

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**



Dissertação

**Perfil transcricional e regulação de genes relacionados a autofagia em  
plântulas de arroz cultivadas sob excesso de ferro**

**Latóia Eduarda Maltzahn**

Pelotas, 2019

**Latóia Eduarda Maltzahn**

**Perfil transcricional e regulação de genes relacionados a autofagia em  
plântulas de arroz cultivadas sob excesso de ferro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de mestre em Ciências (Área de concentração em Fitomelhoramento).

Orientador: Dra. Camila Pegoraro  
Coorientador: PhD Antonio Costa de Oliveira  
Coorientador: Dra. Viviane Kopp da Luz  
Coorientador: Dr. Eduardo Venske

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M261p Maltzahn, Latóia Eduarda

Perfil transcricional e regulação de genes relacionados a autofagia em plântulas de arroz cultivadas sob excesso de ferro / Latóia Eduarda Maltzahn ; Camila Pegoraro, orientadora. — Pelotas, 2019.

61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Oryza sativa* L.. 2. Estresse abiótico. 3. Genes ATG. 4. Expressão gênica. 5. Elementos cis. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Título.

CDD : 633.18

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Latóia Eduarda Maltzahn

Perfil transcricional e regulação de genes relacionados a autofagia em plântulas de arroz cultivadas sob excesso de ferro

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa:

14 de novembro de 2019

**Banca examinadora:**

Prof. Dra. Camila Pegoraro (Orientadora)

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Gabriela Magalhães da Fonseca

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Carlos Busanello

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Ao meu namorado Tiago Vega Custódio pelo amor, carinho e paciência.

Aos meus pais Léia Nörnberg Maltzahn, Almiro Hall, Almerinda Vega Custódio e João Carlos Manetti Custódio, exemplos de amor, compreensão, dedicação, tolerância e sabedoria.

A amiga, professora e orientadora Camila Pegoraro pela amizade, orientação, paciência, disponibilidade, profissionalismo e confiança.

Aos meus coorientadores professor Antonio Costa de Oliveira, Viviane Kopp da Luz e Eduardo Venske pela orientação, amizade, ajuda e atenção.

Aos professores Vívian Ebeling Viana e Carlos Busanello, pelos ensinamentos, disponibilidade e paciência.

Aos demais amigos e colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pelo incentivo, ajuda, amizade e companheirismo.

Aos estagiários Jéssica, Evandro e Henrique pela dedicação durante o desenvolvimento do projeto.

A Capes pela concessão da bolsa.

Muito obrigado a todos que de certa forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

MALTZAHN, L. E. **Perfil transcricional e regulação de genes relacionados a autofagia em plântulas de arroz cultivadas sob excesso de ferro.** Orientadora: Camila Pegoraro. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado em ciências – área de concentração: Fitomelhoramento) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2019.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. O sistema de cultivo predominante é por inundação, o que faz com que o ferro fique mais disponível para captação, causando estresse nas plantas e interferindo no potencial produtivo dos genótipos. O ferro (Fe) é um micronutriente essencial para as plantas, no entanto, quando em excesso causa toxidez. A toxidez direta ocorre devido à absorção excessiva e posterior acúmulo de ferro nos tecidos da planta. Já a toxidez indireta resulta da limitação da absorção pelas plantas de diversos nutrientes. O arroz possui duas estratégias para absorver ferro, a estratégia I baseia-se na redução do Fe da forma férrica para ferrosa e a estratégia II consiste na quelação do Fe. Muitos estudos têm sido desenvolvidos buscando identificar e caracterizar os genes que codificam proteínas envolvidas na captação, transporte e acúmulo de Fe na planta. Esses estudos buscam delinear estratégias para solucionar os diferentes problemas relacionados ao Fe na planta, como a deficiência quando em cultivo em sequeiro, a toxidez presente no cultivo irrigado, e o baixo acúmulo desse elemento no grão mesmo em situações de alta disponibilidade de Fe no solo. Nesse estudo o foco foi dado ênfase para a elevada disponibilidade de Fe no solo, buscando identificar e caracterizar novos mecanismos de tolerância à toxidez de Fe no arroz. A autofagia é a principal rota de degradação e reciclagem de material citoplasmático. Este processo está envolvido principalmente com adaptação a estresse e resposta imune, além de promover morte celular programada em diferentes situações. Estudos recentes têm revelado a importância da autofagia na tolerância a diferentes estresses abióticos. No entanto, ainda não há informações na literatura relacionando a autofagia com a toxidez por Fe. Neste contexto, este estudo buscou caracterizar o perfil de regulação e ativação transcricional de genes *OsATG* (*AuTophagy related genes*) em plântulas de arroz submetidas a toxidez por ferro (FeT). As cultivares EPAGRI 108 (tolerante) e BR IRGA 409 (sensível) foram submetidas ao tratamento por excesso de ferro durante cinco dias, após parte aérea e raiz foram coletadas. Foi extraído RNA, convertido em cDNA e após foram avaliadas as expressões relativas dos genes *OsATG3a*, *OsATG4a*, *OsATG5*, *OsATG7*, *OsATG8a*, *OsATG10b*, *OsATG12*, *OsATG16b* e *OsATG18a*. Além disso, os promotores destes genes foram analisados quanto a presença de elementos *cis*. Os genes *OsATG* foram induzidos no genótipo tolerante e reprimidos no genótipo sensível. Os promotores dos genes *OsATGs* são ricos em elementos de regulação *cis* do tipo W-box, alvos de fatores de transcrição WRKYs. Estes resultados sugerem que os genes *OsATGs* estão envolvidos na resposta ao FeT e a regulação desses genes pode ocorrer via WRKY. Este estudo traz os primeiros indícios do envolvimento da autofagia na resposta ao FeT em arroz.

**Palavras-chave:** *Oryza sativa* L.; estresse abiótico; genes *ATG*; expressão gênica; elementos *cis*.

## Abstract

MALTZAHN, L. E. **Transcriptional profile and control of autophagy-related genes in rice seedlings grown under iron.** Advisor: Camila Pegoraro. 2019. 61 f. Dissertation (Master's degree in science – concentration area: Plant Breeding) – Graduate Program in Agronomy, Department of Crop Science, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2019.

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most cultivated and consumed cereals in the world. The predominant cultivation system is by flooding, which makes iron more available for uptake, causing stress on plants and interfering with the productive potential of genotypes. Iron is an essential micronutrient for plants, however when in excess it causes toxicity. Direct toxicity occurs due to excessive absorption and subsequent accumulation of iron in plant tissues. Indirect toxicity results from the limited absorption by plants of various nutrients. Rice has two strategies for absorbing iron, strategy I is based on the reduction of ferric iron to ferrous iron and strategy II is on chelation of iron. Many studies have been developed to identify and characterize the genes that encode proteins involved in iron uptake, transport and accumulation of Fe in the plant. These studies seek to outline strategies to solve the different problems related to Fe in the plant, such as deficiency in dryland cultivation, toxicity and low accumulation of this element in the grain. In this study the focus was given to the high availability of Fe in the soil and seeks to identify and characterize new mechanisms of tolerance to Fe toxicity in rice. Autophagy is the main route of degradation and recycling of cytoplasmic material. This process is mainly involved with stress adaptation and immune response, as well as promoting programmed cell death in different situations. Recent studies have revealed the importance of autophagy in tolerance to different abiotic stresses. However, there is still no information in the literature relating autophagy to Fe toxicity. In this context, this study aimed to characterize the regulation and transcriptional activation profile of OsATG (associated with autophagy) genes in rice seedlings subjected to iron toxicity (FeT). The cultivars EPAGRI 108 (tolerant) and BR IRGA 409 (sensitive) were subjected to treatment for excess iron for five days, after shoot and root were collected. RNA was extracted, converted to cDNA and after the relative expressions of the genes *OsATG3a*, *OsATG4a*, *OsATG5*, *OsATG7*, *OsATG8a*, *OsATG10b*, *OsATG12*, *OsATG16b* and *OsATG18a* were evaluated, the promoters of these genes were also analyzed. OsATG genes were induced in the tolerant genotype and repressed in the sensitive genotype. In addition, OsATGs gene promoters are rich in W-box cis regulatory elements targeted by WRKYs transcription factors. These results indicate that OsATGs genes are involved in FeT response and these genes are transcriptionally regulated by WRKY transcription factors. This study provides early insights into the involvement of autophagy in FeT tolerance.

Key words: *Oryza sativa* L.; abiotic stress; ATG genes; gene expression; Cis elements.

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Comportamento de plantas arroz em diferentes condições de disponibilidade de ferro. A cor azul representa $\text{Fe}^{3+}$ e a cor preta representa $\text{Fe}^{2+}$ ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 15 |
| Figura 2 – Estratégias de absorção de ferro em plantas. Estratégia I em espécies não <i>Poaceae</i> , estratégia II em espécies <i>Poaceae</i> e estratégias combinadas em arroz...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 17 |
| Figura 3 – Imagem demonstrando o transporte de Fe após absorção.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
| Figura 4 – Tipos de autofagia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 23 |
| Figura 5 – Etapas da macroautofagia. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 24 |
| Figura 6 – Caracterização fenotípica dos genótipos de arroz Epagri 108 (tolerante a toxidez por Fe) e BR IRGA 409 (sensível à toxidez por Fe) sob excesso de ferro ( $300\text{mg L}^{-1}$ ). a: Comportamento geral das plantas das duas cultivares de arroz sob excesso de ferro. b: Placa de ferrugem nas raízes das duas cultivares de arroz. c: Caracteres morfológicos da parte aérea (comprimento da parte aérea - SL e massa seca da parte aérea - SDM) apresentados em desempenho relativo. d: Caracteres morfológicos da raiz (comprimento da raiz - RL e massa seca da raiz - RDM) apresentados em desempenho relativo. Em c e d a cor rosa representa desempenho relativo próximo a 100% e o verde representa desempenho relativo abaixo de 100%. .... | 33 |
| Figura 7 – Quantificação relativa da expressão do gene OsATGs nos tecidos da parte aérea e da raiz dos genótipos EPAGRI 108 e BR IRGA 409 submetidos a excesso de ferro ( $300\text{mg L}^{-1}$ ) por cinco dias. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| Figura 8 – Estrutura dos genes OsATG7 e OsATG18a demonstrando a ocorrência de splicing alternativo decorrente de promotor alternativo. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 36 |
| Figura 9 – Envolvimento dos fatores de transcrição WRKY na regulação transcricional dos genes OsATG sob toxidez por excesso de ferro (Fe). A: Elementos de regulação cis (CRE) alvos de ligação de fatores de transcrição WRKY em promotores dos genes OsATG; B: Modelo proposto de regulação de genes OsATGs via ativação transcricional por fatores de transcrição WRKY. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 38 |
| Figura 10 – Diagrama de Venn para a ocorrência de elementos de regulação cis. Promotores alternativos dos genes OsATG7 (a) e OsATG18a (b) e promotores dos genes envolvidos nos sistemas de conjugação ATG8 (c) e ATG12 (d). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 39 |
| Figura 11 – Sumarização da regulação e expressão de genes OsATGs em plântulas de arroz submetidas a toxidez por excesso de ferro. Para cada gene é apresentado a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |

expressão relativa para parte aérea e raiz, a cor verde indica que a expressão foi reduzida em relação ao controle e vermelho indica que a expressão foi aumentada em relação ao controle. Tolerant = tolerante; sensitive = sensível; promoter = promotor; ubiquitin = ubiquitina; membrane = membrana; proteins = proteínas; shoot = parte aérea; root=raiz. ....40

## **Lista de Tabelas**

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Cultivares de arroz que possuem algum nível de tolerância à toxidez por excesso de ferro..... | 13 |
| Tabela 2 – Informações dos oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão gênica.....            | 31 |

## Sumário

|         |                                                                                              |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | Introdução.....                                                                              | 10 |
| 2       | Revisão bibliográfica.....                                                                   | 11 |
| 2.1     | Cultura do arroz.....                                                                        | 11 |
| 2.1.1   | Origem e classificação .....                                                                 | 11 |
| 2.1.2   | A importância do arroz como genoma modelo.....                                               | 12 |
| 2.1.3   | Melhoramento vegetal.....                                                                    | 12 |
| 2.1.4   | Importância econômica e social do arroz .....                                                | 13 |
| 2.1.5   | Ecossistemas de produção de arroz .....                                                      | 14 |
| 2.2     | Ferro.....                                                                                   | 15 |
| 2.2.1   | Ferro no solo .....                                                                          | 15 |
| 2.2.1.1 | Estratégias de absorção de ferro .....                                                       | 16 |
| 2.2.1.2 | Regulação e transporte de Fe na planta.....                                                  | 17 |
| 2.2.2   | Ferro na planta (localização).....                                                           | 19 |
| 2.2.2.1 | Toxidez por excesso de ferro (FeT) .....                                                     | 21 |
| 2.2.2.2 | Mecanismos de tolerância .....                                                               | 22 |
| 2.3     | Autofagia .....                                                                              | 22 |
| 2.4     | Relação da autofagia com estresses abióticos.....                                            | 26 |
| 2.5     | Expressão genica.....                                                                        | 27 |
| 3       | Material e Métodos .....                                                                     | 27 |
| 3.1     | Material vegetal .....                                                                       | 27 |
| 3.2     | Expressão dos genes ATG.....                                                                 | 28 |
| 3.3     | Predição da estrutura gênica do <i>OsATG7</i> e <i>OsATG18a</i> .....                        | 30 |
| 3.4     | Identificação de elementos de regulação <i>cis</i> (CRE) .....                               | 30 |
| 4       | Resultados e Discussão .....                                                                 | 32 |
| 4.1     | Efeitos da FeT na planta .....                                                               | 32 |
| 4.2     | Ativação dos genes <i>OsATG</i> em resposta a toxidez por excesso de ferro .....             | 33 |
| 4.3     | Consequências do <i>splicing</i> alternativo dos genes <i>OsATG7</i> e <i>OsATG18a</i> ..... | 36 |
| 4.4     | Caracterização da regulação da transcrição dos genes <i>OsATG</i> .....                      | 37 |
| 4.5     | Sumarização do envolvimento dos genes <i>OsATG</i> em resposta a FeT .....                   | 39 |
| 5       | Conclusão.....                                                                               | 40 |
|         | Referências .....                                                                            | 42 |
|         | Apêndices.....                                                                               | 49 |

## 1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. Essa cultura merece destaque especial por se tratar de um alimento que é consumido praticamente sem processo de industrialização, e por atender populações com diferentes poderes aquisitivos (SOSBAI, 2018).

Um dos principais objetivos do melhoramento genético de arroz é o desenvolvimento de cultivares mais produtivas. Porém, mesmo que um genótipo tenha potencial produtivo elevado, quando em condições adversas a produtividade pode ser afetada drasticamente. Dessa forma, além de buscar genótipos mais produtivos, os melhoristas buscam plantas tolerantes a estresses abióticos. No entanto, o melhoramento para essas características é difícil, pois são caracteres quantitativos, de seleção complexa, sendo controlados por muitos genes e muito influenciados por fatores ambientais (revisado por COLLINS et al., 2018).

Um dos fatores adversos que afeta negativamente o cultivo de arroz irrigado é a toxidez causada por excesso de ferro (Fe). Em solos alagados ocorre a redução do ferro da forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (KOBAYASHI e NISHIZAWA, 2012), aumentando a disponibilidade e captação pelas plantas. O excesso de Fe causa danos tanto na raiz como na parte aérea, diminuindo o potencial produtivo de cultivares sensíveis.

Considerando que a toxidez por excesso de Fe (FeT) tem um impacto negativo na produtividade do arroz e que a tolerância a essa condição é controlada por muitos genes, os melhoristas de plantas precisam utilizar diferentes estratégias para auxiliar o processo de desenvolvimento de novas cultivares. A utilização de ferramentas biotecnológicas tem possibilitado grandes avanços no melhoramento de plantas. Dentre essas ferramentas está o estudo do perfil transcricional, que possibilita a identificação e caracterização de genes alvo associados a caracteres de interesse agrônômico, que poderão ser utilizados para obtenção de cultivares superiores.

Genes associados a captação, transporte e acúmulo de Fe em tecidos já têm sido identificados e inúmeros estudos de caracterização foram conduzidos (revisado por SANTOS et al., 2017). Porém, a investigação da participação de genes envolvidos em outras rotas em resposta a toxidez por Fe também precisa ser conduzida.

Nas últimas décadas iniciou-se inúmeros estudos relacionando a autofagia com a adaptação e tolerância a estresses (revisado por ÜSTÜN et al., 2017; revisado

MARSHALL e VIERSTRA, 2018), no entanto, a associação desse mecanismo de manutenção de homeostase celular e reciclagem citoplasmática com a FeT em arroz ainda não foi estudada. Diante do exposto, esse estudo teve por objetivo a caracterização da regulação e do perfil transcricional de genes associados a autofagia (ATG) em plântulas de arroz cultivadas sob condições de excesso de Fe.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Cultura do arroz

#### 2.1.1 Origem e classificação

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à divisão das angiospermas, família *Poaceae*, tribo *Oryzea*, e gênero *Oryza* (NCBI *taxonomy*, 2019). A tribo possui 11 gêneros, sendo o *Oryza* o único com espécies cultivadas, o qual é composto por 24 espécies (revisado por PEGORARO et al., 2018), destas, apenas duas são cultivadas, *Oryza sativa* L. (arroz cultivado asiático) e o *Oryza glaberrima* (arroz cultivado africano) (BRAR e SINGH, 2011; revisado por WIN et al., 2016). O centro de origem de *O. sativa* proposto é o Sudeste Asiático, mais precisamente a região compreendida entre a Índia e Mianmar (antiga Birmânia) (MAGALHÃES JR e OLIVEIRA, 2008; MUTHAYYA et al., 2014).

A espécie *O. sativa* possui grande importância na alimentação humana, sendo um alimento mundialmente consumido. É uma espécie de ciclo anual, autógama, diploide com  $x = 12$  cromossomos ( $2n = 2x = 24$  cromossomos). A espécie *O. sativa* é dividida em sete grupos, *indica*, *japonica temperada*, *japonica tropical*, *aus*, *aromatico*, *ashina* e *rayada* (GLASZMANN, 1987; WANG et al., 2014).

As principais subespécies, *indica* e *japonica*, podem ser diferenciadas por diversos fatores, desde aspectos morfológicos até reações a estresses bióticos e abióticos. As principais diferenças estão relacionadas à tolerância das plantas a baixas temperaturas, resistência a seca, acamamento em resposta a fertilizantes como nitrogênio, habilidade competitiva com plantas daninhas, longevidade das sementes e eficiência fotossintética das folhas com o mesmo conteúdo de proteína (MACKILL et al., 1996; OKA e MORISHIMA, 1997). Em cruzamentos entre as subespécies *indica* e *japonica*, é observado com frequência a ocorrência de alta esterilidade de espiguetas, a qual é apontada como sendo decorrente de causas genéticas (OKA e MORISHIMA, 1997).

### **2.1.2 A importância do arroz como genoma modelo**

O arroz (*Oryza sativa* L.) subespécie *japonica* cv. Nipponbare teve seu genoma completamente sequenciado no ano de 2005 por representantes de 10 Países que constituíram o Projeto Internacional de Sequenciamento do Genoma do Arroz (IRGSP - *International Rice Genome Sequencing Project*). Este estudo iniciou inúmeros avanços na área da biotecnologia vegetal, além de pesquisas inéditas, sendo a primeira cultura alimentar para a qual a sequência completa dos genes foi disponibilizada (IRGSP, 2005).

Por apresentar um genoma pequeno de aproximadamente 390Mb, alto grau de sintenia com outros cereais e mapas físicos de alta densidade, o arroz é considerado o organismo modelo entre as plantas da família *Poaceae*. Essas características permitem a transferência de informações genéticas importantes para estudos de genômica estrutural/funcional entre as espécies desta família. Além disso, o arroz pode beneficiar as espécies menos favorecidas tecnologicamente e que apresentam genomas maiores como o milho (2.500Mb), cevada (5.500Mb) e trigo (16.000Mb) os quais têm estudo mais complicado (revisado por SRIVASTAVA et al., 2017).

### **2.1.3 Melhoramento vegetal**

Um dos principais objetivos do melhoramento genético de plantas é o desenvolvimento de cultivares superiores, melhor adaptadas às condições adversas como o excesso de ferro, com alto potencial produtivo e com alta qualidade (CARVALHO et al., 2003). No entanto, essa é uma tarefa difícil para os melhoristas de plantas, uma vez que essas características são de seleção complexa, sendo controladas por muitos genes e muito influenciadas por fatores ambientais (revisado por COLLINS et al., 2018).

Neste intuito os programas de melhoramento buscam constantemente por constituições genéticas superiores que apresentem maior potencial genético para produtividade, qualidade e tolerância a estresses abióticos. Para a obtenção de genótipos superiores o melhoramento genético de plantas requer três etapas fundamentais: presença da variabilidade genética, eficiência na seleção dos genótipos

mais promissores e ajuste das melhores constituições genéticas ao ambiente de cultivo.

A obtenção de novas cultivares se dá através de melhoramento convencional (cruzamentos seguidos de seleção), indução de mutações, e com a utilização de ferramentas biotecnológicas, seja de forma direta, no desenvolvimento de plantas transgênicas ou editadas, ou de forma indireta, através da utilização de marcadores moleculares e na identificação de genes candidatos associados a caracteres de importância econômica.

Os programas de melhoramento convencional do Sul do Brasil têm desenvolvido inúmeras cultivares de arroz, com diferentes características. Dentre essas cultivares, algumas apresentam diferentes níveis de tolerância à FeT (Tabela 1).

Tabela 1 – Cultivares de arroz que possuem algum nível de tolerância à toxidez por excesso de ferro.

| Cultivar      | Nível de tolerância                       |
|---------------|-------------------------------------------|
| EPAGRI 106    | Medianamente tolerante a toxidez indireta |
| EPAGRI 108    | Tolerante à toxidez indireta              |
| EPAGRI 109    | Tolerante à toxidez indireta              |
| SCS116 Satoru | Medianamente tolerante a toxidez indireta |
| BRS 6 “CHUÍ”  | Moderada tolerância                       |
| BRS Querência | Tolerante à toxidez indireta              |
| BR IRGA 423   | Tolerante                                 |
| BR IRGA 424   | Tolerante                                 |
| IRGA 425      | Tolerante                                 |
| IRGA 428 CL   | Tolerante                                 |
| IRGA 430      | Resistente                                |
| IRGA 424 CL   | Resistente                                |
| IRGA 431 CL   | Resistente                                |
| Avaxi CL      | Alta tolerância à toxidez por ferro       |

Fonte: SOSBAI, 2018.

#### 2.1.4 Importância econômica e social do arroz

O arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas. É o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando área aproximada de 161 milhões de hectares. A produção de cerca de 756,5 milhões de toneladas de grãos em casca corresponde a 29% do total de grãos usados na alimentação humana (SOSBAI, 2018).

No Brasil a safra 2017/2018 atingiu uma produtividade de  $6.118 \text{ ha}^{-1}$ , sendo que o Rio Grande do Sul (RS) obteve a melhor produtividade do país, alcançando a média de  $7.851 \text{ kg ha}^{-1}$ , sendo estes dados referentes apenas ao arroz irrigado. Quando se avalia a produção total de arroz (sequeiro e irrigado), verifica-se que a produção foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas, o que coloca o Brasil na nona posição mundial em produção (CONAB, 2019). A região Sul do país é responsável por grande parte desta produção, contribuindo com 9,7 milhões de toneladas. Dentre os estados da região Sul o destaque é o Rio Grande do Sul (RS), responsável por 70% do total produzido nesta região (SOSBAI, 2018; CONAB, 2019).

Por ser um alimento tão importante na dieta da população, o arroz possui um consumo bastante elevado. A nível mundial, a média de consumo por pessoa é de  $54 \text{ kg pessoa ano}^{-1}$ , sendo que os países asiáticos apresentam as médias mais elevadas  $78 \text{ kg pessoa ano}^{-1}$ . No Brasil são consumidos  $32 \text{ kg pessoa ano}^{-1}$  (SOSBAI, 2018).

#### **2.1.5 Ecossistemas de produção de arroz**

O arroz pode ser cultivado em dois ecossistemas, várzea e terras altas. Os solos de várzea são próprios para o cultivo do arroz irrigado por inundação, pois caracterizam-se pela topografia plana e difícil drenagem, onde os solos permanecem saturados (hidromorfismo). A drenagem deficiente está relacionada com horizontes subsuperficiais argilosos, com baixa condutividade hidráulica e à proximidade do lençol freático da superfície do solo. Essas características tornam-se adequadas para o cultivo do arroz, facilitando a manutenção de uma lâmina de água sobre a superfície do solo, dificultando a lixiviação de nutrientes e auxiliando no controle de plantas invasoras (SOSBAI, 2018). Essas condições prevalecem na região Sul do RS, o que faz com que o cultivo nesse estado seja predominantemente irrigado.

A outra possibilidade é o cultivo de arroz em terras altas ou sequeiro. Nesse sistema o arroz pode ser cultivado com irrigação por aspersão ou sem irrigação, na qual a disponibilidade de água é totalmente dependente da chuva.

Uma das principais diferenças entre os dois ecossistemas é a condição em que a raiz da planta de arroz se desenvolve. No sistema de sequeiro a raiz se desenvolve em condições aeróbicas, enquanto que sistema irrigado as raízes se desenvolvem em

condições anaeróbicas, o que resulta em uma série de modificações relacionadas à absorção de nutrientes e desenvolvimento da planta.

## 2.2 Ferro

### 2.2.1 Ferro no solo

O Fe é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre (HORI et al., 2015), compreendendo 4,6% de rochas ígneas e 4,4% de rochas sedimentares (MOREL e HERING, 1993). É um elemento insolúvel e indisponível para a maioria das plantas porque está presente principalmente nos solos como óxidos de ferro trivalentes (Figura 1) (MÜLLER et al., 2015). No entanto, as plantas podem absorver Fe quando esse elemento se encontrar nas formas  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso) e  $\text{Fe}^{3+}$  (férico) complexado com fitosideróforos e em complexos orgânicos (MARSCHNER, 1995; KOBAYASHI e NISHIZAWA 2012).

No sistema de cultivo de arroz irrigado, no qual o solo possui constante lâmina de água, prevalece condições de anaerobiose, e se o pH for baixo, vai ocorrer a liberação de uma concentração de Fe disponível para a solução do solo. Esse evento ocorre pois as condições deste sistema de cultivo reduzem o Fe da forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), aumentando assim sua disponibilidade, o que pode causar toxidez por excesso de Fe (Figura 1) (SCHMIDT et al., 2013).

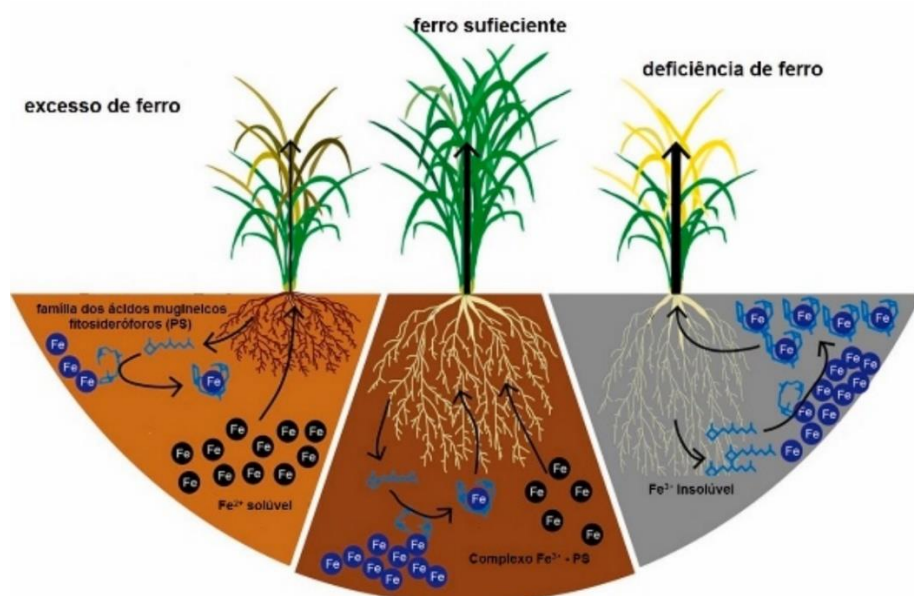


Figura 1 – Comportamento de plantas arroz em diferentes condições de disponibilidade de ferro. A cor azul representa  $\text{Fe}^{3+}$  e a cor preta representa  $\text{Fe}^{2+}$ .  
Fonte: Adaptado de Kobayashi et al., 2019.

Os solos de várzea do Rio Grande do Sul apresentam características químicas e físicas bastante variáveis, o que influencia na quantidade de Fe presente nos diferentes tipos de solo. A região da Fronteira Oeste é a mais rica em Fe e ocorre uma diminuição nos teores quando se aproxima do Litoral Sul, pois o solo desta região é derivado do granito (SCHMIDT, 2009).

#### **2.2.1.1 Estratégias de absorção de ferro**

De acordo com a disponibilidade de Fe no solo, as plantas desenvolveram mecanismos para controlar e regular a sua absorção. A captação de Fe ocorre pela estratégia I em espécies não *Poaceae*, estratégia II em espécies *Poaceae* e atuação combinada das estratégias I e II em arroz. A estratégia I, baseia-se na redução do Fe da forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que é solúvel e disponível para a planta. Nesta estratégia, inicialmente ocorre a protonação da rizosfera por meio ATPases (AHA2 -  $\text{H}^+$  ATPase), presentes nas células epidérmicas radiculares, a fim de acidificar o pH da solução do solo. Com isso ocorre a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  oxidado para a forma solúvel  $\text{Fe}^{2+}$ , através da enzima quelato redutase férrica (FRO - *Ferric Reductase Oxidase*) aumentando a solubilidade do Fe na rizosfera (Figura 2). Após a redução, o Fe é transportado para o interior da célula da raiz por proteínas específicas transportadoras reguladas por Fe (IRT1 - *Iron Regulated Transporter 1*). Esta estratégia é adotada pelas plantas superiores, com exceção da maioria das espécies da família *Poaceae* (ROBINSON et al., 1999; HELL e STEPHAN, 2003; revisado por SANTOS et al., 2017).

A estratégia II, desenvolvida pelas espécies da família *Poaceae* como arroz, milho e trigo, consiste na quelação do Fe. Essas plantas liberam compostos da família dos ácidos mugineicos (MA), conhecidos como fitosideróforos (PS), que quelam  $\text{Fe}^{3+}$  na rizosfera (HELL e STEPHAN, 2003). Os PS são compostos de baixo peso molecular, com alta afinidade para o Fe e para outros metais. Devido a esta afinidade os PS se ligam eficientemente ao Fe trivalente na rizosfera, produzindo complexos PS- $\text{Fe}^{3+}$ , que são transportados para o interior das células da raiz por transportadores específicos da família *Yellow Stripe – Like* (YSL), sem que seja necessária uma redução extracelular (Figura 2) (MORI, 1999; CURIE et al., 2001; HELL e STEPHAN, 2003; SCHAAF et al., 2004; revisado por SANTOS et al., 2017).

O arroz por ser da família *Poaceae* tem como característica a absorção de complexos PS-Fe<sup>3+</sup> pela estratégia II, no entanto, como mencionado acima, já foi comprovado que ele é capaz de absorver Fe<sup>2+</sup> diretamente da rizosfera através da estratégia I (Figura 2). É possível que a capacidade do arroz de absorver Fe pela estratégia I esteja relacionada a uma característica adaptativa, tendo em vista que em solos alagados a disponibilidade de Fe<sup>2+</sup> é muito maior que a de Fe<sup>3+</sup> (ISHIMARU et al., 2006).

Outras estratégias também têm função de auxiliar na absorção de Fe, como o aumento da concentração de citrato no floema e alterações morfológicas na raiz (SCHMIDT, 2009).

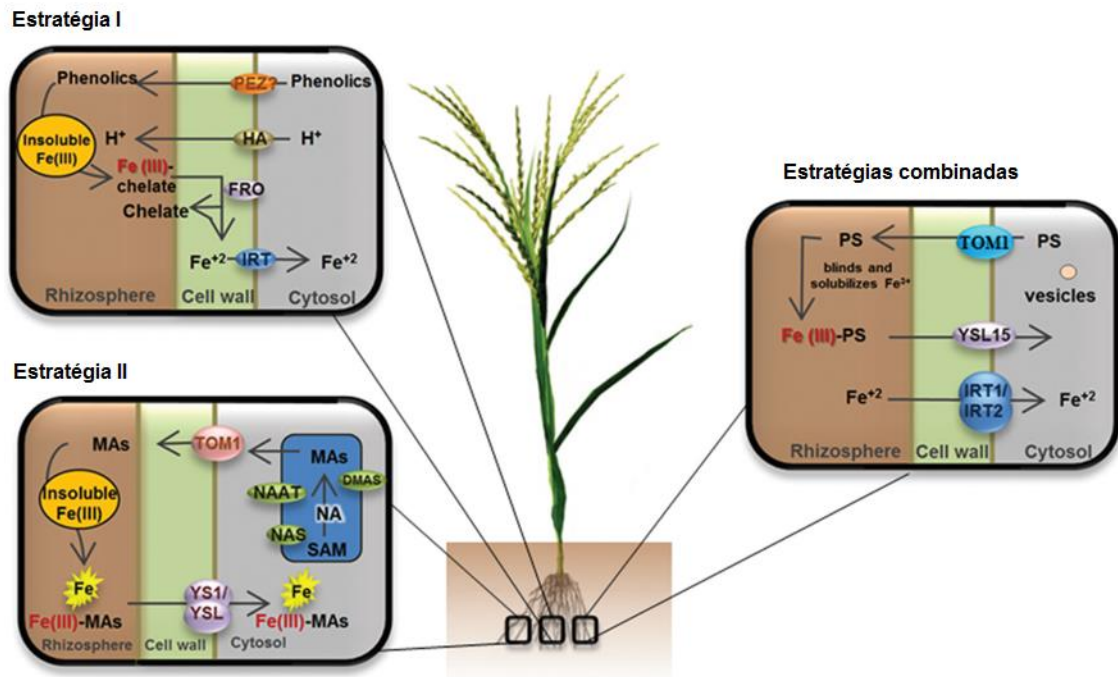


Figura 2 – Estratégias de absorção de ferro em plantas. Estratégia I em espécies não *Poaceae*, estratégia II em espécies *Poaceae* e estratégias combinadas em arroz.

Fonte: Adaptado de Santos et al, 2017.

### 2.2.1.2 Regulação e transporte de Fe na planta

Na estratégia I ocorre a participação de genes codificadores das enzimas AHA2, FRO e IRT, os quais são regulados por fatores de transcrição (TF) induzidos pela deficiência de Fe (*iron deficiency-induced transcription fator* - FIT) que interagem com TFs bHLH (*Basic helix-loop-helix*). Os genes *FIT* são regulados por moléculas

sinalizadoras como auxinas e etileno, que são sintetizados em condições de deficiência de Fe (revisado por SANTOS et al., 2017).

A estratégia II inclui a participação de proteínas (5'- metil adenosina nucleosidase, – MTN, Metiltioribose quinase – MTK, Metiltioribose-1-fosfato isomerase – IDI2 e desidrase enolase fosfatase – DEP, S-adenosil-L-metionina sintetase – SAMS) que atuam na metionina e S-adenosil-L-metionina (SAM) que são precursores dos fitosideróforos (PSs), que pertencem a família dos ácidos mugineicos (MAs). Além disso, proteínas envolvidas na síntese de PSs (Nicotianamine synthase – NAS, Nicotianamine aminotransferase – NAAT, Ácido Deoximugineico sintase – DMAS, Dioxigenases – IDS2/IDS3); e no transporte do complexo  $\text{Fe}^{+3}$ -PSs para a raiz (YS1 e YSL) também atuam na estratégia II.

Em plantas da família das *Poaceae*, os MAs são sintetizados através de uma via conservada, na qual três reações enzimáticas sequenciais convertem a SAM em ácido 2-desoximugineico (DMA). Além de se complexar com  $\text{Fe}^{+3}$  para captação pela estratégia II, os MAs também estão envolvidos no transporte de metais na planta. Na via de biossíntese de PSs de plantas *Poaceae* (que utilizam a estratégia II), a nicotianamina (NA) atua como precursora direta da síntese de DMA. Entretanto, a NA é sintetizada em todas as plantas, incluindo aquelas que empregam a estratégia I para aquisição de Fe (revisado por NOZOYE et al., 2019), pois é necessária para o transporte de Fe dentro da planta (Figura 3).

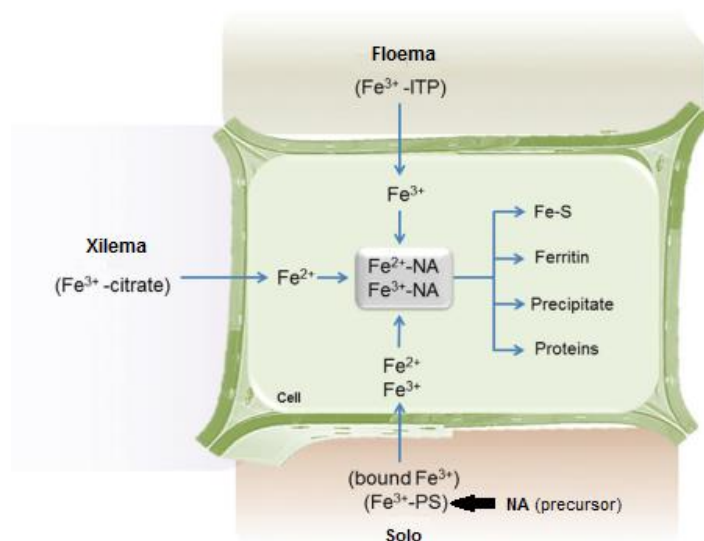


Figura 3 – Imagem demonstrando o transporte de Fe após absorção.  
Fonte: Adaptado de Santos et al., 2017.

Nas Estratégias I e II, a NA funciona como quelante de metal para o tráfego de metais intracelulares e para o transporte de metais a longa distância entre diferentes órgãos, incluindo o transporte de Fe mediado pelo floema. Em plantas *Poaceae*, NA foi sugerido como sendo importante para o sequestro vacuolar na desintoxicação do excesso de Fe (revisado por NOZOYE et al., 2019). O transporte Fe também pode ocorrer via transportador NRAMP (*Natural resistance-associated macrophage protein*) (revisado por SANTOS et al., 2017).

Para ser assimilado pelas folhas, o  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido pelas enzimas FRO. Após redução esse elemento é transportado para outros órgãos via floema através da formação de um complexo com NA (TAKAHASHI et al., 2003).

Os genes que codificam proteínas associadas à estratégia II são induzidos pela deficiência de Fe. Os TFs *Iron deficiency responsive element binding fator* (IDEF1 e IDEF2) e *Iron regulated basic helix-loop-helix* (IRO2) foram identificados como reguladores de genes chave que controlam a absorção de Fe, incluindo a síntese de PSs no arroz. Sob deficiência de Fe, o IDEF1 regula genes cujos produtos atuam na captura e uso de Fe, como *OsFRO2*, *OsYSL15*, *OsYSL2*, *OsIRT1*, *OsNAS1*, *OsNAS2* e *OsNAS3*. O TF IDEF1 se liga ao *Elemento 1* (IDE1), enquanto o IDEF2 se liga ao IDE2, ambos presentes na região promotora dos genes associados à deficiência de Fe. Em condições de toxicidade por Fe, os genes *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsYSL15*, *OsYSL16* e *OsNRAMP1* foram reprimidos em raízes de arroz (revisado por SANTOS et al., 2017).

### 2.2.2 Ferro na planta (localização)

O Fe é um micronutriente essencial para as plantas. É necessário, pois está envolvido nos processos biológicos, como a fotossíntese, a respiração e a biossíntese de clorofila, além de servir como cofator para enzimas envolvidas na transferência de elétrons ou oxigênio (revisado por KOBAYASHI et al., 2019).

Uma vez que os nutrientes são absorvidos na superfície da raiz, eles devem ser transportados radialmente através de diferentes camadas de tecidos radiculares para alcançar a parte central da raiz. Nesse local ocorre o carregamento de nutrientes para o sistema vascular (revisado por KAWAKAMI e BHULLAR, 2018). Nas raízes de arroz os aerênquimas estão envolvidos nas trocas gasosas durante condições de crescimento em solos alagados. Essa estrutura da raiz no arroz requer um par de

transportadores, ou seja, um transportador de efluxo na exoderme e um transportador de influxo na endoderme, para uma eficiente transferência de nutrientes das raízes para outras partes da planta (revisado por SASAKI et al., 2016).

Nas células vegetais, as organelas como as mitocôndrias e os cloroplastos, requerem a maior quantidade de Fe para o funcionamento adequado. No arroz, o MIT1 (*Mitochondrial Iron Transporter 1* – codificado pelo gene *OsMIT1*) foi identificado como um transportador fornecendo Fe para as mitocôndrias. No entanto, nenhum transportador de Fe de cloroplastos de arroz foi ainda caracterizado. Se por um lado deve haver uma quantidade suficiente de Fe nessas organelas, por outro, o Fe pode ser prejudicial quando presente em excesso. Isso ocorre porque esse elemento é mediador da reação de Fenton, que danifica os lipídios da membrana, dando origem a espécies reativas de oxigênio. Portanto, nas células vegetais, a quantidade de Fe livre nas organelas e no citoplasma é rigidamente regulada e o excesso de Fe é sequestrado de forma não reativa (Revisado por KAWAKAMI e BHULLAR, 2018).

Transportadores localizados no tonoplasto de arroz VIT1 e VIT2 (*Vacuolar Iron transporter* codificado pelos genes *OsVIT1* e *OsVIT2*) são conhecidos por importar Fe para o vacúolo a partir do citoplasma (ZHANG et al., 2012). *OsVIT1* e *OsVIT2* respondem diferentemente a disponibilidade externa de Fe. Enquanto o *OsVIT1* é expresso de forma estável, independentemente da disponibilidade de Fe, a expressão de *OsVIT2* é induzida sob suficiência de Fe e reprimida na deficiência de Fe (ZHANG et al., 2012). Portanto, presume-se que o produto do gene *OsVIT1* desempenha um papel constante na importação de Fe nos vacúolos, enquanto o transportador codificado por *OsVIT2* assume um papel como controlador do nível de Fe no citoplasma.

A ferritina (FER), uma proteína complexa localizada em plastídios que pode acomodar até 4.500 átomos de Fe, também armazena Fe de maneira não reativa. No arroz dois genes codificadores de FER, nomeados *OsFER1* e *OsFER2* foram identificados. Semelhante aos genes *OsVIT*, o *OsFER2* responde de forma mais sensível ao suprimento externo de Fe do que o *OsFER1*. Assim, considera-se que *OsFER2* desempenha um papel principal no sequestro de Fe quando é abundante em células de arroz (Revisado por KAWAKAMI e BHULLAR, 2018).

### 2.2.2.1 Toxidez por excesso de ferro (FeT)

A FeT é um distúrbio nutricional que afeta as lavouras de arroz irrigado em diversos locais do mundo, principalmente em países da Ásia, incluindo China, Índia, Indonésia, Tailândia, Malásia e Filipinas; além do Oeste da África e América do Sul (WARDA, 2001; SOUSA et al., 2004). No RS, foram descritos os primeiros problemas de toxidez por Fe a partir do final da década de setenta, quando se começou a utilizar cultivares modernas (MAGALHÃES JR. et al., 2009).

Este distúrbio é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar produção do arroz irrigado (DOBERMANN e FAIRHURST, 2000). Observa-se, que em condições de altas concentrações do elemento disponível no solo, as plantas podem absorvê-lo demasiadamente resultando em problemas severos de toxidez. Desta forma, as plantas necessitam manter a homeostase do Fe, protegendo-se do excesso e absorvendo somente as quantidades necessárias do íon (GROSS et al., 2003).

A toxidez por Fe pode ser direta ou indireta. A toxidez direta ocorre devido à absorção excessiva e posterior acúmulo de Fe nos tecidos da planta. Primeiramente é caracterizada pela presença de manchas castanhas (bronzamento) nas folhas jovens, onde o elemento se deposita. Em estágios mais avançados de toxidez, ocorrem necrose, retardo no crescimento e consequente redução da produtividade, podendo em caso extremos acarretar a morte da planta (PONNAMPERUMA, 1972; BIENFAIT, 1985; SOUSA, 2004).

Em lavouras com toxidez direta observa-se bronzamento das folhas, que ficam descoloridas, com exceção da nervura central, as quais adquirem uma cor púrpura, vermelho-acastanhada, laranja ou amarela e mais tarde secam, conferindo uma aparência de queimadura às plantas. As folhas velhas são as mais afetadas, e inclusões marrons nas folhas mais jovens, causadas pela deposição de Fe, as quais se espalham para as nervuras durante a progressão da toxidez também são observadas (CAMARGO, 1984; SAHRAWAT, 2004).

A toxidez indireta resulta da limitação à absorção pelas plantas de diversos nutrientes, como cálcio, nitrogênio, magnésio, potássio, fósforo e do próprio Fe, devido à precipitação do Fe sobre a epiderme das raízes do arroz (capa férrica). A formação dessa camada de óxido férrico bloqueia os sítios de absorção de nutrientes nas raízes, resultando em uma deficiência nutricional múltipla e no amarelecimento das folhas que evolui do ápice para a base, além do espessamento e paralização do

funcionamento das raízes. Nos estádios iniciais de desenvolvimento as plantas sofrem severo retardo no crescimento e afilham pouco. Já em estádios mais avançados o rendimento de grãos é reduzido devido à produção de panículas menores e alta proporção de espiguetas estéreis (YOSHIDA, 1981; LANTIN e NEUE, 1989). Neste caso os sintomas observados na lavoura são raízes escassas, ásperas e se tornam de coloração alaranjadas (CAMARGO, 1984; SAHRAWAT, 2004).

#### **2.2.2.2 Mecanismos de tolerância**

Tanto a toxidez quanto a falta de Fe afetam o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas, levando a perdas de rendimento significativas. Para se adaptar a estas condições, as plantas de arroz desenvolveram diferentes mecanismos de tolerância (Tipo I, Tipo II e Tipo III) que são baseados em formas específicas de uso, exclusão e armazenamento de Fe. No tipo I há uma oxidação e precipitação de  $\text{Fe}^{2+}$  na superfície da raiz, enquanto no Tipo II o armazenamento ocorre de forma menos reativa, na proteína ferritina. O mecanismo do tipo III é baseado na tolerância às espécies reativas a oxigênio formadas na reação de Fenton. Outro mecanismo que pode ocorrer é a anulação de  $\text{Fe}^{2+}$  absorvido pelo seu armazenamento em folhas velhas ou menos ativas ou exclusão via simplasto (revisado por SANTOS et al., 2017).

### **2.3 Autofagia**

A autofagia (auto alimentação) é a principal rota de degradação e reciclagem de material citoplasmático, incluindo proteínas individuais, agregados, corpos lipídicos, ácidos nucleicos e organelas inteiras. Este processo está envolvido principalmente na manutenção da homeostase celular (modulação dos níveis dos principais reguladores, remoção de detritos celulares e reposição dos nutrientes essenciais necessários para o crescimento), adaptação a estresse e resposta imune, além de promover morte celular programada em diferentes situações (revisado por ÜSTÜN et al., 2017; revisado MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

Em plantas tem sido descrito três tipos de autofagia, microautofagia, macroautofagia e mega-autofagia. Na microautofagia, o material citoplasmático se reúne na superfície do vacúolo e fica preso pela invaginação do tonoplasto, seguido da cisão para liberação de vesículas intravacuolares contendo os componentes

celulares para degradação (Figura 4). Por outro lado, na macroautofagia, o conteúdo para degradação fica preso em vesículas citoplasmáticas, que surgem pela expansão de um fagóforo em forma de taça que circunda o citoplasma e se fecha para gerar um autofagossomo com membrana dupla. A membrana externa do autofagossomo se funde com tonoplasto para liberar a vesícula interna como um corpo autofágico (Figura 4). Em ambas as vias, ocorre quebra da membrana da vesícula para expor o conteúdo a ação das hidrolases vacuolares, que degradam os componentes em suas partes para exportação para o citoplasma (Figura 4) (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

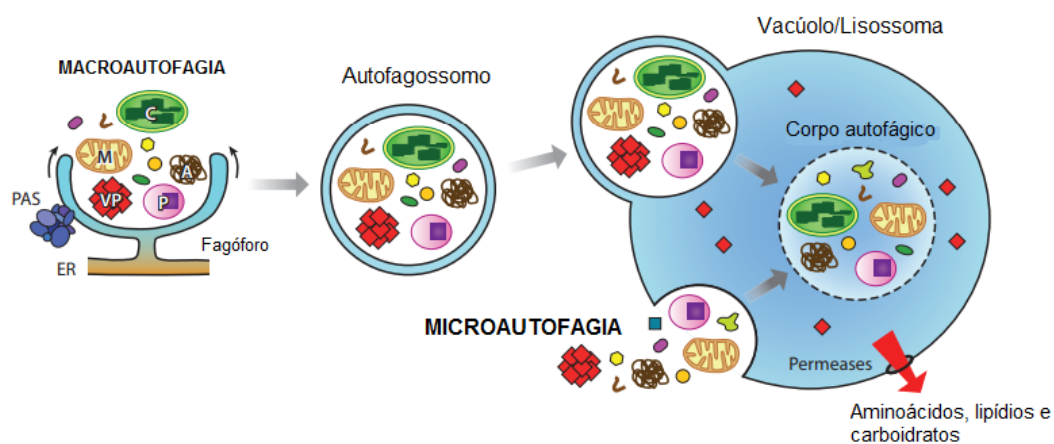


Figura 4 – Tipos de autofagia.  
Fonte: Adaptado de Marshall e Vierstra, 2018.

A mega-autofagia ocorre quando o tonoplasto se rompe para liberar hidrolases vacuolares diretamente no citoplasma, para degradação do conteúdo citoplasmático. Este momento é a etapa final da morte celular programada, que ocorre durante o desenvolvimento (xilogênese) ou em resposta a invasão de patógenos (hipersensibilidade) (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

O mecanismo de autofagia requer a ação conjunta de mais 30 genes (*ATG – autophagy related genes*). Inicialmente identificados em leveduras, genes *ATGs* apresentam ortólogos em eucariotos superiores e formam uma rede altamente conservada entre as espécies. Algumas dessas proteínas se agrupam e promovem a indução da autofagia de acordo com a condição da célula, transporte de membranas, nucleação de vesículas, expansão e fechamento do fagóforo, entrega do autofagossomo no vacúolo e por fim quebra da membrana da vesícula e degradação do conteúdo (Figura 5) (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

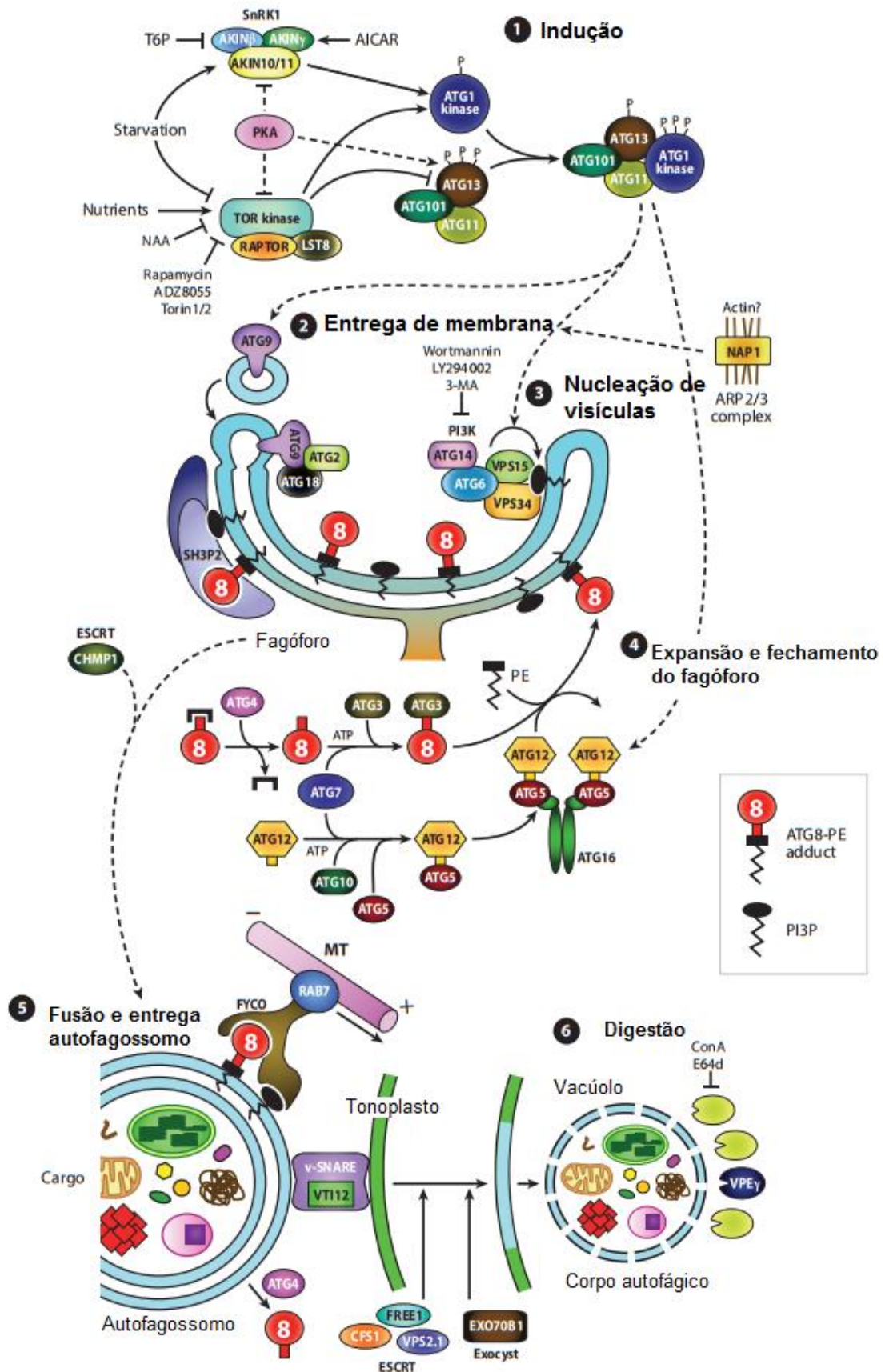


Figura 5 – Etapas da macroautofagia.  
 Fonte: Adaptado de Marshall e Vierstra, 2018.

Na macroautofagia, sinais de desenvolvimento e nutricionais convergem para montagem do complexo ATG1 quinase. No entanto, o regulador negativo TOR (*Target of rapamycin*) que é uma serina-treonina quinase, junto com seus efetores RAPTOR e LST8 (*Lethal with sec thirteen protein 8*) são ativados quando há nutrientes, promovendo o aumento do crescimento celular e a tradução de proteínas e a inibição da autofagia. Quando TOR está ativo, bloqueia a autofagia devido a fosforilação de ATG13, prevenindo a associação de ATG13 com ATG1. Porém, em situações de deficiência de nutrientes TOR fica inativo, permitindo que a autofagia ocorra. Nesse caso, através de eventos de fosforilação há a ativação de ATG1 quinase, que inclui as subunidades ATG11 e ATG101, que juntamente com ATG13 estimulam as etapas seguintes de autofagia, provavelmente via eventos de fosforilação (Figura 5) (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

Para continuidade do processo, é necessário a entrega de lipídios para o fagóforo em expansão, que é impulsionado pela proteína transmembrana ATG9, juntamente com seus fatores de ciclagem ATG2 e ATG18. Outra etapa é a introdução de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) no fagóforo, pela ação de um complexo contendo a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína vacuolar 34 (VPS34 - *vacuolar protein sorting 34*), junto com ATG6 (VPS30), ATG14 e VPS15 (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

A macroautofagia requer dois sistemas de conjugação *ubiquitin-like*, envolvendo ATG8 e ATG12. O precursor inativo do ATG8 é processado pela ação da protease ATG4 para expor uma glicina C-terminal. ATG8 é ativado na glicina pela enzima E1-*like* (ATG7), depois transferido para enzima de conjugação E2-*like* (ATG3) e posteriormente conectado via ligação a fosfatidiletanolamina – PE (ATG8-PE). ATG12 também é ativada por E1-*like* (ATG7) e depois transferida para E2-*like* (ATG10) e por fim conjugada com ATG5. ATG12-ATG5 interage com ATG16, formando o complexo ATG12-ATG5-ATG16, essencial para macroautofagia (revisado por LIU e BASSHAM, 2012). ATG8-PE reveste o fagóforo e ajuda a selar a vesícula, recrutando proteínas (*BIN/Amphiphysin/RYS* – BAR e *SRC Homology-3* – SH3 e SH3P2) que trabalham conjuntamente para estimular a curvatura do fagóforo. A biogênese do autofagossomo também envolve o complexo de nucleação de Actina, proteína relacionada a Actina 2/3 (ARP2/3) (Figura 5) (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

Depois de formados, os autofagossomos revestidos de ATG8 e PI3P são transportados para o vacúolo usando a rede de microtúbulos controlado pelo complexo ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*). Os autofagossomos se fundem com o tonoplasto usando fatores v-SNARE (vesicular soluble n-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptor) (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018).

## **2.4 Relação da autofagia com estresses abióticos**

Quando se trata de estresses abióticos como o causado por excesso de ferro, a autofagia pode desempenhar um papel importante na reciclagem de proteínas oxidadas e organelas danificadas após o estresse oxidativo. Um estudo realizado com arroz, submetido ao estresse causado por sal e metil viologen, foi observado que o gene *OsATG10b* desempenha um papel importante na sobrevivência de células de arroz contra danos oxidativos (revisado por AVIN-WITTENBERG, 2019).

Recentemente, tem sido demonstrado que o aumento dos níveis de RNA de muitos genes *ATG*, ocorre em vários tipos de estresse abiótico e em várias espécies de algas e plantas, incluindo *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*, tomate, pimenta, arroz e trigo. Esse resultado evidencia que a autofagia é transcricionalmente regulada sob estresse abiótico. No entanto, o mecanismo direto que governa essa regulação é atualmente desconhecido (revisado por AVIN-WITTENBERG, 2019).

Um tema comum que surge quando se examina a conexão entre autofagia e estresse abiótico é o acúmulo de espécies reativas a oxigênio (EROS). Embora os baixos níveis de EROS funcionem como moléculas sinalizadoras, níveis mais altos de EROS podem causar danos oxidativos a macromoléculas e podem resultar em efeitos prejudiciais à célula. A reciclagem dessas macromoléculas danificadas é, portanto, imperativa para a sobrevivência celular (revisado por AVIN-WITTENBERG, 2019).

Inúmeros estudos demonstraram que a autofagia é induzida por ROS, devido ao aumento da expressão gênica de genes associados a autofagia e na formação de autofagossomos. Além disso, mutantes *atg* mostraram acumular proteínas oxidadas sob estresse oxidativo, indicando que o dano direto às proteínas pode induzir a autofagia (SHIN et al., 2009).

## 2.5 Expressão genica

Os organismos multicelulares possuem a tendência de manter o mesmo material genético herdado na maioria de suas células ao longo de diferentes processos celulares (ZOU et al., 2011). No entanto, estes organismos possuem mecanismos moleculares diversificados, que incluem a expressão de genes que controlam o metabolismo durante a diferenciação e o desenvolvimento. A regulação da expressão gênica em diferentes tecidos e órgãos, durante vários estádios de crescimento e desenvolvimento, ou como consequência de estímulos externos, é mediada nos níveis transcricional, pós-transcricional e pós-traducional. A regulação transcricional desempenha importante papel na ativação e supressão da expressão e é amplamente controlada por meio de promotores de genes e seus elementos reguladores *cis* (ZOU et al., 2011), que são reconhecidos e ligados por fatores de transcrição.

É de grande importância a realização de estudos com promotores de genes para a compreensão da regulação da expressão de genes em plantas. Estes promotores podem ser agrupados nas seguintes classes: (a) promotores constitutivos - ativos na maioria dos tecidos e estádios de desenvolvimento; (b) promotores espaço-temporais - fornecem expressão específica de tecido ou específica de estádio; e (c) promotores induzíveis - regulados pela aplicação de um sinal químico ou físico externo (ZOU et al., 2011).

## 3 Material e Métodos

### 3.1 Material vegetal

Sementes de arroz de genótipos contrastantes para a FeT (BR IRGA 409 – sensível e EPAGRI 108 – tolerante) foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (2,5%), e posteriormente foram depositadas sobre papel de germinação (Germitest®) umedecido (água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel), dentro de caixas acrílicas transparentes (gerbox). As caixas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C e com fotoperíodo de 16h de luz durante sete dias. Após este período as plântulas foram transplantadas para recipientes com capacidade de 700mL, contendo solução hidropônica (YOSHIDA et al., 1976) e permaneceram nessa condição durante três dias para adaptação. Em seguida, as plântulas do

tratamento controle foram transferidas para uma nova solução hidropônica padrão e as plântulas do tratamento toxidez por excesso de Fe foram transferidas para solução hidropônica acrescida de 300mg L<sup>-1</sup> de ferro (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), que é a concentração indicada para triagem de cultivares tolerantes (ELEC et al., 2013), permanecendo nestas condições durante cinco dias. A solução acrescida de 300 mg L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O foi oxigenada com a utilização de aerador de aquário durante todo o período do experimento.

O experimento foi conduzido em tanque hidropônico (16h de luz, 25°C e 80% de UR), com seis repetições em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo que cada recipiente contendo dez plântulas constituiu uma repetição. Após o período estabelecido três repetições de cada tratamento foram avaliadas fenotipicamente e três foram utilizadas para a coleta de material vegetal (parte aérea e raiz), fixadas em N líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de RNA.

Para fenotipagem foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz principal (CRP), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). Após avaliação de CPA e CRP foi feita a determinação de MSPA e MSR. Para isso, partes aéreas foram separadas das raízes e ambas foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de ar forçado a 80°C por 96h. Posteriormente, as amostras foram pesadas em balança analítica com precisão de 0.001g.

Levando em consideração que as cultivares estudadas apresentam características intrínsecas de desenvolvimento, para avaliação do efeito da FeT nas características fenotípicas foi calculado o desempenho relativo  $DR_x = (\text{Desempenho da variável na condição estresse} / \text{Desempenho da variável na condição controle}) * 100$ . Os resultados foram apresentados em um *heat map* usando o *software Multi Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003).

### 3.2 Expressão dos genes ATG

O RNA total foi extraído a partir de 2g de tecido vegetal fresco da parte aérea e de raízes utilizando Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA foram verificadas em espectrofotometria (NanoVue™ Plus Spectrophotometer) e a qualidade e integridade

foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, as amostras foram tratadas com *DNase I* (Invitrogen®) para eliminação de DNA contaminante. Reações de PCR utilizando o RNA não convertido em cDNA foram realizadas para confirmar a ausência de DNA genômico. Cada amostra (1 µg) foi convertida em cDNA usando oligo(dT) e o kit comercial *SuperScript III first-strand system for RT-PCR* (Invitrogen®) de acordo com as recomendações do fabricante.

As sequências das regiões codificadoras correspondentes aos genes *ATG* foram obtidas no banco de dados RAP-DB (*Rice Annotation Project Database*) (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Quando os genes apresentavam transcritos alternativos, os primers foram sintetizados na região conservada entre esses transcritos buscando quantificar a expressão de ambos. O desenho de oligonucleotídeos foi feito no Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER et al., 2007), de acordo com as recomendações da Applied Biosystems.

O experimento de qRT-PCR foi realizado de acordo com o manual MIQE (BUSTIN et al., 2009) usando oligonucleotídeos para os genes *ATG* e três genes de referencia *AK059783*, *OsEF1* e *OsNAPB* (Tabela 2). A validação dos oligonucleotídeos foi conduzida utilizando quatro diluições (fator de diluição 1:5) de um *pool* de cDNA visando determinar a eficiência de amplificação e a especificidade. Neste estudo foram utilizados oligonucleotídeos que apresentaram eficiência de 90 a 120% e com apenas um pico na curva de dissociação. A análise de expressão gênica foi feita em termociclador *Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system* usando o reagente *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Três replicatas biológicas independentes de cada amostra e três replicatas técnicas de cada replicata biológica foram usadas para a análise de expressão gênica. A quantificação da expressão foi calculada de acordo com o método  $\Delta\Delta C_t$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

A expressão dos genes de referência *AK059783*, *OsEF1* e *OsNAPB* foi submetida a análise de estabilidade no DataAssist™ v3.0 Software (Applied biosystems). Os genes *OsEF1* e *OsNAPB* apresentaram valores de *score* abaixo de 1.5 e foram utilizados para normalizar os dados de expressão dos genes alvo *ATG*.

### 3.3 Predição da estrutura gênica do *OsATG7* e *OsATG18a*

Os genes *OsATG7* e *OsATG18a* apresentaram transcritos alternativos. Dessa forma, procedeu-se uma análise da estrutura gênica para avaliar o efeito do *splicing* alternativo. Para isso, foram utilizados os softwares Augustus (STANKE e MORGENSTERN, 2005) e Gene Structure Display Server 2.0 (HU et al., 2014).

### 3.4 Identificação de elementos de regulação *cis* (CRE)

A região promotora predita (1Kb *upstream*) de cada gene *OsATG* estudado foi obtida no banco de dados RAP-DB. Para os genes que apresentaram promotores alternativos, ambos foram considerados para análise. Posteriormente a sequência promotora foi submetida à análise de presença de elementos de regulação *cis* (CREs) no banco de dados New PLACE (A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) (HIGO et al., 1999). A identificação de CREs compartilhados e específicos entre os promotores analisados foi observado a partir de um diagrama de Venn desenvolvido com programa Orange (DEMSAR et al., 2013).

Tabela 2 – Informações dos oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão gênica.

| Gene            | Nome                                        | ID              | Sequência F 5'→3'      | Sequência R 5'→3'           | T °C | Eficiência % | Score | Referência         |
|-----------------|---------------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------------|------|--------------|-------|--------------------|
| <i>OsNAPB</i>   | <i>Nucleic acid binding protein</i>         | Os06g0215200    | GGAATGTGGACGGTGACACT   | TCAAAATAGAGTCCAGTAGATTTGTCA | 60   | 91,76        | 1,2   | Narsai et al. 2010 |
| <i>OsEF1-α</i>  | <i>Eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> | Os03g0177500    | TGGTATGGTGGTGACCTTTG   | GTACCCACGCTTCAGATCCT        | 60   | 111,97       | 1,2   | Jain et al. 2006   |
| <i>AK059783</i> | <i>AK059783</i>                             | <i>AK059783</i> | CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA | ACACTTCACCGGACCATTCAA       | 60   | 107,05       | 2,4   | Jain et al. 2006   |
| <i>OsATG3a</i>  | <i>Autophagy-related genes 3a</i>           | Os01g0200000    | CCCTTGACGCTTCGTCTTC    | ACCTTCTGCTTCACCTGCAT        | 60   | 104,984      | -     | -                  |
| <i>OsATG4a</i>  | <i>Autophagy-related genes 4a</i>           | Os03g0391000    | AACTGGGGCTGTATGGTCAG   | CTGTGAGGGCTTTCTCCAAG        | 60   | 112,44       | -     | -                  |
| <i>OsATG5</i>   | <i>Autophagy-related genes 5</i>            | Os02g0117800    | ACGGAGGGAGGAAGGTAGAA   | TCATTAGGGGCTGAATCTGG        | 60   | 120,457      | -     | -                  |
| <i>OsATG7</i>   | <i>Autophagy-related genes 7</i>            | Os01g0614900    | ACCGGTTATTATACTCCACGCC | AATTGGCAGAAGGTGGCAGT        | 60   | 105,67       | -     | -                  |
| <i>OsATG8a</i>  | <i>Autophagy-related genes 8a</i>           | Os07g0512200    | CGACTTCCTTCCTTCCTTCC   | AGTCCTGGCCATCTCCAAC         | 60   | 105,45       | -     | -                  |
| <i>OsATG10b</i> | <i>Autophagy-related genes10b</i>           | Os12g0506800    | TCAGCGATGATGCTTGGGTA   | AGGCACCATCAATAAGCAGGT       | 60   | 104,21       | -     | -                  |
| <i>OsATG16</i>  | <i>Autophagy-related genes 16</i>           | Os09g0497700    | CACACAGCTCGTGCTAAGGA   | AGCTTCTACATGTGGCTCGG        | 60   | 102,33       | -     | -                  |
| <i>OsATG18a</i> | <i>Autophagy-related genes 18a</i>          | Os02g0791800    | AGATGCTCACGAGTCTCCCT   | CCAGAAGCTGTTGCCAGGTA        | 60   | 104,46       | -     | -                  |

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Efeitos da FeT na planta

Sob condições de FeT ocorre o afeta negativamente do desenvolvimento das plantas de arroz levando a redução de produtividade. Este dano pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta sendo que, quando ocorre no estágio inicial, compromete o estabelecimento da lavoura. As características morfológicas que podem ser afetadas pela FeT incluem CPA, CR, MSPA e MSR (SILVEIRA et al., 2007; VIANA et al., 2017), assim estas variáveis foram avaliadas neste trabalho. Estudos prévios têm apontado que as cultivares EPAGRI 108 e BR IRGA 409 apresentam tolerância e sensibilidade à FeT, respectivamente (SILVEIRA et al., 2007; VIANA et al., 2017; STEIN et al., 2019). Para a utilização deste modelo neste estudo, realizou-se um ensaio onde foi verificada a manutenção da resposta observada previamente (Figura 6a).

Quando em maior disponibilidade, o Fe pode causar toxidez direta (bronzamento) e indireta (deposição de placas de Fe nas raízes) em plantas de arroz (dos SANTOS et al., 2017). Nesse estudo observou-se que a cv. BR IRGA 409 apresentou maior deposição de placas férricas sobre as raízes (Figura 6b), o que indica que a sua sensibilidade também pode ser decorrente de toxidez indireta.

O CPA e MSPA foram afetados negativamente pela FeT na cv. BR IRGA 409 (Figura 6c). O CR também apresentou um comprometimento sob FeT nesta cv. (Figura 6d). Interessantemente, o MSR foi maior na cv. BR IRGA 409, o que pode ser explicado pela maior formação de placa férrica nas raízes desse genótipo, como reportado previamente (STEIN et al., 2019).

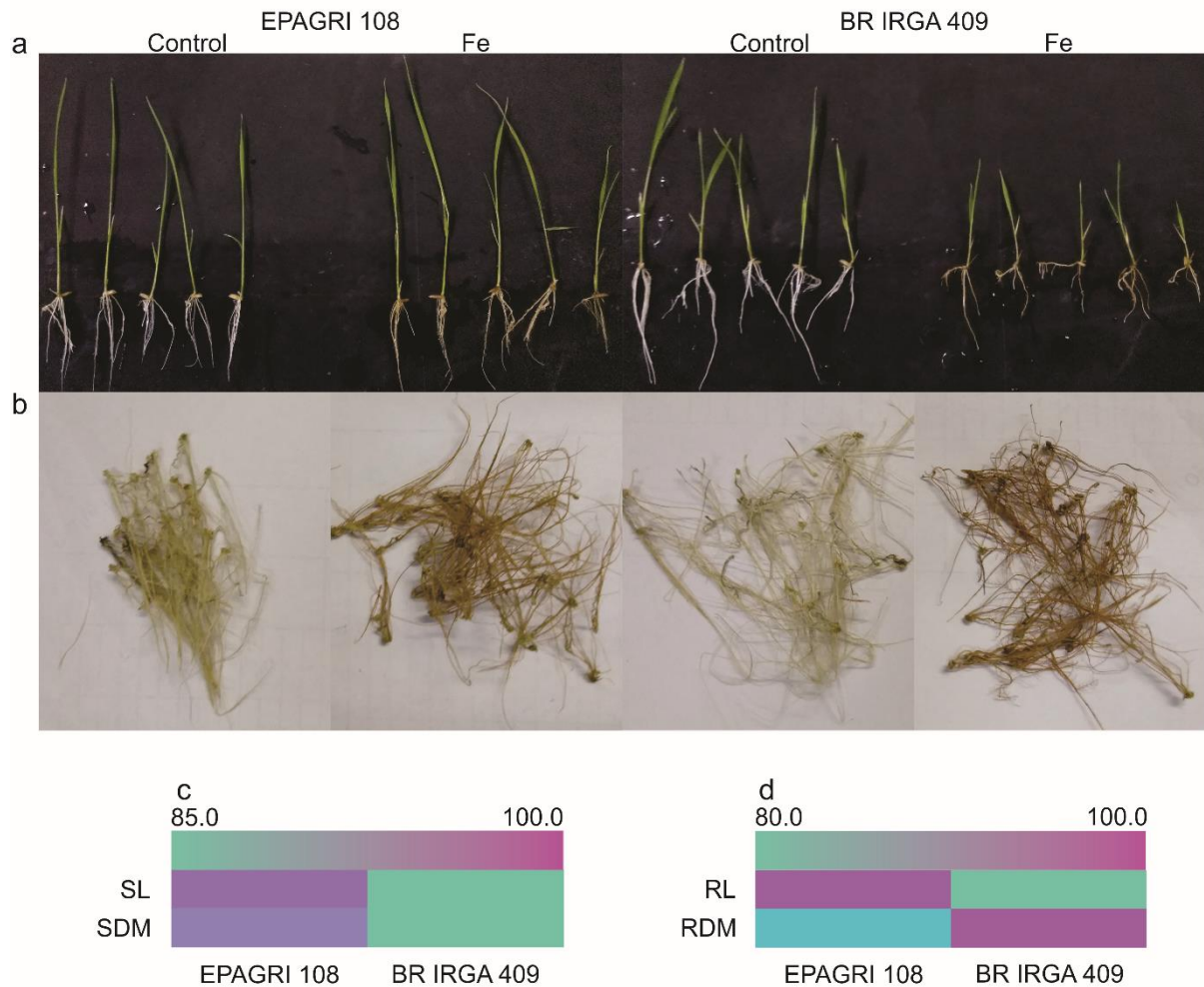


Figura 6 – Caracterização fenotípica dos genótipos de arroz Epagri 108 (tolerante a toxidez por Fe) e BR IRGA 409 (sensível à toxidez por Fe) sob excesso de ferro ( $300\text{mg L}^{-1}$ ). a: Comportamento geral das plantas das duas cultivares de arroz sob excesso de ferro. b: Placa de férrica nas raízes das duas cultivares de arroz. c: Caracteres morfológicos da parte aérea (comprimento da parte aérea - SL e massa seca da parte aérea - SDM) apresentados em desempenho relativo. d: Caracteres morfológicos da raiz (comprimento da raiz - RL e massa seca da raiz - RDM) apresentados em desempenho relativo. Em c e d a cor rosa representa desempenho relativo próximo a 100% e o verde representa desempenho relativo abaixo de 100%.

Considerando o perfil morfológico obtido, este modelo auxilia na identificação das vias de sinalização envolvidas com a tolerância a FeT. Nesse sentido, utilizou-se estas cvs. para investigar o perfil transcricional de genes envolvidos com a autofagia e estabelecer pela primeira vez uma associação entre a autofagia e a tolerância a FeT em arroz.

#### 4.2 Ativação dos genes *OsATG* em resposta a toxidez por excesso de ferro

Tem sido verificado o aumento da expressão de genes *ATG* em vários tipos de estresses abióticos em algas e plantas, incluindo *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*, tomate, pimenta, arroz e trigo (revisado por AVIN-WITTENBERG, 2019). Entretanto,

nenhum estudo foi realizado com estresse causado pela FeT. A autofagia requer dois sistemas de conjugação *ubiquitin-like*, envolvendo ATG8 e ATG12. O precursor inativo do ATG8 é processado pela ação de uma cisteína protease, ATG4, para expor a glicina C-terminal. ATG8 é ligado na glicina pela enzima E1-*like* (ATG7), depois transferido para enzima de conjugação E2-*like* (ATG3) e posteriormente conectado via ligação a fosfatidiletanolamina – PE (ATG8-PE). Paralelamente, o ATG12 participa de um processo de conjugação, sendo também ativada por E1-*like* (ATG7) e depois transferida para E2-*like* (ATG10) e por fim conjugada com ATG5 (possivelmente E3-*like*). O complexo ATG12-ATG5 pode atuar como E3-*like* durante a conjugação ATG8-PE. Além disso, há evidências que ATG12- ATG5 interage com ATG16, formando o complexo ATG12-ATG5-ATG16, cuja função ainda não é bem elucidada (revisado por LIU e BASSHAM, 2012). ATG8-PE reveste o fagóforo e ajuda a selar a vesícula, recrutando proteínas que trabalham conjuntamente para estimular a curvatura do fagóforo. A maioria destas proteínas é codificada por famílias gênicas (XIA et al., 2011). Dessa forma, foi selecionado pelo menos um gene codificante para cada proteína ATG envolvida no processo de conjugação (*OsATG3a*, *OsATG4a*, *OsATG5*, *OsATG7*, *OsATG8a*, *OsATG10b*, *OsATG12* e *OsATG16*). Além desses, também foi estudado o gene *OsATG18a* cujo produto está envolvido no início da formação do fagóforo através da entrega de lipídeos para a membrana em expansão (revisado por MARSHALL e VIERSTRA, 2018). O papel do gene *ATG18a* é determinante na tolerância a estresses abióticos. O silenciamento do gene *ATG18a* resulta em uma maior sensibilidade a estresses em plantas de *Arabidopsis* enquanto que a superexpressão leva ao aumento da tolerância a estresses em plantas de maçã, *Arabidopsis* e tomate (LIU et al., 2009; revisado por WANG et al., 2017; SUN et al., 2018).

Sob condição de excesso de ferro verificou-se um aumento no acúmulo de transcritos dos genes *OsATG3a*, *OsATG4a*, *OsATG5*, *OsATG7*, *OsATG8a*, *OsATG10b* e *OsATG18a* na parte aérea da cv. Epagri 108, enquanto que na cv. BR IRGA 409 estes genes foram reprimidos. Os genes *OsATG12* e *OsATG16* foram ativados e reprimidos, respectivamente, na parte aérea de ambas as cultivares (Figura 7). No tecido radicular, a maioria dos genes estudados apresentou perfil transcricional semelhante ao da parte aérea (Figura 7). Considerando os estudos prévios, onde os autores verificaram que o aumento da expressão dos genes ATGs está associada com a tolerância a estresses (LIU et al., 2009; KUZUOGLU-OZTURK et al., 2012;

ZHOU et al., 2013; WANG et al., 2015; ZHAI et al., 2016; LUO et al., 2017; WANG et al., 2017; SUN et al., 2018; ZHU et al., 2018). Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a autofagia está associada com a resposta a FeT em plântulas de arroz da cv. EPAGRI 108.

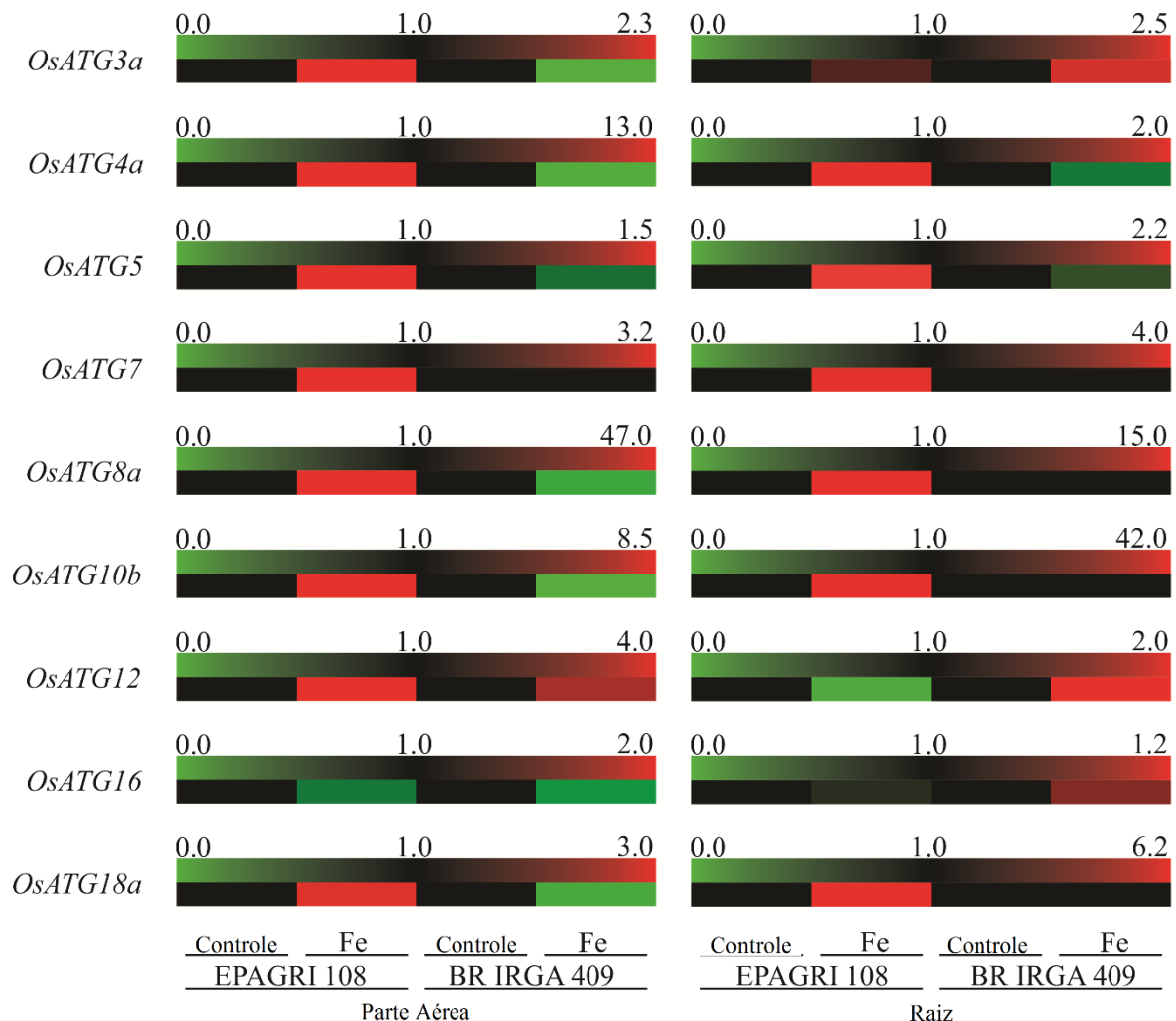


Figura 7 – Quantificação relativa da expressão do gene *OsATGs* nos tecidos da parte aérea e da raiz dos genótipos EPAGRI 108 e BR IRGA 409 submetidos a excesso de ferro (300mg L<sup>-1</sup>) por cinco dias.

Embora os genes *OsATG* apresentem comportamento similar com relação a ativação ou repressão em resposta a FeT nas cultivares tolerante e sensível, uma ampla variação no acúmulo de transcritos entre os genes foi observada (Figura 7). Esse acúmulo diferencial é interessante, já que mesmo atuando na mesma rota, as proteínas são requeridas em quantidades diferentes. Por exemplo, as proteínas ATG8 produzidas fazem parte da estrutura do fagóforo apresentando uma demanda maior, enquanto que as demais atuam no processamento da ATG8, podendo desempenhar essa função várias vezes.

### 4.3 Consequências do *splicing* alternativo dos genes *OsATG7* e *OsATG18a*

Os genes *OsATG7* e *OsATG18a* apresentam transcritos alternativos. Após dissecação da estrutura do gene verificou-se que o *splicing* se dá através da utilização de promotores alternativos (Figura 8). No gene *OsATG7* os transcritos alternativos codificam proteínas com tamanhos diferentes, já que o transcrito *OsATG7.2* utiliza parte da região gênica como região promotora. Por outro lado, no gene *OsATG18a*, os transcritos alternativos codificam proteínas com o mesmo tamanho, uma vez que o promotor alternativo do transcrito *OsATG18a.2* corresponde a UTR 5' do transcrito *OsATG18a.1* (Figura 8).

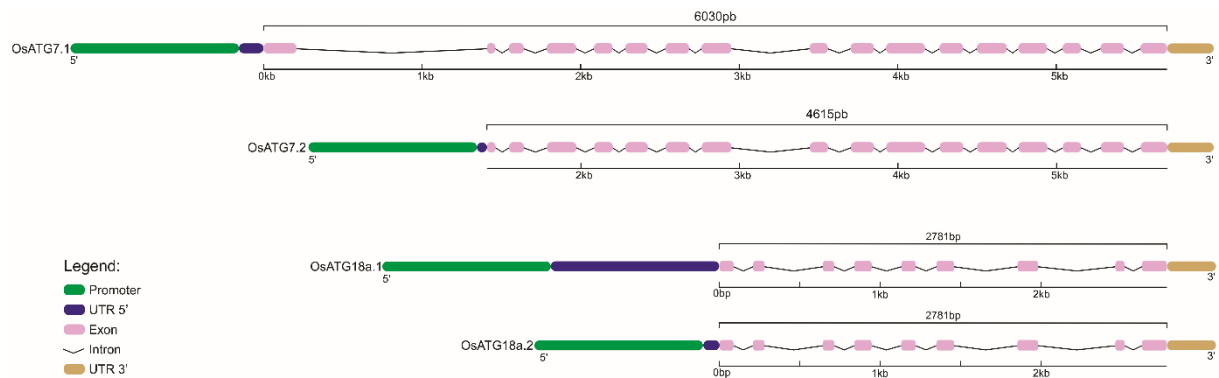


Figura 8 – Estrutura dos genes *OsATG7* e *OsATG18a* demonstrando a ocorrência de *splicing* alternativo decorrente de promotor alternativo.

Para sobreviver em condições desfavoráveis as plantas induzem o mecanismo de *splicing* alternativo para regular a expressão de genes responsivos a estresses, reprogramando as redes regulatórias intracelulares (DUBROVINA et al., 2013). *Splicing* alternativo confere vantagens para os indivíduos, pois um único gene pode codificar diferentes proteínas favorecendo o mecanismo de adaptação em ambientes adversos. Em plantas de arroz submetidas a FeT já tem sido reportado mudanças no padrão de *splicing* de genes associados ao estresse (JUNIOR et al., 2015). A presença de *splicing* alternativo como processamento do mRNA do gene *OsATG7*, que resulta em proteínas de tamanho diferente, pode favorecer a planta sob condições adversas. No caso do gene *OsATG18a*, que embora o *splicing* resulte na mesma sequência proteica, a regulação transcricional é diferencial já que os promotores apresentam sequências regulatórias diferentes. Isso possibilita a ativação da transcrição em condições específicas, colaborando com o mecanismo de adaptação ao estresse.

#### 4.4 Caracterização da regulação da transcrição dos genes *OsATG*

Para que ocorra a ativação dos genes durante a autofagia é necessário que os promotores apresentem sequências regulatórias semelhantes. Por outro lado, considerando que os produtos gênicos são requeridos em quantidades diferentes, também é necessária a presença de sequências regulatórias diferentes entre eles. Nesse sentido, para elucidar essa questão, os promotores foram analisados quanto à ocorrência de elementos reguladores *cis* (CREs).

Nos genes *OsATGs* analisados verificou-se CREs compartilhados entre os promotores, o que já era esperado uma vez que estes genes atuam no mesmo processo biológico. No entanto, estes genes também apresentam CREs exclusivos em determinados promotores, indicando uma regulação direcionada para situações específicas (Apêndice A).

O envolvimento dos fatores de transcrição (TFs) WRKY na sinalização em resposta a FeT em arroz já foi elucidada (RICACHENEVSKY et al., 2010; FINATTO et al., 2015; VIANA et al., 2017; STEIN et al., 2019). Ainda, foi reportado que os genes codificantes para WRKYs são sinalizados por ácido abscísico (ABA) (revisado por FINATTO et al., 2018) e um aumento de ABA em arroz submetido a FeT foi verificado por Majerus et al., (2009). Os TFs WRKY reconhecem e se ligam a CREs W-box presentes em regiões promotoras de genes funcionais regulando a expressão em condições específicas (RUSHTON et al., 2010). Os genes *OsATG* apresentaram um grande número de CRE W-box sugerindo a sua regulação por TFs WRKYs (Figura 9a). Porém, estudos prévios demonstraram que os genes *OsWRKYs* são ativados no genótipo sensível BR IRGA 409 em maior intensidade do que no genótipo tolerante EPAGRI 108 (VIANA et al., 2017). Assim, com base no perfil transcricional e na estrutura dos promotores dos genes *OsATGs* se propõe um modelo, onde a repressão dos genes *OsATGs* observada no genótipo sensível pode ser decorrente de modificações pos-transcricionais e pos-traducionais dos genes *OsWRKYs* (Figura 9b). Sabe-se que existe uma regulação muito complexa no processo de transcrição e tradução de genes *OsWRKY*, incluindo a ação de miRNA, siRNAs, ubiquitinas, proteínas VQs, além da autoregulação característica destes fatores de transcrição (revisado por VIANA et al., 2018).

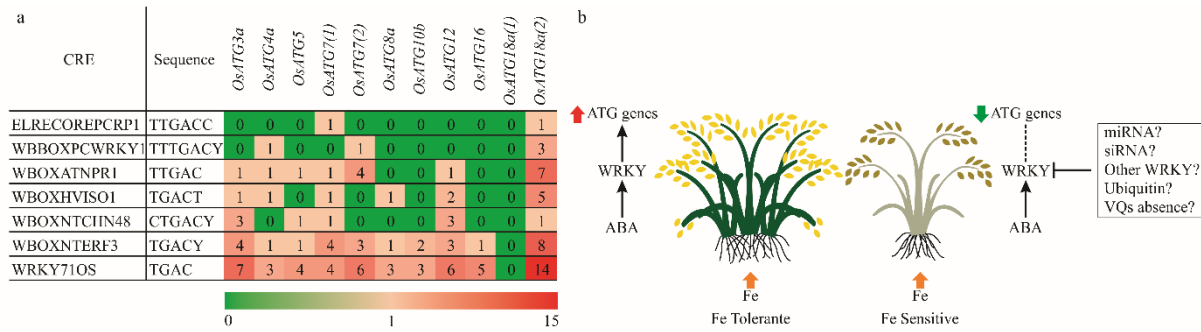


Figura 9 – Envolvimento dos fatores de transcrição WRKY na regulação transcricional dos genes *OsATG* sob toxidez por excesso de ferro (Fe). A: Elementos de regulação *cis* (CRE) alvos de ligação de fatores de transcrição WRKY em promotores dos genes *OsATG*; B: Modelo proposto de regulação de genes *OsATGs* via ativação transcricional por fatores de transcrição WRKY.

Para os genes *OsATG7* e *OsATG18a* que apresentam promotores alternativos verificou-se a presença de CREs específicos (*OsATG7.1* – 39; *OsATG7.2* – 20; *OsATG18a.1* – 8; *OsATG18a.2* – 72), o que pode resultar em perfil transcricional diferencial dos dois transcritos do mesmo gene na mesma condição (Figura 10a-b). Também foi observada a presença de CREs compartilhados, indicando que mesmo ocorrendo *splicing* alternativo, os genes podem ser regulados para atuar na mesma rota.

Em relação aos dois sistemas de conjugação, em que os genes apresentam funções específicas, cujas proteínas são altamente especializadas, observou-se que novamente ocorre regulação compartilhada e específica (Figura 10c-d). Isso garante que esses genes sejam ativados para atuar no processo de autofagia, porém com funções marcadamente distintas.

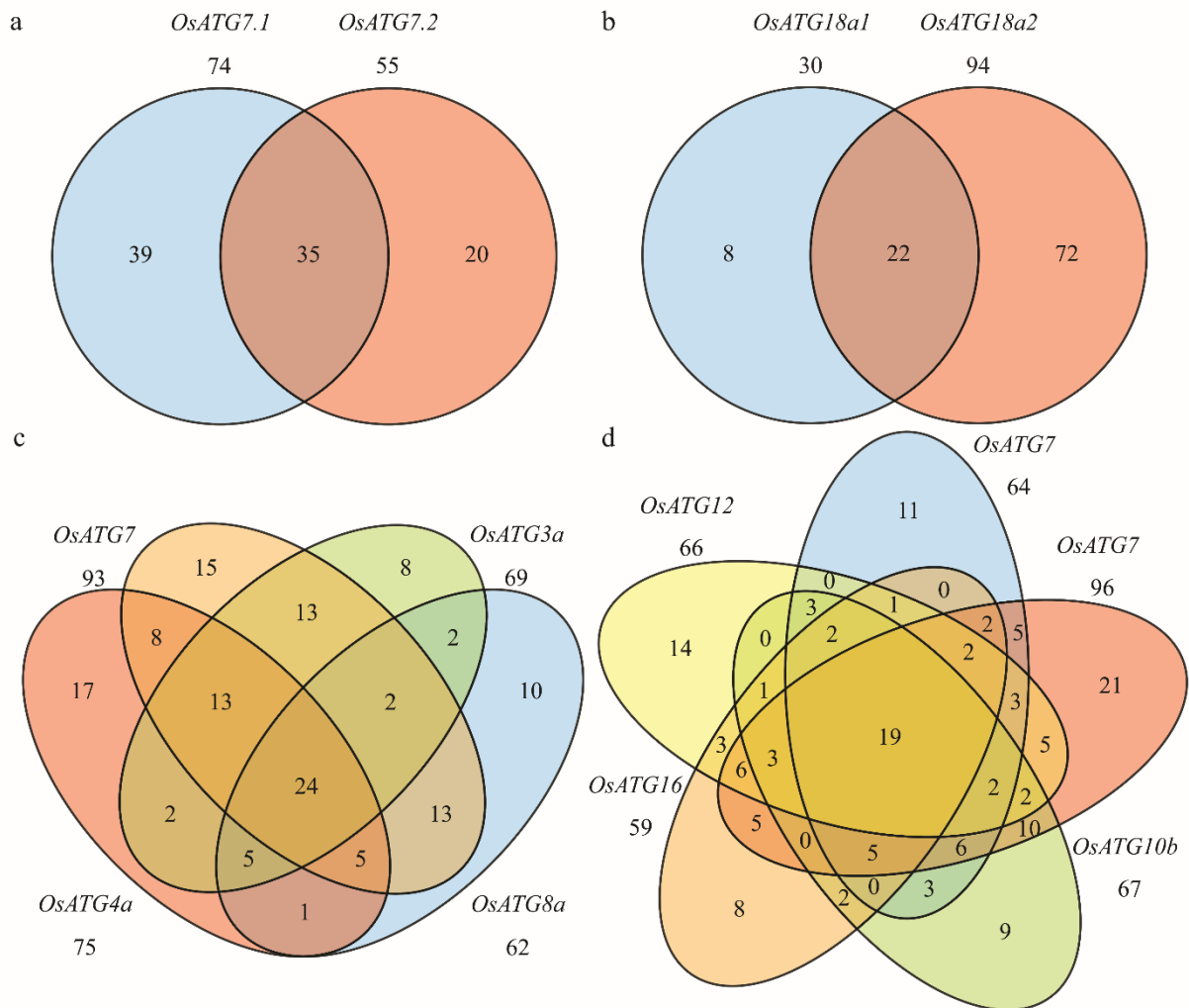


Figura 10 – Diagrama de Venn para a ocorrência de elementos de regulação *cis*. Promotores alternativos dos genes *OsATG7* (a) e *OsATG18a* (b) e promotores dos genes envolvidos nos sistemas de conjugação *ATG8* (c) e *ATG12* (d).

#### 4.5 Sumarização do envolvimento dos genes *OsATG* em resposta a FeT

Parece que a tolerância à FeT está associada a intensificação do mecanismo de autofagia, ou seja, organelas e demais componentes citoplasmáticos danificados pelo estresse oxidativo decorrente do FeT são enviados para a degradação no vacúolo e reciclados para a manutenção da homeostase celular. Por outro lado, quando a maquinaria de autofagia não é intensificada os danos podem levar a morte celular. O mais interessante é que a sinalização para a ativação da autofagia parece ser mediada por TFs WRKY cuja rede de sinalização é dependente de ABA (Figura 11).

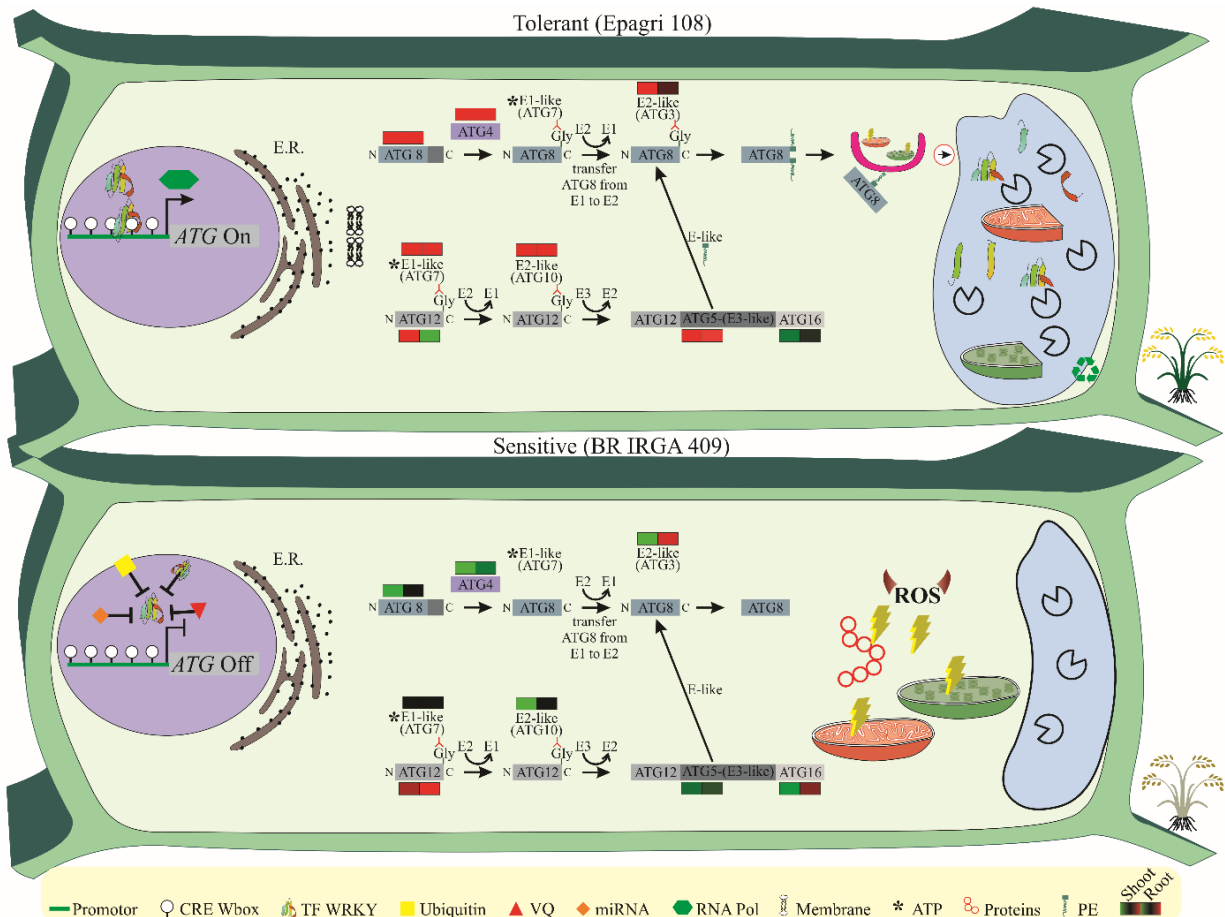


Figura 11 – Sumarização da regulação e expressão de genes *OsATGs* em plântulas de arroz submetidas a toxidez por excesso de ferro. Para cada gene é apresentada a expressão relativa para parte aérea e raiz, a cor verde indica que a expressão foi reduzida em relação ao controle e vermelho indica que a expressão foi aumentada em relação ao controle. Tolerant = tolerante; sensitive = sensível; promotor = promotor; ubiquitin = ubiquitina; membrane = membrana; proteins = proteínas; shoot = parte aérea; root=raiz.

## 5 Conclusão

Genes *OsATG* apresentam expressão diferencial em plântulas de arroz sob FeT. Nessa condição, ocorre um aumento de expressão na maioria dos genes *OsATG* estudados na cultivar tolerante (EPAGRI 108). Por outro lado, na cultivar sensível (BR IRGA 409) não há indução da maioria desses genes. A região promotora dos genes *OsATG* apresentam elementos *cis* W-box, alvos de fatores de transcrição WRKY, sugerindo a participação desses fatores de transcrição na regulação dos genes *OsATG*.

Este estudo traz os primeiros indícios da relação da autofagia com o estresse causado por FeT em plântulas de arroz. O fato que os genes associados à autofagia são induzidos sob FeT na cultivar tolerante pode ser explorado no melhoramento molecular visando o desenvolvimento de cultivares tolerantes. No entanto, para validar o modelo proposto em condições de FeT, mais estudos são necessários,

principalmente caracterização funcional através de silenciamento ou superexpressão de genes *ATG* além da elucidação dos mecanismos de sinalização.

## Referências

AVIN-WITTENBERG, T. Autophagy and its role in plant abiotic stress management. **Plant Cell Environment**, v. 42, p. 1045-1053, 2019.

BIENFAIT, H. F. Regulated redox process at the plasmalemma of plant root cells and their function on iron uptake. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Baltimore, n. 17, p. 73-83, 1985.

BRAR, D. S.; SINGH, K. Oryza. In: KOLE, C. (Ed.). **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 321–365, 2011.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAMARGO, C. E. O. Tolerância de cultivares de arroz em estágio de plântula a diferentes níveis de ferro em solução nutritiva. **Bragantia**, v.43, n.2, p.369-380, 1984.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. S.; SILVA, S.A. **Condução de populações no melhoramento genético de plantas**. v.I. Editora e Gráfica Universitária - UFPel, 2003. 230p.

COLLINS N. C.; TARDIEU F.; TUBEROSA R. Quantitative Trait Loci and Crop Performance under Abiotic Stress: Where Do We Stand?. **Plant Physiology** 147:469-486, 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – série histórica**. CONAB, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=10>. Acesso em 22 de janeiro de 2019.

CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S. L.; BRIAT, J. F.; WALKER, E. L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**, v. 409, p.346-349, 2001.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. H. Rice: **Nutrient disorders and nutrient management**. The International Rice Research Institute, Manila, The Philippines, p.191, 2000.

DEMSAR, J. et al. ORANGE: data mining toolbox in Python. **The Journal of Machine Learning Research**, v. 14, p. 2349-2353, 2013

DUBROVINA, A. S.; KISELEV K. V.; ZHURAVLEV Y. N. The role of canonical and noncanonical pre-mRNA splicing in plant stress responses. **BioMed Research International**, (5):264314, 2013.

ELEC, V. et al. Maintaining elevated  $\text{Fe}^{2+}$  concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 372, n. 1–2, p. 253–264, 2013.

FINATTO, T. et al. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. **Rice**, v. 8, n. 1, 2015.

FINATTO, T. et al. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? **Genetics and Molecular Biology**, vol.41 no.3. 2018.

GLASZMANN, J. C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 74, p. 1-30, 1987.

GROSS, J.; STEIN, R. J.; FETT-NETO, A. G.; FETT, J. P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**, v.26. n.4, p.477-497. 2003.

HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, n. 216. p.541-551. 2003.

HIGO, K. et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 297–300, 1999.

HORI, T.; AOYAGI, T.; ITOH, H.; NARIHIRO, T.; OIKAWA, A.; SUZUKI, K.; OGATA, A.; FRIEDRICH, M. W.; CONRAD, R.; KAMAGATA, Y. Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron (III) oxides in natural environments. **Front Microbiol** 6:386, 2015.

HU, B.; JIN, J; GUO, A. Y.; ZHANG, H.; LUO, J.; GAO, G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v. 31, n. 8, p. 1296-1297, 2014.

ISHIMARU, Y. et al. Rice plants take up iron as  $\text{NaFe}^{3+}$ -phytosiderophore and as  $\text{Fe}^{2+}$ . **Plant Journal**, v.45, p. 335-346. 2006.

IRGSP - INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.1, n.7052, p.793-800, 2005.

JAIN M.; NIJHAWAN A.; TYAGI AK, K. J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real- time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 345:646–651. 2006

JUNIOR, A. T. A. et al. The Quest for More Tolerant Rice: How High Concentrations of Iron Affect Alternative Splicing? **Transcriptomics** 3: 122, 2015.

KAWAKAMI, Y.; BHULLAR, N. K. Molecular processes in iron and zinc homeostasis and their modulation for biofortification in rice. **Plant Biology Journal of Integrative**. V. 60, p. 1181–1198, 2018.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-152, 2012.

KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; NISHIZAWA N. K. Iron transport and its regulation in plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p.11-20, 2019.

KUZUOGLU-OZTURK, D. et al. Autophagy-related gene, TdAtg8, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response. **Planta**, v. 236, n. 4, p. 1081–1092, 2012.

LANTIN, R. S.; NEUE, H. U. Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice. 17th Irrigated Rice Meeting. Brazil. 26–30 Sep.1989. **Lavoura-Arrozeira**. v.42, p.3–8.1989.

LIU, Y.; XIONG, Y.; BASSHAM, D. C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. **Autophagy**. p. 954-963, 2009.

LIU, Y.; BASSHAM, D. C. Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 215–237, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUO, L. et al. Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. August, p. 1–13, 2017.

MACKILL, D. J.; COFFMAN, W. R.; GARRITY, D. P. Rainfed lowland rice improvement. Manila: **International Rice Research Institute**, 242p., 1996.

MAGALHÃES JR, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Arroz. In: **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Rosa Lia Barbieri; Elisabeth Regina Tempel Stumpf – Editores Técnicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.187-218, 2008.

MAGALHÃES JR, A. M. de et al. A avaliação de Linhagens de Arroz Irrigado quanto à Toxidez por Ferro. **Arroz Irrigado: Resultados de pesquisa do melhoramento genético para tolerância à estresses abióticos, na Embrapa Clima Temperado, 2007/2008**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.37-44, 2009.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; LUTTS, S. Absciscic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant and Soil**. 324:253. 2009.

MARSCHNER. H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, San Diego, USA. p. 889,1995.

MARSHALL R. S.; VIERSTRA R. D. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. **Annual Review of Plant Biology**, 69: 22.1–22.36. 2018.

MOREL, F. M. M.; HERING, J. G. **Principles and Applications of Aquatic Chemistry**. New York: John Wiley and Sons, p. 608, 1993.

MORI, S. Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.250–53,1999.

MÜLLER, C. et al. Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant and Soil**, v. 391, n. 1-2, p. 123-138, 2015.

MUTHAYYA, S. et al. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1324, n. 1, p. 7–14, 2014.

NARSAI R.; IVANOVA A.; NG S.; WHELAN J. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. **BMC Plant Biol.** 10:56. 2010

NCBI Taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> - acessado em 18 de março de 2019.

NOZOYE, T.; WIREN, N.; SATO, Y.; HIGASHIYAMA, T.; NAKANISHI H.; NISHIZAWA N. K. Characterization of the Nicotianamine Exporter ENA1 in Rice. **Plant Science**, v. 10, 2019.

OKA, H. K.; MORISHIMA, H. Wild and cultivated rice. In: MATSUO, T.; FUSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Eds.). **The Science of the Rice Plant**, Volume Three, Genetics. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. cap. 3, p. 88 - 111.

PEGORARO, C.; FARIAS, D. R.; COSTA DE OLIVEIRA, A. *Oryza glumaepatula* Steud. In: T. K. Mondal and R. J. Henry (eds.), **The Wild Oryza Genomes**, 2018.

PONNAMPERUMA, F. N. The chemical of submerged soils. **Advances in Agronomy**, v.24, p. 29-96, 1972.

RICACHENEVSKY, F. K. et al. Identification of Fe-excess-induced genes in rice shoots reveals a WRKY transcription factor responsive to Fe, drought and senescence. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 3735–3745, 2010.

ROBINSON, N. J.; PROCTOR, C. M.; CONNOLLY, E. L.; GUERINOT, M. L. A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature**. v.397, p.694-697.1999

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E.; RINGLER, P.; SHEN, Q. J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**. v. 15, p. 247-258, 2010.

SAEED A. I. et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **BioTechniques**, 34, 374-378. 2003.

SAHRAWAT, K. L. Elemental composition of rice plant as affected by iron toxicity under field conditions. **Communications in Soil Science Plant Analysis**, Philadelphia, v.31, p.2819-2827, 2004.

SANTOS, R. S.; JÚNIOR, A. T. A.; PEGORARO, C.; OLIVEIRA, A. C. Dealing with iron metabolism in rice: from breeding for stress tolerance to biofortification. **Genetics and Molecular Biology**, V. 40, p. 312-325, 2017.

SASAKI, A.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. **Journal of Experimental Botany**, V. 67, p. 3645–3653, 2016.

SCHAAF, G. et al. ZmYS1 functions as a proton-coupled Symporter for phytosiderophore- and nicotianaminechelated metals. **Journal Biological Chemistry**. v.279, p.9091–9096. 2004

SCHMIDT, FABIANA. **Manejo da irrigação por alagamento e a toxidez por ferro no arroz cultivado em casa de vegetação**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Solos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SCHMIDT, F.; FORTES, M.A.; WESZ, J.; BUSS, G.L.; SOUZA, R. O. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 5, 2013.

SHIN, J. H.; YOSHIMOTO, K.; OHSUMI, Y.; JEON J. S.; AN G. OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. **Molecules and Cells**, v. 27, p. 67–74, 2009.

SILVEIRA V. C. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Braz. J. Plant Physiol.** [online]. vol.19, n.2, pp.127-139, 2007.

SOSBAI – SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. In: XXXII REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2018, Farroupilha. Anais. Cachoeirinha, 205 p., 2018.

SOUSA, R. O. de.; GOMES, A. da S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A da S. e MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (eds.). **A cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 305-334, 2004.

SRIVASTAVA, A. K.; LU, Y.; ZINTA, G.; LANG, Z.; ZHU, J. K. UTR-Dependent Control of Gene Expression in Plants. **Trends in plant science**, 2017.

STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W465–W467, 2005.

STEIN, J. C. et al. Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza*. **Nature Genetics**, v. 50, p. 285–296, 2018.

SUN, X.; WANG, P.; JIA, X.; HUO, L.; CHE, R.; MA, F. Improvement of drought tolerance by overexpressing MdATG18a is mediated by modified antioxidant system

and activated autophagy in transgenic apple. **Plant Biotechnology Journal**. V. 16, pp. 545–557, 2018.

TAKAHASHI M.; TERADA Y.; NAKAI I.; NAKANISHI H.; YOSHIMURA E.; MORI S.; NISHIZAWA N. K. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. **Plant Cell** 15:1263-1280, 2003.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W71–W74, 2007.

ÜSTÜN S.; HAFRÉN A.; HOFIUS D. Autophagy as a mediator of life and death in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 40, p. 122–130, 2017.

VIANA, V. E. et al. Iron excess in rice: from phenotypic changes to functional genomics of WRKY transcription factors. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1–16, 2017.

VIANA V. E. et al. Activation of rice WRKY transcription factors: an army of stress fighting soldiers? **Curr Opin Plant Biol**. 45:268-275. 2018

WANG, B.; LI, G.; ZHANG, W-H. Brassinosteroids are involved in Fe homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 9, p. 2749–2761, 2015.

WANG, C. H. et al. Genetic diversity and classification of *Oryza sativa* with emphasis on Chinese rice germplasm. **Heredity**, v. 5, p. 489-496, 2014.

WANG, P.; SUN, X.; JIA, X.; MA, F. Apple autophagy-related protein MdATG3s afford tolerance to multiple abiotic stresses. **Plant Science**, v. 256, p. 53-64, 2017.

WARDA. **Annual Report 2000**. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WIN, K. T. et al. A single base change explains the independent origin of and selection for the non shattering gene in African rice domestication. **New Phytologist**, v. 213, p.1925-1935, 2016.

XIA, K.; LIU, T.; OUYANG, J.; WANG, R.; FAN, T.; ZHANG, M. Genome-Wide Identification, Classification, and Expression Analysis of Autophagy-Associated Gene Homologues in Rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, v. 18, p. 363–377, 2011.

YOSHIDA, S; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory Manual for physiological studies of rice**. IRRI, Las Bano. Laguna, pp. 83, 1976.

YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. Manila, **The International Rice Research Institute**, 269p., 1981.

ZHAI, Y. et al. Autophagy, a Conserved Mechanism for Protein Degradation, Responds to Heat, and Other Abiotic Stresses in *Capsicum annuum* L. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. February, p. 1–13, 2016.

ZHANG Y.; XU Y. H.; YI H.Y.; GONG J. M. Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. **Plant J**, 72:400-410, 2012.

ZHOU, Y.; CHEN, C.; JOHANSSON, M. J. O. The pre-mRNA retention and splicing complex controls tRNA maturation by promoting TAN1 expression. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 5669–5678, 2013.

ZHU, T. et al. Mitochondrial alternative oxidase-dependent autophagy involved in ethylene-mediated drought tolerance in *Solanum lycopersicum*. **Plant biotechnology journal**. v. 16,12, p. 2063-2076, 2018.

ZOU, C.; SUN, K.; MACKALUSO, J. D.; SEDDON, A. E.; JIN, R.; THOMASHOW, M. F.; SHIU. S. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108, pp. 14992-14997, 2011.

## **Apêndices**

Apêndice A – Quadro demonstrando todos os elementos *cis*, o número de vezes que aparecem em cada *OsATG* e suas respectivas funções.

| Elemento cis     | Sequência  | OsATG3a | OsATG4a | OsATG5 | OsATG7(1) | OsATG7(2) | OsATG8a | OsATG10b | OsATG12 | OsATG16 | OsATG18a(1) | OsATG18a(2) | Função                                                                            |
|------------------|------------|---------|---------|--------|-----------|-----------|---------|----------|---------|---------|-------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| -10PEHVPSBD      | TATTCT     |         | 1       |        |           |           |         |          |         |         |             | 1           | Expressão de genes do cloroplasto, ritmo circadiano e respostas a luz.            |
| 2SSEEDPROTBANAPA | CAAACAC    |         |         | 1      | 1         |           |         |          |         |         |             |             | Conservado em promotores de genes codificantes para proteínas de armazenamento.   |
| -300ELEMENT      | TGHAAARK   | 1       |         |        |           |           | 2       | 3        |         |         |             |             | Confere expressão tecido específica para o endosperma.                            |
| AACACOREOSGLUB1  | AACAAAC    | 1       |         | 1      | 1         | 1         |         |          |         | 1       |             |             | Confere expressão tecido específica para o endosperma.                            |
| ABREA2HVA1       | CCTACGTGGC |         |         |        |           |           |         |          |         |         |             | 1           | Elemento responsivo ao ABA.                                                       |
| ABREATCONSENSUS  | YACGTGGC   |         |         |        |           |           |         |          |         |         |             | 2           | Elemento responsivo ao ABA.                                                       |
| ABREAZMRAB28     | GCCACGTGGG |         |         |        |           |           |         |          |         |         |             | 1           | Elemento responsivo ao ABA.                                                       |
| ABRECE1HVA22     | TGCCACCGG  |         |         |        | 1         |           |         |          |         |         |             |             | Elemento responsivo ao ABA, região de ligação de FTs bZIP.                        |
| ABRELATERD1      | ACGTG      |         | 3       |        |           |           |         |          | 2       | 2       |             | 8           | Elemento responsivo ao ABA, envolvido no estresse por desidratação e senescência. |
| ABREOSRAB21      | ACGTSSSC   |         |         |        |           |           |         |          |         | 1       |             | 2           | Elemento responsivo ao ABA.                                                       |
| ABRERATCAL       | MACGYGB    |         | 5       |        | 2         |           |         |          |         | 2       |             | 5           | Elemento responsivo ao ABA.                                                       |
| ABREZMRAB28      | CCACGTGG   |         |         |        |           |           |         |          |         |         |             | 4           | Elemento responsivo ao ABA e envolvido do estresse por déficit hídrico.           |

|                      |           |   |    |    |    |    |   |   |   |   |   |    |                                                                                        |
|----------------------|-----------|---|----|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----------------------------------------------------------------------------------------|
| ACGTABOX             | TACGTA    |   |    |    |    |    | 2 |   |   |   |   | 2  | Região de ligação de FTs bZIP.                                                         |
| ACGTABREMOTIFA2O SEM | ACGTGKC   |   |    |    |    |    |   |   | 1 |   |   | 4  | Elemento responsivo ao ABA.                                                            |
| ACGTATERD1           | ACGT      | 2 | 4  | 4  |    |    | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 16 | Envolvido na estiolação durante estresse por desidratação.                             |
| ACGTCBOX             | GACGTC    | 2 |    |    |    |    |   |   |   |   | 2 |    | Região de ligação de FTs bZIP.                                                         |
| ACGTTBOX             | AACGTT    |   |    | 2  |    |    | 2 |   |   |   |   |    | Região de ligação de FTs bZIP.                                                         |
| AGCBOXNPGLB          | AGCCGCC   |   |    |    |    |    |   |   | 1 |   |   |    | Região de ligação de FTs bZIP.                                                         |
| AGMOTIFNTMYB2        | AGATCCAA  |   | 1  |    |    |    |   |   |   |   |   |    | Envolvido na resposta ao estresse por injúria e induzido tratamento por elicitores.    |
| AMYBOX1              | TAACARA   |   |    | 1  |    |    | 2 |   |   |   |   |    | Sequência conservada em promotores do gene para alfa amilase.                          |
| AMYBOX2              | TATCCAT   |   |    |    |    |    |   | 1 |   |   |   |    | Sequência conservada em promotores do gene para alfa amilase.                          |
| ANAERO1CONSENSUS     | AAACAAA   | 1 |    |    | 1  |    |   |   |   | 1 |   |    | Envolvido na resposta a anaerobiose.                                                   |
| ANAERO2CONSENSUS     | AGCAGC    | 1 |    | 1  | 10 |    |   | 1 |   |   | 1 |    | Envolvido na resposta a anaerobiose.                                                   |
| ARFAT                | TGTCTC    | 1 | 1  |    |    |    |   |   | 2 |   |   | 1  | Elemento responsivo ao ABA e auxina.                                                   |
| ARR1AT               | NGATT     | 9 | 11 | 17 | 6  | 13 | 9 | 7 | 1 | 8 |   | 4  | Região de ligação de FTs ARR1 e ARR2.                                                  |
| ASF1MOTIFCAMV        | TGACG     | 1 | 1  | 2  |    |    |   | 1 | 3 | 2 |   | 4  | Envolvido na ativação transcricional de genes responsivos a auxina e ácido salicílico. |
| AUXREPSIAA4          | KGTCCCAT  |   |    |    |    |    | 1 |   |   |   |   |    | Elemento responsivo a auxina.                                                          |
| AUXRETGA2GMGH3       | TGACGTGGC |   |    |    |    |    |   |   | 1 |   |   | 2  | Elemento responsivo a auxina.                                                          |

|               |                 |    |   |    |    |    |    |    |   |    |   |    |                                                                                         |
|---------------|-----------------|----|---|----|----|----|----|----|---|----|---|----|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| BIHD10S       | TGTCA           | 2  | 1 | 1  |    | 3  | 2  |    |   | 2  |   | 2  | Envolvido na resposta de resistência a doenças.                                         |
| BOXCPSAS1     | CTCCCAC         | 1  |   |    | 6  |    |    | 1  |   |    | 1 |    | Elemento induzido por respostas a luz.                                                  |
| BOXIINTPATPB  | ATAGAA          |    | 1 |    |    | 1  |    |    |   |    |   |    | Expressão de genes do cloroplasto.                                                      |
| BOXIIPCCHS    | ACGTGGC         |    |   |    |    |    |    |    | 1 |    |   | 4  | Elemento responsivo ao ABA.                                                             |
| BOXLCOREDCPAL | ACCWWCC         | 1  |   |    | 2  |    | 1  |    |   | 3  |   |    | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                         |
| BS1EGCCR      | AGCGGG          | 1  |   |    | 2  |    |    |    | 1 |    |   |    | Elemento requerido para expressão vascular de genes.                                    |
| CAATBOX1      | CAAT            | 11 | 3 | 8  | 4  | 15 | 5  | 6  | 2 | 4  |   | 5  | Responsável para a expressão tecido-específico.                                         |
| CACGTGMOTIF   | CACGTG          |    | 2 |    |    |    |    |    |   | 2  |   | 4  | Região de ligação de FTs bZIP.                                                          |
| CACTFTPPCA1   | YACT            | 13 | 6 | 15 | 10 | 17 | 29 | 23 | 7 | 12 | 7 | 11 | Elemento encontrado no promotor do gene codificante para fosfoenolpiruvato carboxilase. |
| CANBNNAPA     | CNAACAC         |    |   | 1  | 1  | 1  |    |    |   |    |   |    | Confere expressão tecido específica para o endosperma.                                  |
| CAREOSREP1    | CAACTC          |    |   |    |    | 2  | 1  | 2  |   |    |   |    | Elemento encontrado em promotores de genes envolvidos na síntese de giberelinas.        |
| CARGCW8GAT    | CWWWWWWWWW<br>G |    |   | 4  |    |    | 4  | 2  |   |    |   |    | Elemento de ligação de FTs MADS-box.                                                    |
| CATATGGMSAUR  | CATATG          | 2  |   |    |    |    |    |    |   |    |   | 2  | Presente em promotores de genes envolvidos na resposta a auxina.                        |
| CBFHV         | RYCGAC          |    | 2 | 2  | 1  |    |    |    | 2 | 1  | 7 | 4  | Elemento de ligação de FTs DREB.                                                        |
| CCA1ATLHCB1   | AAMAATCT        |    | 1 |    |    | 1  |    | 1  | 1 |    |   |    | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                         |
| CCAATBOX1     | CCAAT           | 2  | 1 | 2  |    | 3  | 1  | 2  |   | 1  |   |    | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                         |
| CDA1ATCAB2    | CAAAACGC        |    |   |    |    |    |    | 1  |   |    |   |    | Envolvido na resposta a falta de luminosidade.                                          |

|                 |            |    |    |    |    |    |    |   |    |    |   |    |                                                                                        |
|-----------------|------------|----|----|----|----|----|----|---|----|----|---|----|----------------------------------------------------------------------------------------|
| CGACGOSAMY3     | CGACG      | 1  | 5  |    | 2  | 1  |    |   | 7  | 1  | 3 | 2  | Sequência conservada em promotores do gene para alfa amilase.                          |
| CGCGBOXAT       | VCGCGB     | 3  | 14 | 4  | 16 |    |    |   | 14 | 10 | 8 | 2  | Encontrada em promotores de genes codificantes para proteínas de ligação calmodulinas. |
| CIACADIANLELHC  | CAANNNNATC |    | 1  |    | 1  | 1  | 2  | 2 |    |    |   | 1  | Evolvido no ritmo circadiano.                                                          |
| CMSRE1IBSPOA    | TGGACGG    |    |    |    |    |    |    | 2 |    |    |   |    | Envolvidos na expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos.          |
| CPBCSPOR        | TATTAG     |    | 1  |    | 1  | 1  | 4  | 1 |    |    |   |    | Sítio de ligação dependente de citocinina na região 5' do gene NADPH.                  |
| CRTDREHVCBF2    | GTCGAC     |    |    | 2  |    |    |    |   |    |    |   | 2  | Elemento de ligação de FTs DREB.                                                       |
| CTRMCA MV35S    | TCTCTCTCT  |    |    |    | 1  |    |    |   |    |    |   |    | Envolvido no incremento da expressão de genes ( <i>enhancer</i> ).                     |
| CURECORECR      | GTAC       | 4  | 2  | 4  |    | 2  | 10 | 2 | 2  | 2  |   |    | Elemento encontrado em promotores de genes envolvidos na resposta ao oxigênio e cobre. |
| DOFCOREZM       | AAAG       | 7  | 9  | 9  | 3  | 12 | 12 | 8 | 4  | 9  |   | 10 | Elemento de ligação de FTs DOF.                                                        |
| DPBFCOREDCDC3   | ACACNNG    |    |    | 4  | 2  | 1  |    | 5 |    |    |   |    | Região de ligação de FTs bZIP.                                                         |
| DRE2COREZMRAB17 | ACCGAC     |    | 1  |    |    |    |    |   | 1  | 1  |   | 1  | Elemento de ligação de FTs DREB e induzido por ABA.                                    |
| DRECRTCOREAT    | RCCGAC     |    | 2  |    | 1  |    |    |   | 2  | 1  | 5 | 2  | Elemento de ligação de FTs DREB.                                                       |
| E2FCONSENSUS    | WTTSSCSS   | 1  |    | 1  | 1  |    |    |   | 1  | 1  |   | 3  | Elemento de ligação de FTs E2F.                                                        |
| EBOXBNNAPA      | CANNTG     | 10 | 6  | 12 | 4  | 12 |    | 4 | 10 | 4  |   | 12 | Elemento de ligação de FTs MYB, bZIP e bHLH.                                           |
| EECCRCAH1       | GANTTNC    | 2  | 2  | 4  | 1  | 1  | 2  | 2 |    | 1  |   | 1  | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                        |
| ELRECOREPCR1    | TTGACC     |    |    |    | 1  |    |    |   |    |    |   | 1  | Elemento de ligação de FTs WRKY.                                                       |
| EMBP1TAEM       | CACGTGGC   |    |    |    |    |    |    |   |    |    |   | 1  | Região de ligação de FTs bZIP.                                                         |
| ERELEE4         | AWTTCAA    |    |    |    |    | 1  |    |   |    |    |   |    | Elemento responsivo ao etileno.                                                        |

|                |            |   |   |   |   |   |    |   |   |   |    |   |                                                                            |
|----------------|------------|---|---|---|---|---|----|---|---|---|----|---|----------------------------------------------------------------------------|
| GAREAT         | TAACAAR    |   |   | 1 |   |   | 3  |   |   |   |    |   | Elemento responsivo a giberelina.                                          |
| GATABOX        | GATA       | 4 | 7 | 1 | 6 | 8 | 11 | 7 | 2 | 3 | 2  | 2 | Elemento requerido para respostas a luz e expressão tecido-específica.     |
| GBOXLERBCS     | MCACGTGGC  |   |   |   |   |   |    |   |   |   |    | 1 | Envolvido na resposta a luz.                                               |
| GCBP2ZMGAPC4   | GTGGGCCCCG |   |   |   |   |   |    |   |   | 1 |    |   | Resposta a anaerobiose.                                                    |
| GCCCORE        | GCCGCC     | 4 | 6 |   | 9 |   |    |   | 5 | 3 | 13 | 2 | Elemento responsivo ao etileno e jasmonato.                                |
| GCN4OSGLUB1    | TGAGTCA    | 1 |   |   |   |   |    |   |   |   |    |   | Região de ligação de FTs bZIP.                                             |
| GT1CONSENSUS   | GRWAAW     | 7 | 6 | 5 | 1 | 7 | 7  | 5 | 1 | 3 |    | 7 | Envolvido na resposta a luz.                                               |
| GT1CORE        | GGTTAA     | 1 |   |   | 2 |   | 1  | 1 |   |   |    |   | Envolvido na resposta a luz.                                               |
| GT1GMSCAM4     | GAAAAA     | 1 | 1 | 1 |   | 2 | 2  | 1 | 1 | 1 |    | 3 | Envolvido na resposta a patógenos e salinidade.                            |
| GTGANTG10      | GTGA       | 8 | 7 | 5 | 3 | 4 | 7  | 6 | 8 | 4 | 5  | 4 | Envolvido no desenvolvimento do pólen e regulação de pectinas.             |
| HDZIP2ATATHB2  | TAATMATTA  |   | 2 |   |   |   |    |   |   |   |    |   | Região de ligação de FTs HD-ZIP.                                           |
| HEXAMERATH4    | CCGTCTG    |   | 3 |   | 2 |   |    |   | 2 |   |    | 1 | Envolvido na regulação transcricional do gene codificante para histona H4. |
| HEXAT          | TGACGTGG   |   |   |   |   |   |    |   | 1 |   |    | 2 | Região de ligação de FTs bZIP.                                             |
| HEXMOTIFTAH3H4 | ACGTCA     | 1 |   | 1 |   |   |    | 1 | 1 |   |    | 2 | Envolvido na regulação transcricional do gene codificante para histona H3. |
| IBOX           | GATAAG     |   |   |   | 1 |   | 1  |   |   |   | 1  |   | Elemento de ligação de FTs MYB de genes associados a resposta a luz.       |
| IBOXCORE       | GATAA      | 1 | 2 |   | 1 | 1 | 1  |   |   | 2 | 1  | 2 | Envolvido na resposta a luz.                                               |
| IBOXCORENT     | GATAAGR    |   |   |   | 1 |   | 1  |   |   |   | 1  |   | Envolvido na resposta a luz.                                               |
| INRNTPSADB     | YTCANTYY   |   | 1 | 2 |   |   |    | 4 |   |   |    | 1 | Envolvido na resposta a luz.                                               |
| INTRONLOWER    |            |   |   |   |   |   |    |   | 2 |   |    |   | Sequência de consenso para íntrons de plantas.                             |

|                 |            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                |
|-----------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IRO2OS          | CACGTGG    |   | 1 |   |   |   |   |   |   | 1 |   | 4 | Região de ligação do FT OsIRO2, induzido exclusivamente por deficiência de ferro.              |
| L1BOXATPDF1     | TAAATGYA   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Região de ligação de FTs MYB e HD-ZIP.                                                         |
| LEAFYATAG       | CCAATGT    | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Sítio alvo de proteínas LEAFY ou WUSCHEL.                                                      |
| LECPLEACS2      | TAAAATAT   |   |   |   |   |   | 2 | 1 |   |   |   |   | Ligação da proteína LeCp para regular o gene 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintetase |
| LRENPCABE       | ACGTGGCA   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   | 1 | Envolvido na resposta a luz.                                                                   |
| LTRE1HVBLT49    | CCGAAA     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 | Elemento responsivo a baixas temperaturas.                                                     |
| LTRECOREATCOR15 | CCGAC      | 1 | 3 |   | 1 |   |   |   | 2 | 2 | 5 | 2 | Elemento responsivo a baixas temperaturas.                                                     |
| MARTBOX         | TTWTWTTWTT | 2 |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   | 1 | Sequência onde a matriz nuclear se liga ( <i>Scaffold/matrix attachment region</i> ).          |
| MNF1ZMPPC1      | GTGCCCTT   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   | Região para a ligação do fator de ligação ao DNA MNF1.                                         |
| MYB1AT          | WAACCA     |   |   | 1 |   | 4 | 1 | 2 | 2 |   |   | 1 | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |
| MYB2AT          | TAACTG     |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   | 1 | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |
| MYB2CONSENSUSAT | YAACKG     |   |   | 2 | 1 | 2 |   | 1 |   |   |   | 1 | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |
| MYBCORE         | CNGTTR     |   | 1 | 3 | 3 | 5 |   | 2 | 3 |   | 3 | 2 | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |
| MYBCOREATCYCB1  | AACGG      | 1 |   |   | 1 |   |   |   | 1 | 2 |   |   | Elemento de ligação de FTs MYB encontrado no promotor do gene para ciclina B1:1.               |
| MYBGAHV         | TAACAAA    |   |   | 1 |   |   | 2 |   |   |   |   |   | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |
| MYBPLANT        | MACCWAMC   |   | 1 |   |   |   | 2 |   |   | 4 |   |   | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |
| MYBPZM          | CCWACC     | 1 |   |   | 3 |   | 1 |   | 1 | 4 | 1 |   | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                |

|                     |          |    |   |    |   |    |   |   |    |   |   |    |                                                                                                    |
|---------------------|----------|----|---|----|---|----|---|---|----|---|---|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MYBST1              | GGATA    | 1  | 2 |    | 3 | 1  | 5 | 1 | 2  | 2 | 1 | 1  | Elemento de ligação de FTs MYB.                                                                    |
| MYCATERD1           | CATGTG   | 3  |   |    | 1 | 1  |   |   | 1  |   |   | 1  | Elemento de ligação de FTs MYC/MADS.                                                               |
| MYCATRD22           | CACATG   | 3  |   |    | 1 | 1  |   |   | 1  |   |   | 1  | Elemento de ligação de FTs MYC/MADS.                                                               |
| MYCCONSENSUSAT      | CANNTG   | 10 | 6 | 12 | 4 | 12 |   | 4 | 10 | 4 |   | 12 | Elemento de ligação de FTs MYC/MADS.                                                               |
| NODCON1GM           | AAAGAT   |    | 2 |    |   |    |   | 1 |    | 1 |   |    | Sequência consensus para nodulina.                                                                 |
| NODCON2GM           | CTCTT    | 5  | 1 | 3  | 2 | 5  |   | 2 | 3  | 2 | 4 | 1  | Sequência consensus para nodulina.                                                                 |
| NTBBF1ARROLB        | ACTTTA   |    |   | 2  |   | 1  | 1 |   |    |   |   | 1  | Elemento de ligação de FTs DOF.                                                                    |
| OCTAMERMOTIFTAH3 H4 | CGCGGATC |    |   |    | 1 |    |   |   |    |   |   |    | Envolvido na regulação transcricional do gene codificante para histona H3.                         |
| OSE1ROOTNODULE      | AAAGAT   |    | 2 |    |   |    |   | 1 |    | 1 |   |    | Sequência para ligação de elementos órgão-específico em promotores ativados durante infecção.      |
| OSE2ROOTNODULE      | CTCTT    | 5  | 1 | 3  | 2 | 5  |   | 2 | 3  | 2 | 4 | 1  | Sequência para ligação de elementos órgão-específico em promotores ativados durante infecção.      |
| P1BS                | GNATATNC | 2  | 2 |    |   | 2  | 2 |   |    |   |   |    | Elemento de ligação de FTs MYB em promotores de genes responsivos a deficiência de fosfato.        |
| PALBOXAPC           | CCGTCC   |    |   | 1  |   |    |   | 2 | 1  |   | 3 | 2  | Elemento necessário para a ativação da transcrição do gene para <i>fenilalanina amonia-liase</i> . |

|                           |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                    |
|---------------------------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PALBOXPPC                 | YTYMMCMAMC<br>MMC            |   |   |   | 2 |   |   |   |   |   |   |   | Elemento necessário para a ativação da transcrição do gene para <i>fenilalanina amonia-liase</i> . |
| POLASIG1                  | AATAAA                       | 1 | 3 |   | 2 | 1 | 1 | 1 |   |   |   | 2 | Sinalização de poliadenilação.                                                                     |
| POLASIG2                  | AATTAAA                      |   | 1 |   | 1 | 1 | 1 |   |   |   |   | 1 | Sinalização de poliadenilação.                                                                     |
| POLASIG3                  | AATAAT                       | 1 | 2 |   |   |   | 1 | 4 |   |   |   | 2 | Sinalização de poliadenilação.                                                                     |
| POLLEN1LELAT52            | AGAAA                        | 3 | 2 | 6 |   | 6 | 3 | 4 | 5 | 3 |   | 3 | Elemento responsável pela ativação de genes específicos do pólen.                                  |
| PREATPROD                 | ACTCAT                       | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Região de ligação de FTs bZIP.                                                                     |
| PRECONSCRHSP70A           | SCGAYNRNNNNN<br>NNNNNNNNNNHD | 1 | 3 |   | 1 |   |   | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 | Sequencia consensus do PRE ( <i>plastid responsive element</i> ) para indução de genes HSP.        |
| PROLAMINBOXOSGLU<br>B1    | TGCAAAG                      | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Sequência mínima requerida para expressão do gene para glutelina no endosperma.                    |
| PROXBBNAPA                | CAAACACC                     |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   | Elemento responsivo ao ABA.                                                                        |
| PYRIMIDINEBOXHVEP<br>B1   | TTTTTTCC                     |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Elemento responsivo a giberelinas.                                                                 |
| PYRIMIDINEBOXOSRA<br>MY1A | CCTTTT                       | 1 | 1 |   |   |   | 1 | 1 |   |   |   | 2 | Elemento responsivo a giberelinas.                                                                 |
| QELEMENTZM13              | AGGTCA                       |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   |   | Envolvido no incremento da expressão de genes ( <i>enhancer</i> ).                                 |
| RAV1AAT                   | CAACA                        | 1 | 1 | 4 | 2 | 6 | 1 | 8 |   | 2 |   | 4 | Região de ligação de FTs RAV.                                                                      |
| RAV1BAT                   | CACCTG                       |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 |   |   | 1 | Região de ligação de FTs RAV.                                                                      |
| RBCSCONSENSUS             | AATCCAA                      | 1 |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   | Requerido para a expressão da subunidade menor da rubisco.                                         |
| REALPHALGLHCB21           | AACCAA                       |   |   | 1 |   | 1 | 3 | 1 |   | 4 |   |   | Requerido para a regulação do fitocromo.                                                           |
| REBETALGLHCB21            | CGGATA                       | 1 |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   | 1 | Requerido para a regulação do fitocromo.                                                           |

|                    |           |   |   |   |   |   |    |   |  |   |   |   |                                                                                                             |
|--------------------|-----------|---|---|---|---|---|----|---|--|---|---|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RHERPATEXPA7       | KCACGW    | 1 | 4 |   |   |   | 1  |   |  | 3 |   | 1 | Sequência conservada em elementos específicos para filamentos radiculares.                                  |
| ROOTMOTIFTAPOX1    | ATATT     | 2 | 4 |   | 2 | 9 | 11 | 3 |  |   |   | 3 | Sequência do promotor do gene rolD de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .                                     |
| RYREPEATBNNAPA     | CATGCA    |   |   | 2 | 1 | 1 |    | 9 |  |   | 1 | 1 | Requerido para a expressão de genes semente específico.                                                     |
| RYREPEATGMGY2      | CATGCAT   |   |   | 1 |   |   |    | 4 |  |   |   |   | Elemento que modula a expressão de genes para glicinina.                                                    |
| RYREPEATLEGUMINBOX | CATGCAY   |   |   | 1 | 1 |   |    | 6 |  |   | 1 |   | Elemento para a expressão temporal e tecido específica do gene para beta-conglicinina.                      |
| RYREPEATVFLEB4     | CATGCATG  |   |   |   |   |   |    | 4 |  |   |   |   | Sítio de ligação de fatores de ABA <i>insensitive 3 like</i> em promotores responsivos ao ABA e auxina.     |
| S1FBOXSORPS1L21    | ATGGTA    |   |   |   |   | 1 | 1  |   |  |   |   |   | Sítio de ligação de fatores de ABA <i>insensitive 3 like</i> em promotores responsivos ao ABA e auxina.     |
| SEBFCONSSTPR10A    | YTGTCWC   |   | 1 |   |   |   |    |   |  |   |   | 2 | Regulador negativo conservado em genes plastídiais.                                                         |
| SEF1MOTIF          | ATATTTAWW |   |   |   | 1 |   |    |   |  |   |   |   | Região de ligação de elemento de silenciamento gênico encontrado em promotores relacionados a patógenos.    |
| SEF3MOTIFGM        | AACCCA    | 1 |   | 1 | 1 |   |    |   |  |   |   |   | Elemento para a ligação da proteína SEF1 ( <i>soybean embryo factor 1</i> ) no gene para beta-conglicinina. |
| SEF4MOTIFGM7S      | RTTTTTR   |   | 1 | 1 | 2 | 1 | 1  | 1 |  |   |   | 2 | Elemento para a ligação da proteína SEF3 no gene para beta-conglicinina.                                    |

|                       |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                                                                     |
|-----------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SITEIIATCYTC          | TGGGCY    |   |   |   |   |   |   | 1 | 5 | 8 | 1 | 6  | Elemento para a ligação da proteína SEF4 no gene para beta-conglicina.                                              |
| SITEIIBOSPCNA         | TGGTCCCAC |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1  | Elemento localizado em promotores dos genes do citocromo.                                                           |
| SORLIP1AT             | GCCAC     | 1 | 3 | 3 | 9 | 2 | 1 | 3 | 5 | 6 | 5 | 10 | Sítio de ligação de proteínas PCF1 e PCF2 no gene para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).             |
| SORLIP2AT             | GGGCC     |   | 2 | 1 |   |   |   |   | 6 | 9 | 2 | 3  | Sequência super-representadas em promotores induzidos pela luz.                                                     |
| SORLIP5AT             | GAGTGAG   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |    | Sequência super-representadas em promotores induzidos pela luz.                                                     |
| SORLREP3AT            | TGTATATAT |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |    | Sequência super-representadas em promotores induzidos pela luz.                                                     |
| SP8BFIBSP8BIB         | TACTATT   |   |   |   | 1 |   | 2 | 2 |   |   |   | 1  | Região de ligação de FTs SPBF.                                                                                      |
| SPHCOREZMC1           | TCCATGCAT |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |    | Requerido para a ligação da proteína VP1 ( <i>viviparous 1</i> ) para a programação do desenvolvimento de sementes. |
| SREATMSD              | TTATCC    |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   | 2 |   | 1  | Elemento responsivo ao açúcar (SRE).                                                                                |
| SURECOREATSULTR1<br>1 | GAGAC     | 5 | 1 |   |   | 1 |   | 1 | 1 | 2 | 1 | 1  | Região do elemento responsivo ao enxofre (SURE).                                                                    |
| SV40COREENHAN         | GTGGWWHG  |   |   | 1 |   | 1 | 1 |   |   |   |   |    | Envolvido no incremento da expressão de genes ( <i>enhancer</i> ).                                                  |
| T/GBOXATPIN2          | AACGTG    |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |    | Região de ligação de FTs bHLH e MYC.                                                                                |
| TAAAGSTKST1           | TAAAG     | 1 | 1 | 3 |   | 3 | 4 | 1 |   | 2 |   | 1  | Região de ligação de FTs DOF que controla a expressão específica nas células guarda.                                |

|                       |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |   |                                                                                |
|-----------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|---|--------------------------------------------------------------------------------|
| TATABOX2              | TATAAAT   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |  |   | Elemento crítico para iniciação da transcrição.                                |
| TATABOX3              | TATTAAT   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |  |   | Elemento crítico para iniciação da transcrição.                                |
| TATABOX4              | TATATAA   |   |   | 1 |   |   | 2 |   |   |   |  |   | Elemento crítico para iniciação da transcrição.                                |
| TATABOX5              | TTATTT    | 4 | 3 |   | 2 |   |   | 3 |   |   |  | 3 | Elemento crítico para iniciação da transcrição.                                |
| TATABOXOSPAL          | TATTTAA   |   | 2 |   | 2 |   | 1 |   |   |   |  |   | Elemento crítico para iniciação da transcrição.                                |
| TATAPVTRNALEU         | TTTATATA  |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |  |   | Elemento crítico para iniciação da transcrição.                                |
| TATCCACHVAL21         | TATCCAC   |   |   |   | 1 |   | 2 |   |   |   |  |   | Parte do grupo de CREs necessários para a resposta da giberelina.              |
| TATCCAOSAMY           | TATCCA    |   |   |   | 1 |   | 4 | 1 | 1 |   |  |   | Região de ligação de FTs MYB.                                                  |
| TATCCAYMOTIFOSRA MY3D | TATCCAY   |   |   |   | 1 |   | 2 | 1 |   |   |  |   | Responsável pela repressão do gene alfa-amilase.                               |
| TBOXATGAPB            | ACTTTG    | 1 | 1 |   | 1 | 2 |   |   |   |   |  |   | Requerido para a indução de genes em resposta a luz.                           |
| TGACGTVMAMY           | TGACGT    | 1 |   | 1 |   |   |   | 1 | 1 |   |  | 2 | Requerido para incremento da expressão da alfa-amilase em sementes germinadas. |
| TGTCACACMCUCUMIS IN   | TGTCACA   | 1 | 1 |   |   |   | 1 |   |   |   |  |   | Envolvido no incremento da expressão de genes ( <i>enhancer</i> ).             |
| UP1ATMSD              | GGCCCAWWW |   |   |   |   |   |   |   | 1 | 3 |  |   | Encontrado em genes superexpressos depois da decapitação da parte aérea.       |
| UPRMOTIFIAT           | CCACGTCA  |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |  | 2 | Motivo conservado na proteína UPR ( <i>unfolded protein response</i> ).        |

|              |                         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |    |                                                                         |
|--------------|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|----|-------------------------------------------------------------------------|
| UPRMOTIFIIAT | CCNNNNNNNNNN<br>NNCCACG |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 |   |  | 1  | Motivo conservado na proteína UPR ( <i>unfolded protein response</i> ). |
| WBOXPCWRKY1  | TTTGACY                 |   | 1 |   |   | 1 |   |   |   |   |  | 3  | Região de ligação de FTs WRKY.                                          |
| WBOXATNPR1   | TTGAC                   | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |   |   | 1 |   |  | 7  | Região de ligação de FTs WRKY.                                          |
| WBOXHVISO1   | TGACT                   | 1 | 1 |   | 1 |   | 1 |   | 2 |   |  | 5  | Região de ligação de FTs WRKY.                                          |
| WBOXNTCHN48  | CTGACY                  | 3 |   | 1 | 1 |   |   |   | 3 |   |  | 1  | Região de ligação de FTs WRKY.                                          |
| WBOXNTERF3   | TGACY                   | 4 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 |  | 8  | Encontrado no promotor do gene ERF3, envolvido na resposta a injúria.   |
| WRKY71OS     | TGAC                    | 7 | 3 | 4 | 4 | 6 | 3 | 3 | 6 | 5 |  | 14 | Região de ligação de FTs WRKY.                                          |
| WUSATAg      | TTAATGG                 |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |  |    | Sítio alvo de proteínas WUSCHEL.                                        |
| XYLAT        | ACAAAGAA                |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |  |    | Encontrado em promotores de genes essenciais do xilema.                 |