exercem funções cruciais no crescimento das plantas, como desenvolvimento de folhas e caules, floração, desenvolvimento de sementes e raízes, controle do crescimento sob condições de estresse e regulação da longevidade da planta (Hewezi & Baum, 2012; Omidbakhshfard *et al.*, 2015). As proteínas GRFs formam complexos com co-ativadores chamados GIF (*Growth-Interacting Factor*) (Kim & Kende, 2004). Nos genomas de plantas terrestres são encontrados 8-20 genes codificadores de GRFs, e 3-5 genes codificadores de GIFs, enquanto que no genoma de algas verdes são apenas encontrados genes codificadores de GIFs (Omidbakhshfard *et al.*, 2015). Em *A. thaliana* foram descritos nove GRFs e em *O. sativa* doze, e ambos possuem 3 genes codificadores de GIFs em seus genomas (Kim & Tsukaya, 2015). Um estudo evolutivo realizado com genes de cinco espécies diferentes, *O. sativa*, *Vitis vinifera*, *A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Pyrus bretschneideri*, subdividiu os GRFs em cinco grupos (I, II, III, IV e V) (Cao *et al.*, 2016). O grupo I contém o maior número de genes, possuindo membros de todas as espécies estudadas, assim como o grupo II e o grupo V. O grupo III é o grupo com menor número de membros, sendo todos encontrados apenas em *O. sativa* (monocotiledôneas). O grupo IV contém apenas membros de *V. vinifera*,

A. thaliana, *P. trichocarpa* e *P. bretschneideri* (dicotiledôneas). Com isso, os grupos III e IV representam um fenômeno de perda e ganho de genes durante o processo evolutivo das plantas terrestres. (Cao *et al.*, 2016).

Os fatores de transcrição GRF são proteínas com peso molecular de 20-60 kDa que apresentam duas regiões muito conservadas, o domínio WRC e o domínio QTL, ambos localizados na região N-terminal da proteína (van der Knaap, Kim & Kende, 2000). O domínio WRC, com resíduos de triptofano-arginina-cisteína a uma distância conservada, contém ~44 aminoácidos, possuindo uma região com três cisteínas e uma histidina (motivo C₃H) com distância entre eles amplamente conservada, que atua como o domínio de ligação ao DNA (Fig. 4A), além disso, o domínio WRC possui muitos aminoácidos básicos, principalmente resíduos de arginina e lisina, que atuam como sinal de localização nuclear (NLS) (van der Knaap, Kim & Kende, 2000; Kim & Tsukaya, 2015). O domínio QLQ com resíduos de glutamina-leucina-glutamina a uma distância conservada, contém cerca de 36 aminoácidos, na sua maioria aminoácidos aromático-hidrofóbicos e ácidos bem conservados, responsáveis por mediar a interação entre GRF e GIF (Fig. 4B) (van der Knaap, Kim & Kende, 2000; Kim & Tsukaya, 2015). Proteínas com domínio QLQ são encontradas em todos os eucariotos, porém o domínio WRC é específico de plantas. Outros domínios são encontrados nas proteínas GRF, na porção C-terminal, denominados FFD, TQL e GGPL, no entanto não são tão conservados e também ainda não tiveram sua função descrita (Omidbakhshfard *et al.*, 2015).

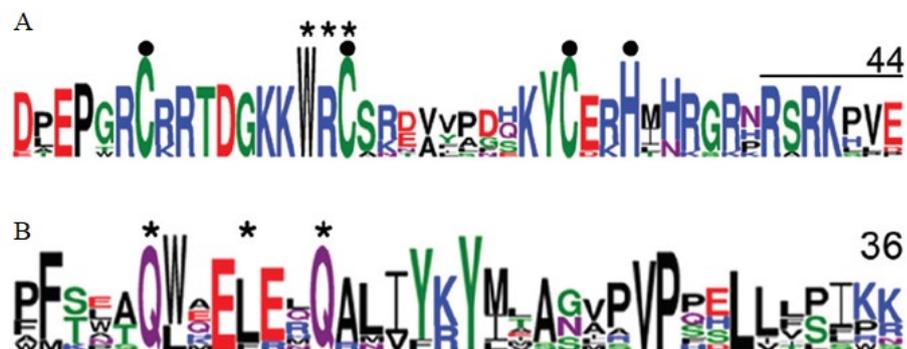


Figura 4: Características estruturais das proteínas GRF. (A) Domínio WRC - triptofano-arginina-cisteína, (B) Domínio QLQ - glutamina-leucina-glutamina. Asteriscos indicam os aminoácidos conservados que designam os nomes dos domínios. Pontos marcam as cisteínas conservadas e resíduos de histidina do motivo C₃H. Os números indicam o número de aminoácidos de cada domínio. A região sublinhada na parte superior do domínio WRC corresponde ao local de mRNA alvo do miR396. Cores verdes: aminoácidos polares; roxo: neutros; azul: básicos; vermelho: ácidos; preto: hidrofóbicos (Kim & Tsukaya, 2015).

Os GRFs são regulados a nível pós-transcricional pela ação do microRNA 396 (miR396), conforme demonstrado em *A. thaliana* (Liu *et al.*, 2009), *O. sativa* (Liu *et al.* 2014) e *P. trichocarpa* (Baucher *et al.*, 2013). O miR396 possui outros alvos além dos GRFs, dentre eles, proteínas do tipo bHLH, demonstrado em *A. thaliana* (AtbHLH74) (Bao *et al.*, 2014), e em *Medicago truncatula* (*MtbHLH79a* e *MtbHLH79b*) (Bazin *et al.*, 2013). Este miRNA foi encontrado em todas as plantas terrestres, exceto em musgos, indicando uma origem ancestral, logo após o surgimento dos GRFs (Cuperus, Fahlgren & Carrington, 2011). O miR396 de *A. thaliana* é codificado por dois genes distintos (AT2G10606 e AT5G35407) e é capaz de regular os níveis de transcritos de sete dos nove GRFs encontrados nesta espécie (Jones-Rhoades, Bartel & Bartel, 2006). Em arroz, o miR396 regula todos os GRFs a nível pós-transcricional, com exceção do OsGRF11 (Liu *et al.*, 2014). O miR396, juntamente com OsGRF4 e OsGIF1, determinam o tamanho de grão em arroz, além disso, foi demonstrado que a regulação do miR396 sobre os OsGRF6 e OsGRF10 tem função na organogênese floral em arroz (Li *et al.*, 2016). Devido à função de GRFs em arroz, de *OsGRF11* não ter sido descrito na literatura e ser um dos reguladores da transcrição de *OsbHLH35*, este se tornou alvo de nosso estudo. Sendo assim, com o propósito de estudar *in vivo* a função dos genes *OsbHLH35* e *OsGRF11*, plantas de arroz superexpressando os genes separadamente foram geradas previamente pelo nosso grupo através da transformação de calos embriogênicos de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando o vetor de superexpressão específico para monocotiledôneas, pANIC6A e pANIC6B (Spagnolo-Fonini, 2017).

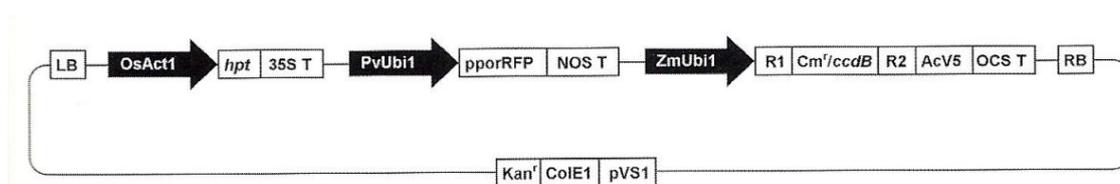


Figura 5: Representação do vetor pANIC6A segundo Mann *et al.* (2011). LB: *left border*; OsAct1: promotor do gene actinal de arroz; *hpt*: gene de resistência à higromicina; 35S T: terminador do gene CaMV 35S; PvUbi1: promotor do gene ubiquitinal de *Panicum virgatum*; pporRFP: sequência do gene codificador de RFP (*Red Fluorescent Protein*); NOS T: terminador do gene nopalina sintase; ZmUbi1: promotor do gene ubiquitinal de milho (*Zea mays*); R1 e R2: sites de recombinação; Cm^r/*ccdB*: gene de resistência a cloranfenicol e gene marcador induzível; AcV5: sequência de epítipo tag; OCS T: terminador do gene octopina sintase; RB: *right border*; Kan^r: gene bacteriano de resistência a Kanamicina; ColE1: origem de replicação (*E. coli*); pVS1: origem de replicação (*Agrobacterium*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar funcionalmente o fator de transcrição *OsHLH35* em plantas de arroz, assim como avaliar a regulação de *OsGRF11* sobre o gene *OsHLH35* em um sistema *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar molecularmente as plantas superexpressando os genes *OsHLH35* e *OsGRF11* separadamente, para confirmar a superexpressão das plantas obtidas;
- Analisar fenotipicamente as plantas superexpressando o gene *OsHLH35* ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento da planta;
- Gerar plantas transgênicas de arroz expressando o gene repórter *GUS* sob controle do promotor *OsHLH35*;
- Analisar o padrão de expressão do promotor *OsHLH35* ao longo do desenvolvimento da planta, a fim de identificar os tecidos e órgãos nos quais este gene é expresso;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Cerca de 10 sementes de arroz de cada linhagem superexpressando *Os**b**HLLH35* e *OsGRF11* foram germinadas em meio MS com higromicina 50 mg/L por duas semanas, transferidas para substrato orgânico suplementado com o fertilizante Osmocote® 15-09-12 em regime de inundação e cultivadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 14h luz e 10h de escuro, a 28 °C.

3.2 ANÁLISE DA TRANSGENIA E EXPRESSÃO GÊNICA

3.2.1 Extração de DNA

Amostras de 2 cm de folha de cada linhagem transgênica de plantas de arroz possivelmente superexpressando os genes *Os**b**HLLH35* e *OsGRF11* foram distribuídos em microtubos com 100 µL de solução de lise (EDTA 50 mM pH 8, Tris-HCl 50 mM pH 8, 0,2% v/v SDS) e incubados em banho à 100 °C por 10 minutos. A solução aquosa, foi transferida para um novo microtubo e diluída em água estéril para o volume final de 1 mL.

3.2.2 Confirmação da inserção do transgene por PCR

A reação de amplificação foi realizada a partir de amostras de DNA extraído do material vegetal descrito no tópico anterior, 200 µM de cada dNTP, tampão de PCR 1 X (20 mM Tris-HCl pH 8.4), 1,5 mM MgCl₂, 8 pmol de cada oligonucleotídeo e 0,25 U de Taq *DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific®) em uma reação com volume final de 25 µL. Para amplificação do gene *Hpt*, foram utilizados os oligonucleotídeos *Hpt1* (5' GAGCCTGACCTATTGCATCTCC 3') e *Hpt2* (5' GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG 3'). A ciclagem da PCR foi de [1x] 94 °C 5 min e [30x] 94 °C 30s, 62 °C 30s, 72 °C 45s e [1x] 72 °C 4 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc).

3.2.3 Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada por meio do reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific®), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Foram coletadas amostras de 100 mg de folha de uma planta por linhagem, maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 1 mL do reagente e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a adição de 200 µL de clorofórmio PA, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo onde foi adicionado isopropanol PA em uma proporção 1:1 para a precipitação do RNA e incubada por 10 minutos a -20 °C. Após a centrifugação das amostras a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C, o RNA precipitado foi lavado em etanol 75% e posteriormente ressuscitado em 30 µL de H₂O estéril. A quantificação do RNA das amostras foi realizada utilizando o NanoDrop™ *Lite Spectrophotometer* e a integridade do RNA foi verificada através de gel de agarose 0,8% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc).

3.2.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific®) segundo instruções do fabricante. Para tal, foi utilizado RNA com 2 µg total, 1 µg de oligo dT, 500µM de cada dNTP e H₂O para o volume final de 13 µL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e em seguida colocadas no gelo. Após, foi adicionado o tampão *First Strand Buffer* 1X (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂), 100 mM M de DTT e 200 U de da enzima, a reação consistiu em 50 minutos a 37 °C e inativação da enzima por 15 minutos a 70 °C.

3.2.5 RT-qPCR

A análise da expressão relativa dos genes foi realizada através de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando o produto de síntese de cDNA como molde da reação e primers específicos listados na Tabela 1. As reações, com volume final de 25 µL, foram compostas de tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4), 200 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 200 nM de cada oligonucleotídeo, 4 uL de SYBR Green 1X, 1 U de Taq *DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific®) e 12,5 uL de amostra de cDNA em diluição de 100

X. A reação de RT-qPCR consistiu em [1x] 94 °C por 5 minutos, [40x] 94°C por 15 segundos, 60 °C por 10 segundos e 72 °C por 15 segundos. A leitura da fluorescência do SYBR foi obtida ao fim de cada um dos 40 ciclos. A curva de desnaturação (T_m) foi realizada com 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 2 minutos e com leituras a cada aumento de 0,4 °C até os 95°C. As reações foram realizadas com quatro repetições experimentais e a avaliação da expressão relativa foi realizada de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Todas estas reações foram realizadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Tabela 1: Lista de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

<i>OsHHLH35</i>	F: 5' ATGGACAAGGCCACCT 3'
	R: 5' ATCCACAGCGAGGCTGAACCAG 3'
<i>OsGRF11</i>	F: 5' TATATGGCTGCCCCGTGTG 3'
	R: 5' AAGTACCCGACATTGATGGGGTT 3'
<i>OsFDH</i>	F: 5' CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC 3'
	R: 5' TTCCAATGCATTCAAAGCTG 3'
<i>OseF-1a</i>	F: 5' TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT 3'
	R: 5' GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA 3'

3.3 CLONAGEM DO PROMOTOR DE *OsHHLH35*

A amplificação do promotor de *OsHHLH35* foi realizada através de PCR usando como molde duas amostras de DNA genômico de diferentes plantas de arroz tipo selvagem cv. *Nipponbare*. Oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar uma região de 1104 pb à montante do códon de início da tradução do gene. A reação foi composta de tampão Q5 *Reaction Buffer* 1X, 200 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,5 U de Q5® *Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* e 1 μ L de DNA genômico. A reação de PCR consistiu em [1x] 98 °C por 30s, [30x] 98 °C 10s, 67 °C 30s, 72 °C 60s e [1x] 72°C 2 min. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 0,8 % corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc) e purificado através do Kit purificação de DNA em banda de gel (Ludwig Biotec®) segundo instruções do fabricante. Após a quantificação das amostras, a região amplificada do promotor de *OsHHLH35* foi clonada no vetor de entrada o pENTR™ TOPO® (Thermo Fisher Scientific®), compatível com o sistema de clonagem Gateway®, por

meio de reação contendo entre 5 a 10 ng de DNA, 0,5 µL de solução salina, 1 µL de H₂O e 0,5 µL do vetor, incubada a temperatura ambiente por 30 minutos.

Células de *E. coli* DH5α termocompetentes foram transformadas com o produto da reação de ligação em pENTR™ TOPO® por meio de protocolo de transformação de *E. coli* por choque térmico. O produto da PCR foi adicionado ao tubo contendo as células termocompetentes, mantidas no gelo por 10 min, incubadas à 42°C por 30 s e plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo o antibiótico de seleção kanamicina na concentração de 50 mg/L. Quatro colônias de possíveis transformantes foram obtidas e inoculadas em meio LB líquido com kanamicina 50 mg/L e incubadas a 37 °C com agitação por 16-18h. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura bacteriana foi utilizada para a purificação do plasmídeo com o Kit de purificação de DNA plasmidial (Ludwig Biotec®) e posterior análise. Para confirmar se a sequência do promotor inserida no plasmídeo não sofreu alterações durante o processo de amplificação e clonagem, foi realizada PCR com os *primers* específicos para a região promotora de *OsbHLH35*, clivagem com as enzimas de restrição ApaLI (NEB®) e sequenciamento na ACTGene Análises Moleculares (Ludwig Biotec®). Após a confirmação da inserção da sequência correta do promotor de *OsbHLH35* no vetor de entrada, o DNA plasmidial foi utilizado para clonagem por recombinação no vetor de destino pHGWFS7 (Fig. 5). A reação de recombinação foi realizada através da enzima LR Clonase™ II Enzyme mix a 25 °C *overnight*. Após esse período foi adicionada à reação a enzima Proteinase K (MERK) e incubada a 37 °C por 10 minutos a fim de parar a reação da clonase. Em seguida, células de *E. coli* termocompetentes foram transformadas e crescidas em meio LB sólido com antibióticos de seleção do vetor de destino estreptomicina/espectinomicina 100 mg/mL.

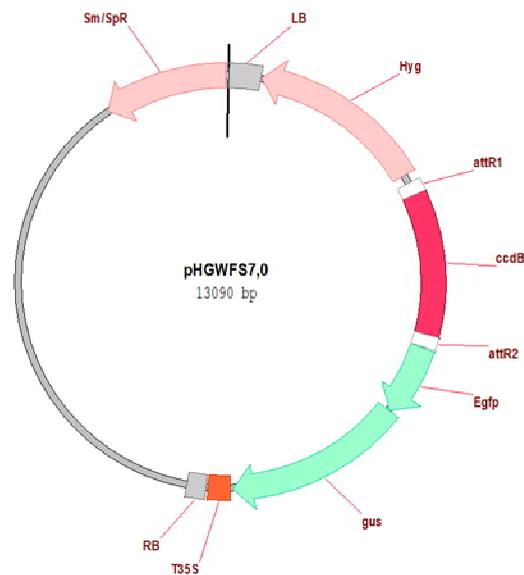


Figura 6: Representação gráfica do vetor pHGWSF7. LB: *left border*; Hyg: gene de resistência a higromicina; attR1 e attR2: sites de recombinação; *ccdB*: gene marcador induzível; *Egfp*: sequência do gene codificador de GFP (*Green Fluorescent Protein*); *gus*: gene codificador da β -glucuronidase; T35S: terminador do gene CaMV 35S; RB: *right border*; Sm/SpR: gene bacteriano de resistência a espectinomicina/ estreptomicina;

As colônias de possíveis transformantes foram lançadas em meio LB Líquido e após a purificação do plasmídeo, o DNA plasmidial foi transformado em células de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 eletrocompetentes, para posterior transformação de calos embriogênicos de arroz.

3.4 TRANSFORMAÇÃO DE CALOS DE ARROZ

3.4.1 Indução e cultivo de calos embriogênicos

Setenta sementes de arroz (*Oryza sativa*) cv. Nipponbare foram descascadas e desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 4% por 30 minutos e lavadas por 4 vezes em água destilada estéril em condições assépticas. As sementes foram plaqueadas em meio de cultura N6D (descrito no ANEXO), mantidas por 6 a 8 semanas em sala de cultivo *in vitro* com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro à 25 °C. O após esse período os calos foram transferidos para novo meio de subcultivo NB (descrito no ANEXO), e mantidas no escuro a 24 °C, repicados a cada quatro semanas por três meses.

3.4.2 Transformação dos calos

Calos com aspecto saudável (coloração clara) foram selecionados para a transformação e repicados 5 dias antes da transformação. A *Agrobacterium tumefaciens*, foi obtida após 48h de crescimento em meio LB líquido contendo rifampicina 100 mg/L e espectinomicina 100 mg/L. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e o precipitado bacteriano foi ressuspensionado em meio NB líquido contendo acetoseringona 1 ml/L. Os calos ficaram submersos na suspensão de meio líquido NB (descrito no ANEXO) com agrobactéria e acetoseringona por 10 minutos, a 28 °C, sob agitação leve. Em seguida a solução foi descartada e os calos foram incubados em meio NB sólido com acetoseringona (descrito no ANEXO) por 2 dias no escuro a 25 °C. Após esse período de co-cultivo, a lavagem dos calos foi realizada com H₂O estéril e o antibiótico timentina 150 mg/L por quatro vezes e plaqueados em meio NB contendo higromicina 50mg/L, timentina 150 mg/L e cefotaxina 100 mg/L, mantidos a 28 °C no escuro por 3-5 semanas.

Os calos selecionados foram transferidos para o meio de regeneração (descrito no ANEXO) por 30 dias, a 25 °C com 12/12h de claro/escuro. Após o crescimento de folhas e raízes, as plântulas foram transferidas para frascos contendo meio MS com higromicina 50 mg/L por 2 semanas, 25 °C com 12/12h de claro/escuro. Após esse período as plantas foram transferidas para recipientes contendo substrato orgânico e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro a 28 °C, em substrato orgânico suplementado com o fertilizante Osmocote® 15-09-12 em regime de inundação.

3.5 ENSAIO HISTOQUÍMICO

Para a observação da coloração de GUS nas linhagens transgênicas amostras de folha da plantas jovens e adultas, plântulas (parte aérea e raiz), e panículas em diferentes estágios de desenvolvimento, de cada uma das linhagens obtidas, foram incubados em solução X-Gluc à 37 °C, no escuro por 24h-48h. A solução X-Gluc consistiu em 100 g de X-Gluc; 2,79 g de Na₂HPO₄; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 7,0; 192 µL de Triton X-100; 0,12 g de K₃Fe(CN)₆; 40 mL de metanol PA e 145 mL de H₂O destilada, pH ajustado para 7,0 com NaH₂PO₄.

3.6 TESTE DE VIABILIDADE DE PÓLEN

Flores de cada linhagem de plantas superexpressando *OsbHLH35* e NT foram coletadas e colocadas em solução de fixação (álcool PA e ácido acético PA, proporção de 3:1) por 2h. Após a fixação, as anteras foram removidas da flor e maceradas para liberação do pólen em lâminas de microscópio. As anteras foram coradas com fucsina ácida e em seguida observadas em microscópio óptico, segundo o método de Alexander (1980).

3.7 MORFOLOGIA DA FLOR

Panículas em estágio de pré-antese foram coletadas de cada linhagem de plantas superexpressando *OsbHLH35*, e com auxílio de pinça e agulha histológica as espiguetas foram destacadas, a pálea e a lema removidas e as partes reprodutivas da flor foram observadas em microscópio, as imagens foram obtidas com estereomicroscópio Leica M165 FC e câmera digital Leica DFC 500.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS PLANTAS SUPEREXPRESSANDO OS GENES *OsbHLH35* E *OsGRF11*

Foram geradas previamente a este trabalho 4 linhagens e 13 plantas potencialmente transformadas com o cassete de expressão de *OsbHLH35* e 7 linhagens e 13 plantas com o cassete de expressão de *OsGRF11*. Todas as plantas das quatro linhagens *OsbHLH35* foram positivas para a presença do transgene, nas plantas superexpressando *OsGRF11* todas as plantas continham o transgene com exceção da linhagem GRF11_C (Fig. 7).

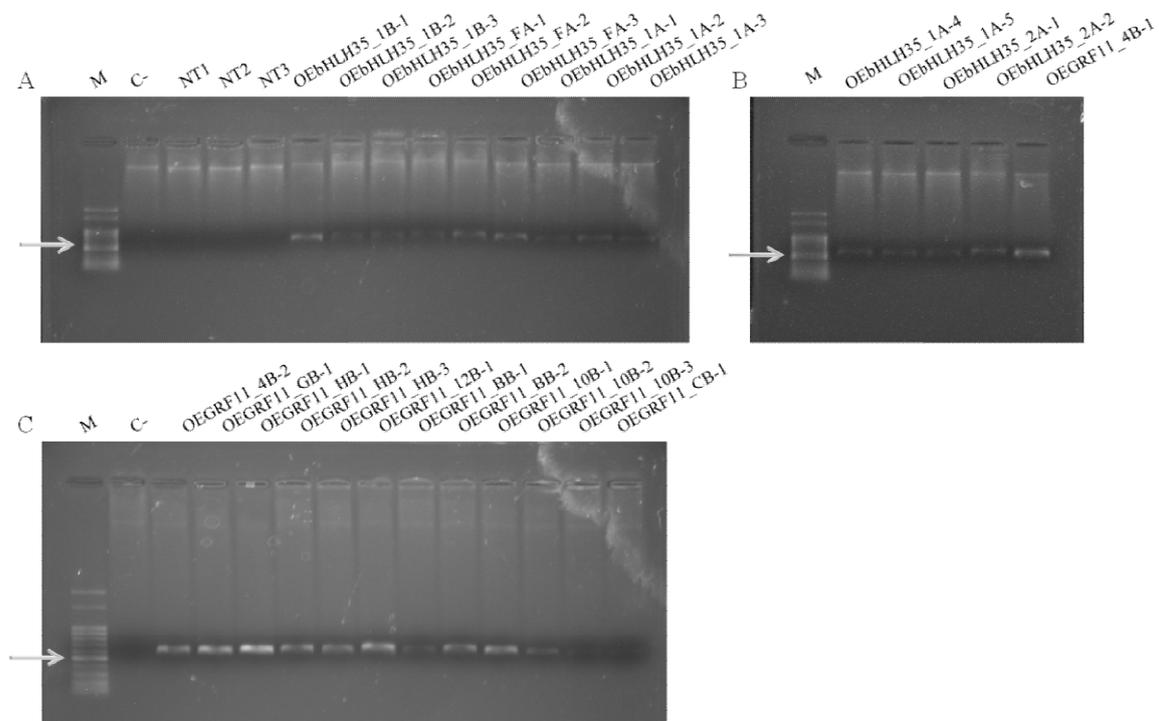


Figura 7: Confirmação da inserção do T-DNA nas plantas de arroz regeneradas. (A, B e C) Análise do produto da amplificação do gene *hpt* em gel de agarose 0,8% corado com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain*. Tamanho do *amplicon* esperado: 453pb. M: marcador de 1 Kb (Ludwig Biotec®); C-: controle negativo (H₂O); NT: plantas não-transformadas; OE: *overexpression*; Identificação das plantas: e. g. 1B-1, linhagem 1B, planta 1.

O resultado da análise da expressão de *OsbHLH35* e *OsGRF11* nas plantas transgênicas demonstrou que a expressão de *OsbHLH35* é de 200 a 500 vezes maior nas linhagens transgênicas do que nas plantas não-transformadas (NT) (Fig. 8A). No que se refere a *OsGRF11*, a superexpressão foi significativa em quatro das cinco linhagens avaliadas, as

quais apresentaram níveis de expressão de 10 a 40 vezes maiores quando comparadas às plantas não-transformadas (Fig. 8B).

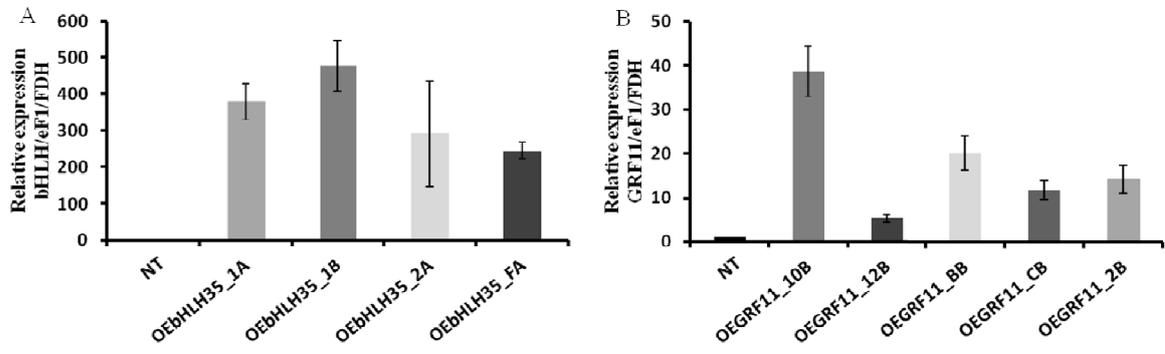


Figura 8: Análise por RT-qPCR da expressão dos genes *OsbHLH35* (A) e *OsGRF11* (B) nas suas respectivas linhagens transgênicas. A quantificação dos transcritos se deu por medida da expressão em uma replicata biológica e quatro replicatas técnicas, normalizada pelos níveis de expressão dos genes de referência *OsFDH* e *OseF-1a*.

4.2 REGULAÇÃO DE *OsGRF11* SOBRE *OsbHLH35*

Ao analisar a expressão do gene *OsbHLH35* nas plantas superexpressando o gene codificador de *OsGRF11*, foi possível confirmar a repressão de *OsGRF11* sobre *OsbHLH35* também em um sistema *in vivo* (Fig. 9).

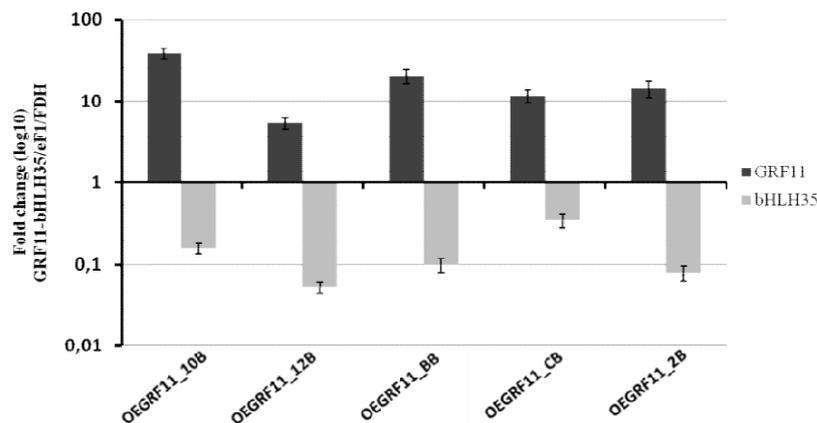


Figura 9: Análise de RT-qPCR do nível de transcrito das plantas de arroz superexpressando *OsGRF11*. Repressão da expressão do gene *OsbHLH35* em cinco linhagens independentes com níveis aumentados de *OsGRF11*. A expressão dos genes nas respectivas plantas transgênicas é relativa à expressão dos mesmos nas plantas NT, representada nesta figura em uma escala logarítmica. Os níveis de transcritos foram normalizados em relação aos níveis de expressão dos genes *OsFDH* e *OseF-1*.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS PLANTAS SUPEREXPRESSANDO O GENE *OsbHLH35*

Não foram observadas diferenças quanto à estatura e demais características morfológicas das plantas transgênicas em relação às plantas NT durante o desenvolvimento vegetativo. No entanto, foi possível observar ao final da fase reprodutiva uma redução na produção de sementes (Fig. 10C), além do fenótipo de pálea e lema abertas nas plantas transgênicas (Fig. 10B), enquanto que as plantas NT apresentavam desenvolvimento normal do grão (Fig. 10A).



Figura 10: Análise fenotípica de panículas de plantas de arroz superexpressando *OsbHLH35* em aspecto geral e detalhe. (A) Panícula de planta NT com desenvolvimento normal dos grãos; (B, C) panículas de duas linhagens independentes de *OsbHLH35* exibindo desenvolvimento atípico, apresentando sementes maduras e flores não fecundadas, além de pálea e lema abertas (indicadas pelas setas).

Contabilizando a proporção de sementes desenvolvidas e não desenvolvidas em cada um dos genótipos, foi possível verificar que a superexpressão de *OsbHLH35* levou a uma redução de 42% a 74% nas linhagens transgênicas, apresentando uma redução média de 60% da produção de sementes nos genótipos avaliados (Fig. 11).

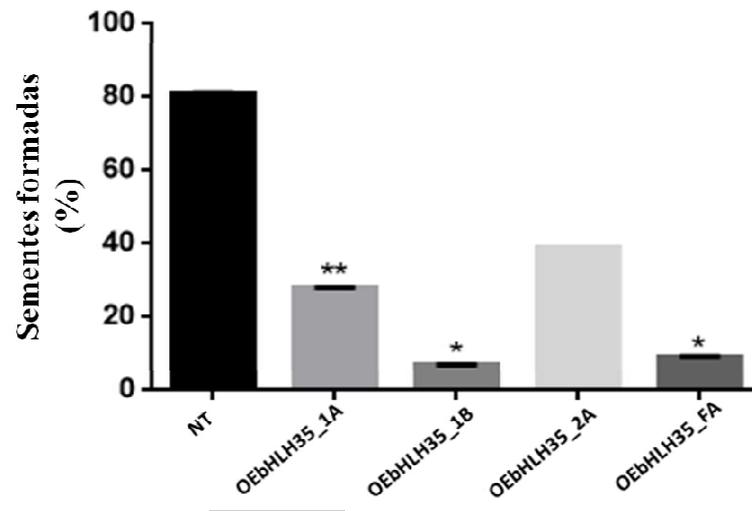


Figura 11: Análise quantitativa da produção expressa pelo número de sementes produzidas sobre o número total de espiguetas de plantas NT (n= 2 plantas) e de quatro linhagens independentes de plantas superexpressando *Os bHLH35* (n= 10; 1A n=4, 1B n=2, 2A n=1, FA n=3). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student com auxílio do software SPSS v16 ($p \leq 0,05$).

Sabendo da redução na produção de sementes nas plantas superexpressando *Os bHLH35* e a fim de descobrir qual parte do desenvolvimento floral estava sendo afetada pela superexpressão deste gene, realizou-se uma análise qualitativa do pólen produzido nos genótipos transgênicos e NT. Embora a quantidade de pólen não tenha sido contabilizada, é possível observar através das imagens que há presença de grãos de pólen potencialmente viáveis nas plantas *Os bHLH35*, assim como nas plantas NT (Fig. 12).

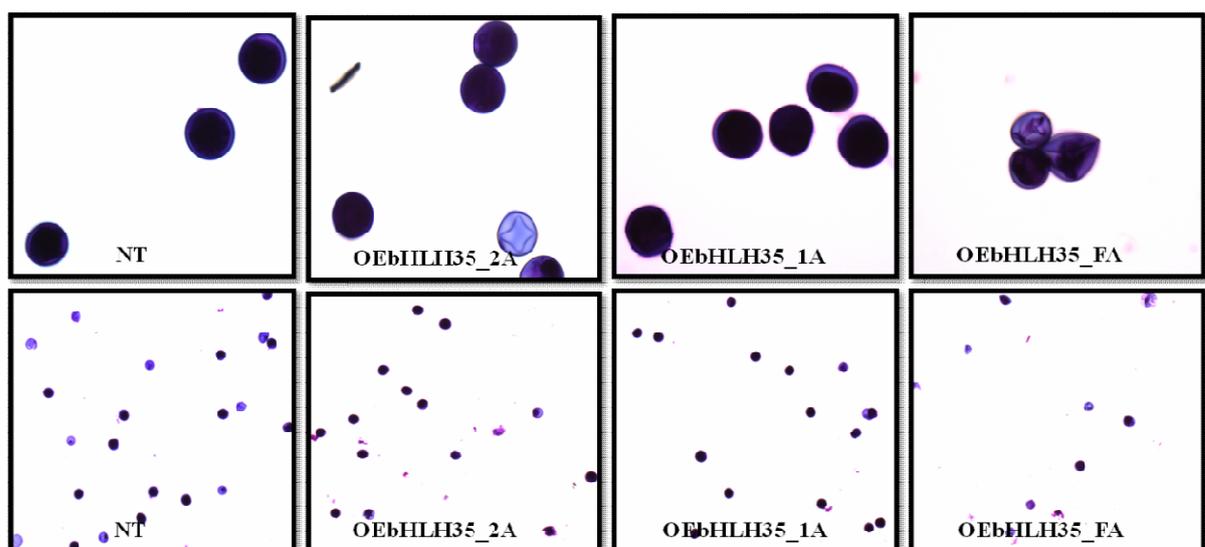


Figura 12: Análise de lâminas com material polínico por microscopia óptica. Viabilidade do pólen em NT e em três linhagens independentes superexpressando *Os bHLH35*, corados com fucsina ácida e observados nos aumentos de 40x e 400x .

A análise da flor das plantas transformadas e das plantas NT através de estereomicroscopia demonstrou que as anteras das flores das plantas superexpressando *Os**h**HLH35* possuem uma curvatura acentuada, diferentemente das anteras das plantas NT, que possuem aspecto retilíneo (Fig. 13).

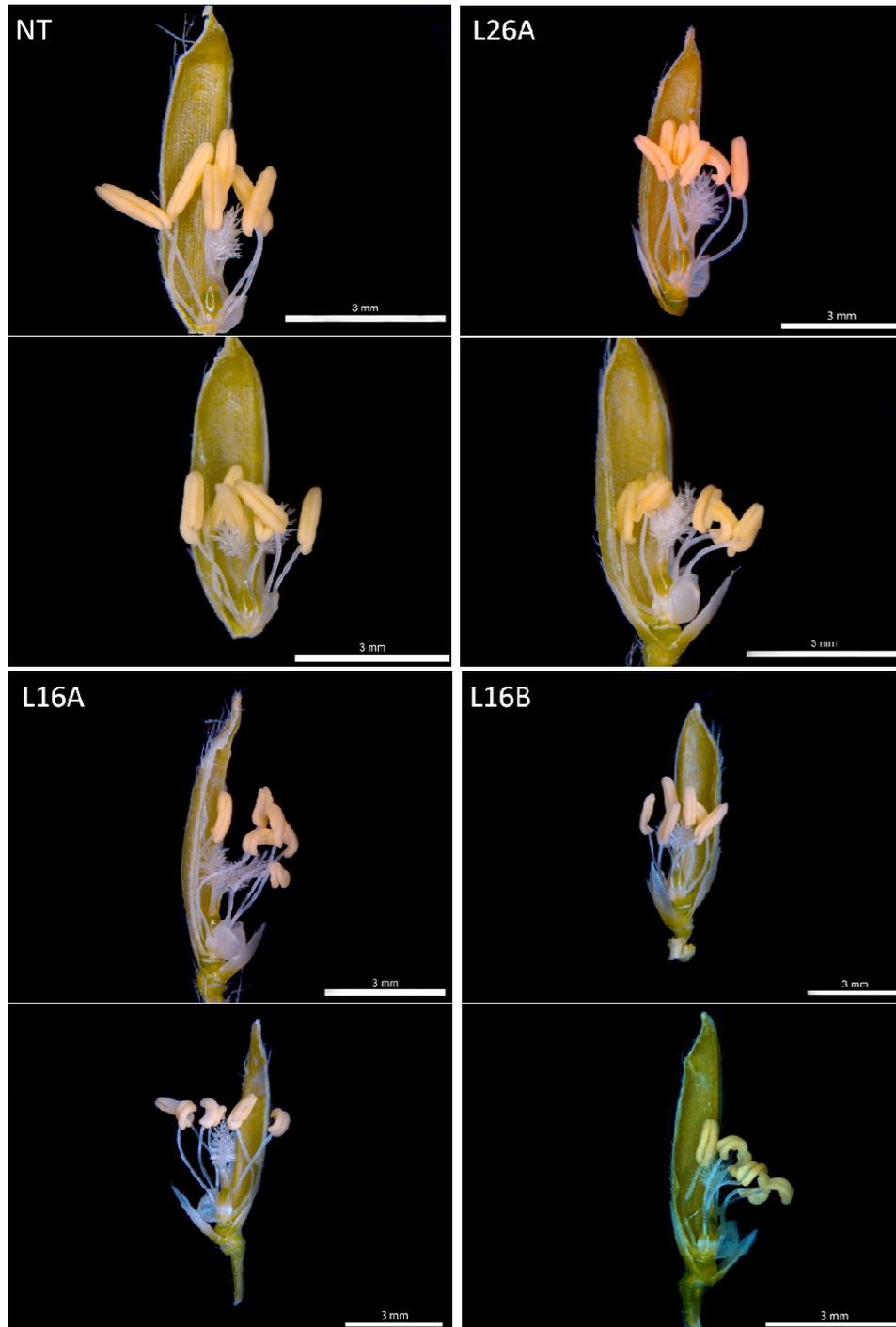


Figura 13: Flores de plantas NT e três linhagens independentes de plantas transgênicas superexpressando *Os**h**HLH35* (L26A, L16A e L16B). As imagens foram adquiridas em estereomicroscópio Leica M165 FC, com câmera digital Leica DFC 500 acoplada e o software Montage do Leica Application Suite v.4.6. Imagens obtidas em aumento de 25x.

4.4 PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *OsbHLH35*

O processo de transformação para obter plantas com o promotor de *OsbHLH35* dirigindo a expressão da β -Glucuronidase resultou em 21 linhagens de calos transgênicos, e destes, 30 plantas foram regeneradas, de 7 linhagens transgênicas independentes (Fig. 14).



Figura 14: Geração de plantas transgênicas para o estudo do promotor do gene *OsbHLH35*. Imagens representativas de: (A) calos transgênicos selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico Higromicina; (B) regeneração dos calos transgênicos em plântulas; (C) cultivo e nova seleção da planta regenerada em meio de cultura contendo Higromicina; e (D) plantas regeneradas e cultivadas em substrato orgânico.

Todas as plantas regeneradas, das quatro linhagens analisadas, foram positivas para a presença do transgene (Fig. 15).

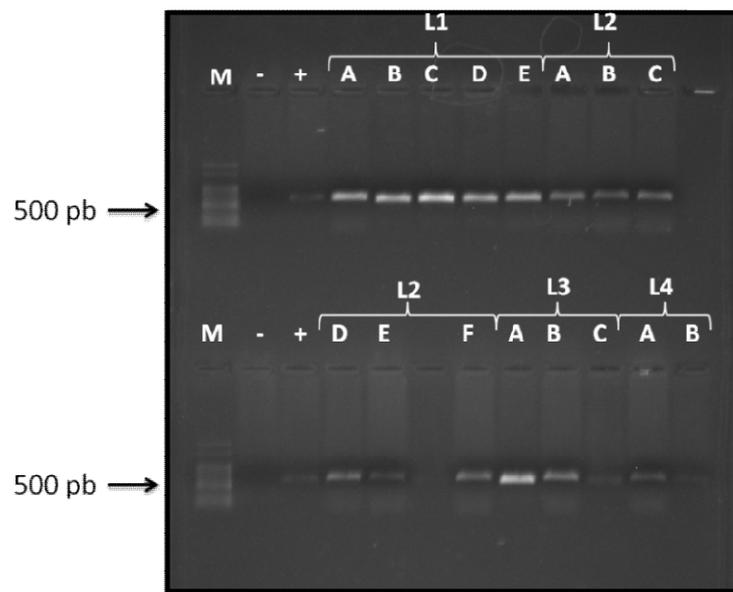


Figura 15: Confirmação da transgenia das plantas transformadas através da análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da amplificação de fragmento do gene *hpt*. Tamanho do *amplicon* esperado: 453pb. M: marcador de 1 Kb (Ludwig Biotec®); (-): controle negativo (H₂O); (+): controle positivo (amostras de DNA de plantas transgênicas contendo o gene *hpt*).

Amostras dos calos selecionados foram incubadas em solução de X-Gluc, dentre as 21 linhagens, apenas duas não apresentaram atividade de β -glucuronidase (Fig. 16). Nas demais linhagens foi possível observar uma diferença no nível de coloração dos calos, que pode estar relacionada ao ponto de inserção do T-DNA nos genomas, estando sob o efeito de *enhancers*, regiões de cromatina condensada, entre outros reguladores transcricionais. Para descartar o efeito de posição da inserção do transgene, apenas foram considerados padrões observados em pelo menos duas linhagens independentes no mesmo estágio de desenvolvimento.

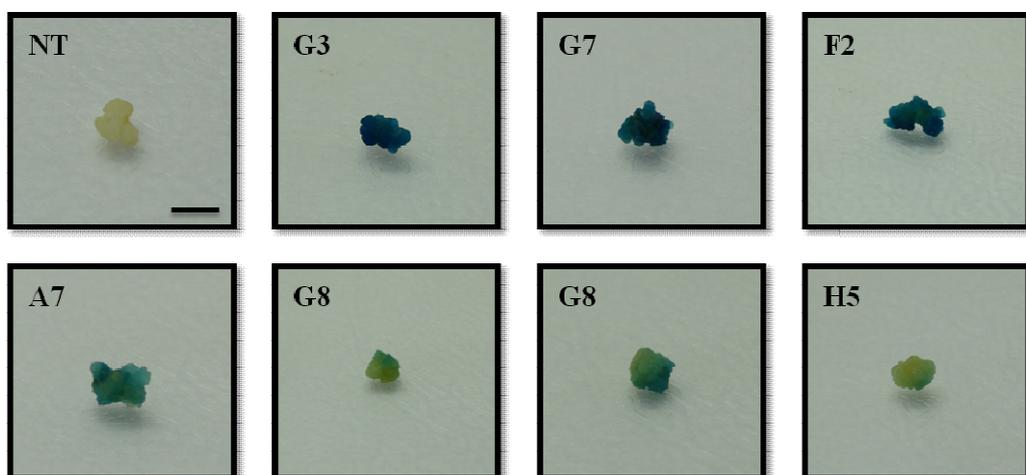


Figura 16: Marcação histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase em calos transgênicos de seis linhagens independentes de arroz. Escala: 2 mm.

Para dar seguimento à análise do promotor, folhas e raízes de plantas de 15 dias, regeneradas a partir de linhagens com calos GUS-positivos, foram incubadas em solução X-Gluc. A ausência de marcação histoquímica nestas amostras indica que *Os**b**HLLH35* não é expresso de maneira significativa nestes órgãos, neste estágio de desenvolvimento. Quando as plantas entraram na fase reprodutiva, panículas em diversos estágios de desenvolvimento foram incubadas em solução de X-Gluc, por meio da qual foi possível observar coloração de GUS nas anteras (Fig. 17A), na pálea e lema (Fig. 17B), primórdios florais (Fig. 17C) e ovário (Fig. 17D). Todas as marcações descritas foram observadas em pelo menos duas linhagens independentes.

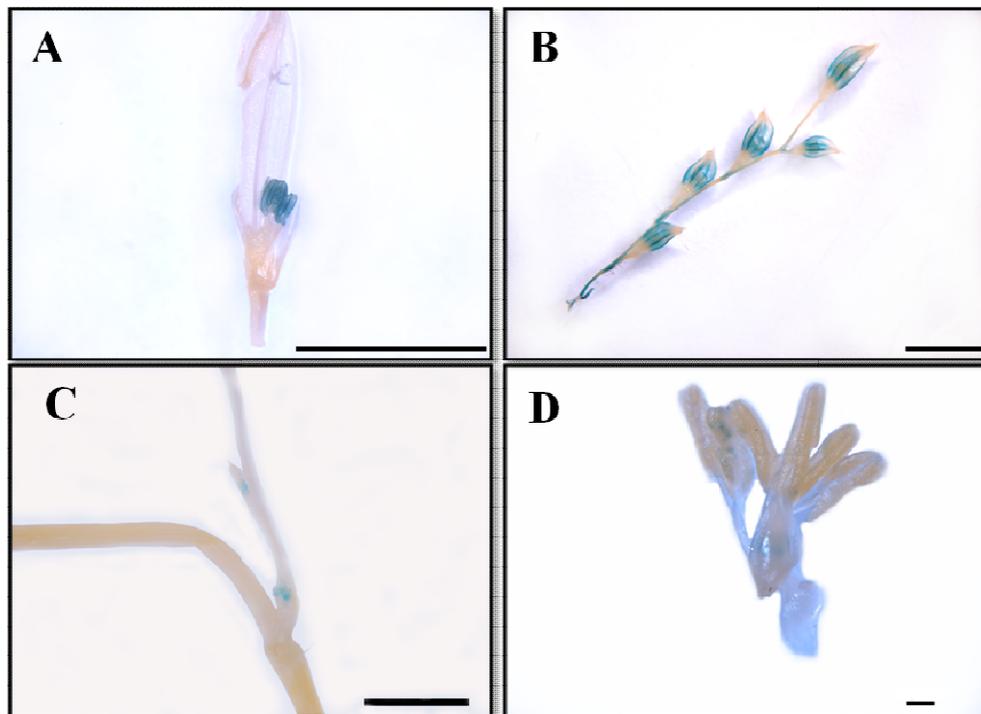


Figura 17: Padrão de expressão de GUS dirigido pela sequência promotora do gene *Os**b**HLLH35* em (A) antera jovem, (B) pálea e lema no estágio inicial de desenvolvimento (C) primórdios florais (escalas: 3 mm) e (D) ovário (escala: 0,5 mm).

4.5 EXPRESSÃO DE GENES EM PANÍCULAS DE ARROZ

A análise comparativa do perfil de expressão de *Os**b**HLLH35* e de seu regulador transcricional *Os**G**RF11* ao longo do desenvolvimento da panícula, através das amostras de quatro estágios do desenvolvimento da panícula de arroz (R3, R4, R5 e R7) por RT-qPCR, demonstrou que a expressão de *Os**G**RF11* na panícula é cerca de 10 vezes maior que a expressão do gene *Os**b**HLLH35* em todos os estágios avaliados, indicando a expressão deste

último deve ser atenuada nas panículas pelos altos níveis de expressão do seu repressor (Fig. 18).

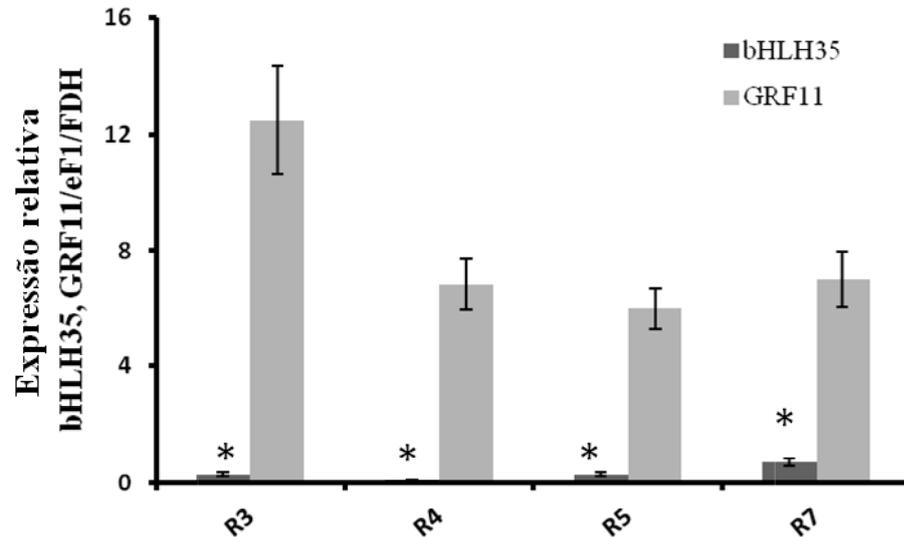


Figura 18: Análise de RT-qPCR do nível de transcrito dos genes *OsBHLH35* e *OsGRF11* nos estágios R3, R4, R5 e R7 do desenvolvimento de panículas de plantas de arroz NT. As médias de cada tratamento foram determinadas a partir três replicatas biológicas e quatro replicatas técnicas. Os níveis de transcritos foram normalizados em relação aos níveis de expressão dos genes *OsFDH* e *OseF-1*. Os estágios R3, R4, R5 e R7 foram identificados segundo a caracterização realizada por Counce et al. (2000, anexo 2). A estatística foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey, com significância de $p \leq 0,05$ com auxílio do software SPSS v16.

5 DISCUSSÃO

A superexpressão de *Os**b**HLLH35* aliada à análise do seu padrão de expressão permitiu investigar em maior detalhe a função deste fator de transcrição, até então pouco estudado, durante o desenvolvimento floral do arroz. Além disso, por meio da superexpressão de *OsGRF11* foi possível avaliar a ação regulatória deste gene sobre *Os**b**HLLH35* *in vivo*. Portanto, elucidar a função de *Os**b**HLLH35*, e além disso, confirmar a presença de reguladores *upstream* à *Os**b**HLLH35* *in vivo* é o primeiro passo para entender como esse fator de transcrição interage com a complexa rede de genes envolvidos na formação floral.

A caracterização molecular das linhagens superexpressando *Os**b**HLLH35* ou *OsGRF11* foi a primeira etapa da análise realizada. Apesar das plantas superexpressando *Os**b**HLLH35* não apresentarem diferenças significativas durante a fase vegetativa quando comparadas às plantas NT, na fase reprodutiva observou-se que as plantas superexpressando *Os**b**HLLH35* produziam significativamente menor número de sementes em relação às plantas NT (Fig. 11). Ao analisar o aspecto geral das panículas, diferenças foram observadas entre as linhagens transgênicas, enquanto as panículas das plantas NT apresentam desenvolvimento uniforme. As panículas de plantas superexpressando *Os**b**HLLH35* apresentam em uma mesma panícula flores não fecundadas (em grande número) e sementes maduras (em menor número), além disso, as flores que foram fecundadas e produziram sementes com fenótipo de pálea e lema abertas (Fig.10), diferente das panículas das plantas NT.

Ao analisar as flores nos estágios finais do desenvolvimento floral, notou-se uma diferença significativa entre as anteras das plantas superexpressando *Os**b**HLLH35* e NT, com as anteras das plantas transgênicas apresentando tamanho diminuído, aspecto curvo e pigmentação reduzida (Fig. 13). Apesar de este fenótipo ter sido observado de maneira consistente em todas as linhagens analisadas, algumas flores apresentavam anteras aparentemente normais. As demais estruturas da flor, como pálea e lema, lema estéril e lodículos apresentaram aspecto semelhante às das flores das plantas NT. É interessante ressaltar que a *Os**b**HLLH35* foi identificada em plantas com níveis de peróxido de hidrogênio aumentados, indicando que *bHLLH35* pode participar de alguma forma da via de homeostase redox (Ribeiro et al., 2012). Trabalhos anteriores já demonstram o efeito de níveis alterados de ERO no desenvolvimento floral de arroz (Hu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017) e em *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2014). Sabendo do envolvimento de *Os**b**HLLH35* com as vias de resposta ao peróxido de hidrogênio, pode-se hipotetizar que as alterações encontradas sejam decorrência de modificações na sinalização redox nestes tecidos. Para avaliar esta hipótese,

uma análise de expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na homeostase redox nos estágios de desenvolvimento da antera, como glutathione S-transferases, peroxidases deverá ser realizada. Trabalhos prévios de outros grupos já relataram outras bHLHs envolvidas no desenvolvimento do pólen, tal como UDT1 (*Undeveloped Tapetum1*), que atua na diferenciação das células parietais secundárias. Essas células são essenciais para a maturação das células do tapete. Plantas de arroz com a expressão suprimida desse gene demonstraram fenótipo de macho-esterilidade completa (Jung *et al.*, 2005). A bHLH denominada TDR (*Tapetum Degeneration Retardation*) tem papel crítico na formação da parede de pólen, estando relacionada ao metabolismo alifático, uma vez que a parede do pólen é responsável por secretar os lipídios precursores da formação de exina, que confere maior resistência ao pólen a estresses bióticos e ambientais. Plantas de arroz mutantes apresentaram uma alteração significativa na composição dos lipídios necessários para a formação da exina na antera, e com isso a viabilidade do pólen foi severamente afetada (Meuter-Gerhards, Riegert & Wiermann, 1999; Zhang *et al.*, 2008). O fenótipo de má-formação da antera também foi observado em plantas superexpressando o gene *Os bHLH142*, que resultou em plantas de arroz macho-estéril em razão da morte celular programada precoce ocorrida nas células do tapete. Da mesma forma que, a perda de função de *Os bHLH142* também levou a problemas no desenvolvimento da antera, uma vez que a ausência deste fator de transcrição mostrou-se suficiente para impedir a morte celular programada das células do tapete (Ko *et al.*, 2014, 2017; Ranjan *et al.*, 2017).

As proteínas do tipo bHLH só exercem sua função como fatores de transcrição quando formam dímeros, ou seja, quando há ligação entre duas proteínas bHLH que formam o complexo de regulação transcricional. As bHLHs possuem um domínio de interação proteína-proteína por meio do qual dimerizam entre si, formando homodímeros (formado pela mesma bHLH), ou heterodímeros (duas bHLHs diferentes) (Heim *et al.*, 2003). Devido a isso, uma das hipóteses levantadas pelo grupo seria de que *Os bHLH35* forme heterodímeros com alguma destas bHLHs já relatadas com envolvimento na formação da antera, e assim, regule genes envolvidos diretamente na formação do pólen, das células do tapete, entre outros. Como os níveis de *Os bHLH35* estão muito altos nas plantas transgênicas, é possível que estejam se formando preferencialmente homodímeros de *Os bHLH35*, impedindo, assim, a formação de heterodímeros que seriam necessários para induzir a expressão de genes envolvidos no correto desenvolvimento da antera, ou mesmo através da formação de homodímeros, controlando a expressão de bHLHs envolvidas na formação floral.

A superexpressão pode gerar fenótipos que não refletem a real função de um gene, uma vez que a expressão ectópica pode levar à ocorrência de fenótipos artificiais. Nesse sentido, a análise da expressão de *OsBHLH35*, por meio de plantas expressando o gene repórter *GUS* sob controle do promotor nativo deste fator de transcrição, nos permitiu complementar os resultados obtidos. A expressão de *OsBHLH35* foi detectada apenas na fase reprodutiva, mais especificadamente na pálea e lema jovens, nos primórdios florais, anteras e no ovário. A coloração de GUS foi observada apenas em anteras jovens, em um estágio muito específico e de curta duração. Esse resultado, aliado ao fenótipo de má-formação observado em plantas que superexpressam *OsBHLH35*, sugere que este fator de transcrição desempenhe um papel fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento, mas que precisa ser reprimido nos estágios mais avançados do desenvolvimento floral.

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram em um sistema *in vitro* que OsGRF11 é repressor de *OsBHLH35* (Spagnolo-Fonini, 2017) e a análise molecular de plantas superexpressando *OsGRF11* nos permitiu confirmar a ação repressora deste fator de transcrição sobre *OsBHLH35 in vivo* (Fig. 9). Além disso, outros estudos já relataram a atividade de GRFs como repressores transcricionais em arroz, *Arabidopsis* e trigo (Kim *et al.*, 2012; Kuijt *et al.*, 2014). Ao analisarmos a expressão de *OsGRF11* e *OsBHLH35* em panículas de plantas de arroz em quatro estágios do desenvolvimento, foi possível observar que *OsGRF11* é em média 10 vezes mais expresso do que *OsBHLH35* (Fig. 18). Devido a isso, levantou-se a hipótese de que a expressão de OsGRF11 seja um importante regulador transcricional de *OsBHLH35* durante o desenvolvimento floral, reprimindo o acúmulo desta bHLH nos estágios mais avançados.

A análise molecular e fenotípica das linhagens transgênicas nos permitiu avançar o conhecimento acerca das funções de *OsBHLH35* e *OsGRF11*, bem como estabelecer uma conexão inédita destes fatores de transcrição com o desenvolvimento floral. Para avançar nesta linha, as perspectivas imediatas deste trabalho são realizar análises relacionadas ao pólen, através de teste de germinação, e contabilização de grãos de pólen viáveis nas plantas NT e superexpressando *OsBHLH35*. Para confirmar o fenótipo observado nas plantas T0, contabilizar as sementes maduras na geração T1, para verificar se o padrão de menor número de sementes maduras se repete; Avaliar a expressão do promotor, para analisar todos os estágios de desenvolvimento da antera e em quais especificadamente *OsBHLH35* é expresso. Analisar cortes histoquímicos das anteras das plantas transgênicas e NT, a fim de observar se houve mudança no tamanho, organização e número de células da antera. As perspectivas futuras deste trabalho são: identificar quais são os genes regulados pelo fator de transcrição

Os**b**H**L**H35 e suas funções e testar se a Os**b**H**L**H35 forma homo ou heterodímeros com outras bHLHs, com o objetivo de descrever como esse gene se insere na rede de genes envolvidos na formação floral de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. P. (1980). A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain technology*, 55(1), 13-18.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), 391-396.
- Atchley, W. R., Terhalle, W., & Dress, A. (1999). Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. *Journal of molecular evolution*, 48(5), 501-516.
- Balthasar, U., & Butterfield, N. J. (2009). Early Cambrian “soft-shelled” brachiopods as possible stem-group phoronids. *Acta Palaeontologica Polonica*, 54(2), 307-314.
- Bao, M., Bian, H., Zha, Y., Li, F., Sun, Y., Bai, B., ... & Han, N. (2014). miR396a-mediated basic helix–loop–helix transcription factor bHLH74 repression acts as a regulator for root growth in Arabidopsis seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1343-1353.
- Baucher, M., Moussawi, J., Vandeputte, O. M., Monteyne, D., Mol, A., Pérez-Morga, D., & El Jaziri, M. (2013). A role for the miR396/GRF network in specification of organ type during flower development, as supported by ectopic expression of P opulus trichocarpa miR396c in transgenic tobacco. *Plant biology*, 15(5), 892-898.
- Bazin, J., Khan, G. A., Comber, J. P., Bustos-Sanmamed, P., Debernardi, J. M., Rodriguez, R., ... & Lelandais-Brière, C. (2013). miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 74(6), 920-934.
- Borisova, M. M. M., Kozuleva, M. A., Rudenko, N. N., Naydov, I. A., Klenina, I. B., & Ivanov, B. N. (2012). Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(8), 1314-1321.
- Bremer, K. (2000). Early Cretaceous lineages of monocot flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4707-4711.
- Cao, Y., Han, Y., Jin, Q., Lin, Y., & Cai, Y. (2016). 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.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.

- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 57(3), 449-459.
- Counce P. A., Keisling T. C., Mitchell A. J. (2000). A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science*, 40:436–443.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*, 23(2), 431-442.
- Czarnocka, W., & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4-20.
- De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M. W., Law, S. R., ... & Van De Cotte, B. (2013). The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-113.
- Diaz-Vivancos, P., de Simone, A., Kiddle, G., & Foyer, C. H. (2015). Glutathione–linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1154-1164.
- Doyle, J. A., & Donoghue, M. J. (1986). Seed plant phylogeny and the origin of angiosperms: an experimental cladistic approach. *The Botanical Review*, 52(4), 321-431.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 15(10), 573-581.
- Fairman, R., Beran-Steed, R. K., Anthony-Cahill, S. J., Lear, J. D., Stafford, W. F., DeGrado, W. F., & Brenner, S. L. (1993). Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10429-10433.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J. M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., ... & Pauwels, L. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, tpc-110.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 2018 Out 17.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., & Davies, J. M. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442.

- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(4), 861-905.
- Gao, X., YUAN, H. M., HU, Y. Q., Li, J., & LU, Y. T. (2014). Mutation of A rabidopsis CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant, cell & environment*, *37*(1), 175-188.
- González-Bosch, C. (2018). Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine*, *122*, 171-180.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003). 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.
- Hewezi, T., & Baum, T. J. (2012). Complex feedback regulations govern the expression of miRNA396 and its GRF target genes. *Plant signaling & behavior*, *7*(7), 749-751.
- Hoe Kim, J., & Tsukaya, H. (2015). Regulation of plant growth and development by the GROWTH-REGULATING FACTOR and GRF-INTERACTING FACTOR duo. *Journal of experimental botany*, *66*(20), 6093-6107.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., ... & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in plant science*, *6*, 420.
- Hu, L., Liang, W., Yin, C., Cui, X., Zong, J., Wang, X., ... & Zhang, D. (2011). Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. *The Plant Cell*, tpc-110.
- Jardim-Messeder, D., Caverzan, A., Rauber, R., Souza Ferreira, E., Margis-Pinheiro, M., & Galina, A. (2015). Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses. *New Phytologist*, *208*(3), 776-789.
- Jiménez-Quesada, M. J., Traverso, J. Á., & Alché, J. D. D. (2016). NADPH oxidase-dependent superoxide production in plant reproductive tissues. *Frontiers in plant science*, *7*, 359.
- Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell*, *14*(6), 787-799.

Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53.

Jung, K. H., Han, M. J., Lee, Y. S., Kim, Y. W., Hwang, I., Kim, M. J., ... & An, G. (2005). Rice Undeveloped Tapetum1 is a major regulator of early tapetum development. *The Plant Cell*, 17(10), 2705-2722.

Kim, J. H., & Kende, H. (2004). A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36), 13374-13379.

Kim, J. S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., ... & Yoshizumi, T. (2012). Arabidopsis GROWTH-REGULATING FACTOR7 Functions as a Transcriptional Repressor of Abscisic Acid–and Osmotic Stress–Responsive Genes, Including DREB2A. *The Plant Cell*, tpc-112.

Ko, S. S., Li, M. J., Ku, M. S. B., Ho, Y. C., Lin, Y. J., Chuang, M. H., ... & Chan, M. T. (2014). The bHLH142 transcription factor coordinates with TDR1 to modulate the expression of EAT1 and regulate pollen development in rice. *The Plant Cell*, tpc-114.

Ko, S. S., Li, M. J., Lin, Y. J., Hsing, H. X., Yang, T. T., Chen, T. K., ... & Ku, M. S. B. (2017). Tightly Controlled Expression of bHLH142 Is Essential for Timely Tapetal Programmed Cell Death and Pollen Development in Rice. *Frontiers in plant science*, 8, 1258.

Kuijt, S. J., Greco, R., Agalou, A., Shao, J., CJ't Hoen, C., Övernäs, E., ... & de Faria Maraschin, S. (2014). Interaction between the GRF and KNOX families of transcription factors. *Plant physiology*, pp-113.

Laloi, C., & Havaux, M. (2015). Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 39.

Li, S., Gao, F., Xie, K., Zeng, X., Cao, Y., Zeng, J., ... & Wang, S. (2016). The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant biotechnology journal*, 14(11), 2134-2146.

Li, X., Duan, X., Jiang, H., Sun, Y., Tang, Y., Yuan, Z., ... & Ma, H. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant physiology*, 141(4), 1167-1184.

Liu, D., Song, Y., Chen, Z., & Yu, D. (2009). Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia plantarum*, 136(2), 223-236.

- Liu, H., Guo, S., Xu, Y., Li, C., Zhang, Z., Zhang, D., ... & Chong, K. (2014). OsmiR396d-regulated OsGRFs function in floral organogenesis in rice through binding to their targets OsJMJ706 and OsCR4. *Plant Physiology*, pp-114.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Mann, D. G., LaFayette, P. R., Abercrombie, L. L., Parrott, W. A., & Stewart Jr, C. N. (2011). pANIC: A Versatile Set of Gateway-Compatible Vectors for Gene Overexpression and RNAi-Mediated down-Regulation in Monocots. *Plant Transformation Technologies*, 161-168.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology*, 2, 535-562.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P. M., & Karpinski, S. (2006). Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1795-1807.
- Menon, S. G., & Goswami, P. C. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene*, 26(8), 1101.
- Meuter-Gerhards, A., Riegert, S., & Wiermann, R. (1999). Studies on sporopollenin biosynthesis in *Cucurbita maxima* (DUCH.)—II. The involvement of aliphatic metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 154(4), 431-436.
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), 376.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in plant science*, 16(6), 300-309.
- Nair, S. K., & Burley, S. K. (2000). Functional genomics: Recognizing DNA in the library. *Nature*, 404(6779), 715.
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., & Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112, 33-53.
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press.

- Normile, D. (2008). Reinventing rice to feed the world. *Science*, 321(5887), 330-333.
- Omidbakhshfard, M. A., Proost, S., Fujikura, U., & Mueller-Roeber, B. (2015). Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Molecular plant*, 8(7), 998-1010.
- Ranjan, R., Khurana, R., Malik, N., Badoni, S., Parida, S. K., Kapoor, S., & Tyagi, A. K. (2017). bHLH142 regulates various metabolic pathway-related genes to affect pollen development and anther dehiscence in rice. *Scientific reports*, 7, 43397.
- Ribeiro, C. W., Carvalho, F. E. L., Rosa, S. B., Alves-Ferreira, M., Andrade, C. M. B., Ribeiro-Alves, M., ... & Margis-Pinheiro, M. (2012). Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants. *Plant Biology*, 14(6), 944-955.
- Rice Genome Annotation Project. National Science Foundation. Disponível em <<http://rice.plantbiology.msu.edu/>>. Acesso em: 2018 Out 19.
- Sakai, H., Tanaka, T., Antonio, B. A., Itoh, T., & Sasaki, T. (2014). The First Monocot Genome Sequence: *Oryza sativa* (Rice). In *Advances in Botanical Research* (Vol. 69, pp. 119-135). Academic Press.
- Sasaki, T. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052), 793.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.
- Scarpeci, T. E., Zanor, M. I., Carrillo, N., Mueller-Roeber, B., & Valle, E. M. (2008). Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant molecular biology*, 66(4), 361-378.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.
- Seo, J. S., Joo, J., Kim, M. J., Kim, Y. K., Nahm, B. H., Song, S. I., ... & Do Choi, Y. (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *The Plant Journal*, 65(6), 907-921.
- Sewelam, N., Jaspert, N., Van Der Kelen, K., Tognetti, V. B., Schmitz, J., Frerigmann, H., ... & Maurino, V. G. (2014). Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Molecular Plant*, 7(7), 1191-1210.

- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox biology*, *11*, 613-619.
- Skinner, M. K., Rawls, A., Wilson-Rawls, J., & Roalson, E. H. (2010). Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. *Differentiation*, *80*(1), 1-8.
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1995). The dynamic nature of polyploid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(18), 8089.
- Spagnolo-Fonini, L. (2017). *Caracterização do gene OsbHLH35 e dos fatores de transcrição envolvidos na regulação de sua expressão*. (Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- Stevens, J. D., Roalson, E. H., & Skinner, M. K. (2008). Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation*, *76*(9), 1006-1022.
- Sun, Y. J., Hord, C. L., Chen, C. B., & Ma, H. (2007). Regulation of Arabidopsis Early Anther Development by Putative Cell-Cell Signaling Molecules and Transcriptional Regulators. *Journal of Integrative Plant Biology*, *49*(1), 60-68.
- Sundaravelpandian, K., Chandrika, N. N. P., & Schmidt, W. (2013). PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in Arabidopsis. *New Phytologist*, *197*(1), 151-161.
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, *16*(9), 2481-2498.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., & Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, *143*(4), 606-616.
- van der Knaap, E., Kim, J. H., & Kende, H. (2000). A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant physiology*, *122*(3), 695-704.
- Vanlerberghe, G. (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 6805-6847.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC genomics*, *12*(1), 1.

- Wang, Z. Y., Gao, Y., Liu, J., Kumar, V., Li, T. Y., & Xuan, Y. H. (2017). Basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional activator regulates ammonium uptake in rice. *Plant Gene*, *12*, 57-65.
- Xie, H. T., Wan, Z. Y., Li, S., & Zhang, Y. (2014). Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Xu, W., Dubos, C., & Lepiniec, L. (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes. *Trends in Plant Science*, *20*(3), 176-185.
- Yu, Y., Li, Q. F., Zhang, J. P., Zhang, F., Zhou, Y. F., Feng, Y. Z., ... & Zhang, Y. C. (2017). Laccase-13 Regulates Seed Setting Rate by Affecting Hydrogen Peroxide Dynamics and Mitochondrial Integrity in Rice. *Frontiers in plant science*, *8*, 1324.
- Zhang, D. S., Liang, W. Q., Yuan, Z., Li, N., Shi, J., Wang, J., ... & Zhang, D. B. (2008). Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development. *Molecular Plant*, *1*(4), 599-610.
- Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G., & Zentgraf, U. (2006). Senescence-specific regulation of catalases in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant, cell & environment*, *29*(6), 1049-1060.

ANEXO 1 – TRANSFORMAÇÃO DE ARROZ cv. Nipponbare

Indução de calos

- 1- Remover a casca (pálea e lema) das sementes de arroz.
- 2- Esterilizar em etanol 70% por 1 minuto, misturando por inversão.
- 3- Esterilizar em hipoclorito de sódio 4% por 30 minutos, misturando por inversão para evitar a formação de bolhas.
- 4- Lavar com água destilada autoclavada por 5 vezes em ambiente estéril.
- 5- Secar as sementes em papel filtro autoclavado.
- 6- Plaquear as sementes em meio N6D, tomando cuidado para que o embrião não fique submerso.
- 7- Selar as placas com filme plástico e incubar a 28 °C sob fotoperíodo (12h claro/12h escuro).
- 8- Aguardar de 6 a 8 semanas pela produção de calos.

Sub-cultivo

- 1- Transferir os calos para meio NB e selar as placas com filme plástico.
- 2- Incubar os calos no escuro a 28 °C.
- 3- Fazer o sub-cultivo (repicagem) dos calos a cada 4 semanas, em novo meio NB.
- 4- Não utilizar material repicado mais de 5 vezes para transformação.

Transformação

- 1- 5 dias antes da transformação, escolher calos saudáveis do sub-cultivo e transferir para novo meio NB (de 25 a 30 calos por placa). Calos saudáveis apresentam divisão e possuem coloração clara. Evite o uso de calos brancos, transparentes, marrons ou muito pequenos (<1mm).
- 2- 2 dias antes da transformação, estriar *Agrobacterium* contendo a construção de interesse em LB ágar (contendo Rifampicina e antibiótico apropriado) e incubar a 28 °C durante 2 dias. Adicionar meio NBA líquido (NB líquido contendo Acetoseríngona 100 µM) nas placas contendo *Agrobacterium* e pipetar a suspensão para um frasco *erlenmeyer* estéril.
Alternativamente, pode-se fazer um pré-inóculo em 10ml de LB líquido (contendo Rifampicina e antibiótico apropriado) e utilizar 1ml desse pré-inóculo em 50ml de LB líquido (contendo Rifampicina e antibiótico apropriado) e incubar a 28°C sob agitação até o dia seguinte. Centrifugar a 4000rpm por 5 minutos, e ressuspender o pellet em NBA líquido.
- 3- Submergir os calos na suspensão de meio NBA com *Agrobacterium* e incubar a 28°C durante 10 minutos.
Alternativamente, submergir os calos na suspensão de meio NBA com *Agrobacterium* durante 10 segundos.
- 4- Descartar a suspensão de meio NBA + *Agrobacterium* tomando cuidado para manter os calos.
- 5- Secar levemente os calos em papel filtro estéril para retirar o excesso da suspensão.

- 6- Incubar os calos infectados em meio NBA sólido, no escuro a 25 °C por 2 dias.
- 7- Após o co-cultivo, lavar os calos em água destilada estéril contendo o antibiótico Timentina (150 mg/L), 4 vezes por 10 minutos, ou até a água ficar transparente.
- 8- Secar os calos em papel filtro estéril.
- 9- Plaquear os calos em meio HTC (NB contendo Higromicina, Timentina e Claforan) e incubar no escuro a 28 °C por 3-5 semanas.
- 10- Durante os dias seguintes, se houver crescimento de *Agrobacterium*, transferir os calos para novas placas de meio HTC.

Seleção de calos resistentes

- 1- Observar a presença de calos resistentes à Higromicina (2 a 3 semanas).
- 2- Transferir os calos resistentes para novas placas de meio HTC e incubar os calos no escuro a 28 °C por 3 a 4 semanas.

Pré-regeneração

- 1- Após a proliferação dos calos (3-4 semanas), transferir os calos saudáveis para placas de meio de pré-regeneração contendo fitohormônios citocinina BAP (6-benzilaminopurina), auxina NAA (ácido naftalenoacético) e ABA (ácido absísico).
- 2- Incubar os calos no escuro a 28 °C por 8 a 12 dias.
- 3- Alternativamente, pular esta etapa e utilizar a etapa de regeneração com o meio descrito em Ozawa *et al.*, 2009.

Regeneração

- 1- Transferir os calos do meio de pré-regeneração para o meio de regeneração contendo BAP e NAA.
Alternativamente, sem realizar etapa de pré-regeneração, transferir os calos saudáveis para o meio de regeneração descrito em Ozawa *et al.*, 2009.
- 2- Incubar os calos a 28 °C em do fotoperíodo (12h claro/12h escuro) por, no mínimo, 30 dias.
- 3- Selecionar os calos com raiz e parte aérea verde, transferir os mesmos para vidros de meio MS (contendo o antibiótico apropriado) e incubar a 28°C sob fotoperíodo (12h claro/12h escuro) por 10 a 14 dias.
- 4- Plantar as plântulas que cresceram na presença do antibiótico cobertas com sacos plásticos (aclimatação) e manter em fotoperíodo (12h claro/12h escuro) a 28°C.
- 5- Retirar os sacos plásticos e aguardar o desenvolvimento da planta para obtenção de sementes.

Soluções estoque para ARROZ

Macro elementos N6	10x 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 4°C

Micro elementos N6	1000x 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 4°C

Vitaminas N6	100x 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 4°C

Micro elementos B5	100x 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 4°C

Vitaminas B5	100x 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 4°C

Fe-EDTA	100x 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 25°C.	
H ₂ O até 1 litro	Manter a 4°C

2,4-D	1mg/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 100ml. Manter a 4°C	

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

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

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

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

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

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

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

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

Soluções N6: Chu, C.-C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture 43–50 (Science Press, Peking, 1978). **Soluções B5:** Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151–158 (1968).

Meios de cultura para ARROZ

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

NB – Sub cultura	1 litro
Macro elementos N6 (10x)	100ml
Micro elementos B5 (100x)	10 ml
Vitaminas B5 (100x)	10ml
FeEDTA (20mM)	10ml
2,4-D (1mg/ml)	2 ml
Sacarose	30g
Prolina	0,5g
Glutamina	0,5g
Caseína hidrolisada	0,3g
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
Acetoseringona (1000x)	1ml

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

Etapas de regeneração

Utilizar protocolo PRHT50+RHT50 ou Ozawa:

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

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

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

OBS: KIN, BAP e ANA podem ser autoclavados

Ozawa K. Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 2009 Apr;176(4):522-7. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.01.013.

ANEXO 2 – ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DO ARROZ

Estágio de crescimento	R0	R1	R2	R3	R4
Marcador morfológico	Início do desenvolvimento da panícula	Formação dos ramos da panícula	Formação do colar da folha bandeira	Emissão da panícula, ponta da panícula está acima da folha bandeira	Uma ou mais flores iniciam a antese
Ilustração					
Estágio de crescimento	R5	R6	R7	R8	R9
Marcador morfológico	No mínimo uma cariópse da panícula está alongando para o final da casca	No mínimo uma cariópse da panícula está alongada para o final da casca	No mínimo um grão da panícula tem a casca amarela	No mínimo um grão da panícula tem a casca marrom	Todos os grãos da fase R6 têm a casca marrom
Ilustração					

APÊNDICE – CURRICULUM VITÆ

ORTOLAN, F.

DADOS PESSOAIS

Nome: Francieli Ortolan

Local e data de nascimento: Torres, RS – 07 de dezembro de 1994

Endereço profissional: UFRGS - Campus do Vale - Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43312 – CEP 91501-970

Telefone profissional: (51) 996431611

E-mail: franortolan@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2017 - atual** Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular no PPGBCM - UFRGS
Bolsista da CAPES
- 2012 - 2016** Graduação em Ciências Biológicas – Bacharel – PUCRS

TRAJETÓRIA PROFISSIONAL

- 2017 - atual** Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular no PPGBCM – UFRGS
Local: Núcleo de genômica funcional de plantas
Projeto: Uma estratégia funcional para a caracterização de *OsHHLH35* e *OsGRF11* no desenvolvimento de arroz.
Orientadora: Márcia Maria A. N. P. Margis.
Coorientadora: Fernanda Lazzarotto
Bolsista da CAPES
- 2015 - 2016** Estágio de Iniciação Científica – Bolsista do CNPq
Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal - PUCRS
Projeto: Indução de resistência sistêmica em plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] contra *Xanthomonas axonopodis*

Orientadora: Eliane Romanato Santarem

2014 - 2015 Estágio de Iniciação Científica – Bolsista do CNPq
Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal - PUCRS
Projeto: Avaliação da expressão de genes relacionados a respostas de defesa contra o mofo-cinza em plantas de *Eucalyptus* eliciadas por rizobactérias
Orientadora: Eliane Romanato Santarem

2014 - 2014 Estágio de Iniciação Científica – Bolsista do CNPq
Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal - PUCRS
Projeto: Defesa de plantas de *Eucalyptus saligna* contra fungos patogênicos mediada por *Streptomyces*
Orientadora: Eliane Romanato Santarem

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 - 2015 Extensão universitária em Ferramentas moleculares para o estudo de proteínas. (Carga horária: 40h).
PUCRS

2013 - 2013 Extensão universitária em Bioinformática. Uma introdução à linguagem Perl. (Carga horária: 32h).
PUCRS

2012 - 2012 Extensão universitária em Jovem pesquisador: a formação científica do profissional das áreas da saúde. (Carga horária: 12h).
PUCRS

RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS E EVENTOS

2018 XXII International Congress of Genetics (ICG)
THE ROLE OF bHLH35 AND GRF11 TRANSCRIPTION FACTORS

IN RICE (*Oryza sativa* L.) GRAIN DEVELOPMENT.

- 2016** VIII Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos.
Eliciação por *Streptomyces* altera o metabolismo secundário de *Eucalyptus grandis* desafiado com *Botrytis cinerea*.
- 2016** VII Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica da PUCRS.
Promoção de crescimento em plantas de soja e resistência contra *Xanthomonas axonopodis*.
- 2015** VI Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica da PUCRS.
Avaliação da expressão de genes relacionados a respostas de defesa contra o mofo-cinzento em plantas de *Eucalyptus* eliciadas por rizobactérias.
- 2015** XV Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.
Expressão de genes relacionados a respostas de defesa contra o mofo-cinzento em plantas de *Eucalyptus* eliciadas por rizobactérias.
- 2014** V Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica da PUCRS.
Defesa de plantas de *Eucalyptus sp.* contra fungos patogênicos mediada por *Streptomyces sp.*
- 2014** XV Salão de iniciação científica da PUCRS.
Defesa de plantas de *Eucalyptus sp.* contra fungos patogênicos mediada por *Streptomyces sp.*