

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Caracterização de genes *Whirly* em acessos selvagens do gênero *Oryza* e
resposta a salinidade e baixas temperaturas em arroz cultivado**

Stefânia Garcia Zenker

Pelotas, 2021

Stefânia Garcia Zenker

Caracterização de genes *Whirly* em acessos selvagens do gênero *Oryza* e resposta a salinidade e baixas temperaturas em arroz cultivado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Camila Pegoraro, Dra. – FAEM/UFPeI

Co-orientadores: Vívian Ebeling Viana, Dra. – FAEM/UFPeI

Viviane Kopp da Luz, Dra. – FAEM/UFPeI

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Z54 Zenker, Stefânia Garcia

Caracterização de genes *Whirly* em acessos selvagens do gênero *Oryza* e resposta a salinidade e baixas temperaturas em arroz cultivado / Stefânia Garcia Zenker ; Camila Pegoraro, orientadora ; Vívian Ebeling Viana, Viviane Kopp da Luz, coorientadoras. — Pelotas, 2021.

120 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. *Oryza sativa* L. 2. ERACs. 3. Estresse abiótico. 4. Expressão gênica. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Viana, Vívian Ebeling, coorient. III. Luz, Viviane Kopp da, coorient. IV. Título.

CDD : 633.18

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Stefânia Garcia Zenker

Caracterização de genes *Whirly* em acessos selvagens do gênero *Oryza* e resposta a salinidade e baixas temperaturas em arroz cultivado

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 25 de fevereiro de 2021.

Banca Examinadora:

.....
Prof. Dra. Camila Pegoraro (Orientador)

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof. PhD. Antonio Costa de Oliveira

PhD em Genética pela Universidade de Purdue.

.....
Prof. Dr. Luciano Carlos da Maia

Dr. em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof. Dr. Daniel da Rosa Farias

Dr. em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico a minha família.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos. ” (Charles Chaplin).

Agradecimentos

A Deus, por me guiar, me abençoar, me dar força, serenidade e perseverança para lutar pelos objetivos.

Com todo amor, carinho e admiração agradeço aos meus pais, Cilon (*in memorium*) e minha mãe Noemi, por serem meu porto seguro, meus guerreiros, batalhadores e fazer disto, um dos motivos para eu seguir em frente diante dos vários obstáculos encontrados. Por estarem sempre do meu lado, me apoiar nas decisões, pelas conversas, por fazerem o impossível para que sempre estivesse bem, pelas horas no telefone me auxiliando, por serem pessoas maravilhosas, por tudo já realizado em prol do meu melhor. Eu não seria ninguém se não estivesse vocês ao meu lado! Eu os amo infinitamente, obrigada por tudo!

Aos meus avós Aracy e João Lory (*in memorian*), Conceição (*in memorian*) e Alfredo (*in memorian*) por todo afeto, amor, carinho, preocupação, conversas, experiências, conselhos e paciência. Em especial ao meu herói João Lory, por todos os ensinamentos, por todo apoio desde a infância e por ser minha fonte inspiradora mesmo lá de cima onde sigo seus passos e tudo que me foi transmitido aqui na terra.

Ao meu namorado Hitalo Lopes Vencato, que sempre se fez presente, me auxiliando e demonstrando toda paciência nos momentos mais difíceis.

As minhas amigas de longe Jéssica Ribeiro, Natália Angst e Jeissiquele Conter, obrigada pelo apoio, pelo carinho, pelo amor, pelos momentos que a fraqueza tentava dominar e vocês me apoiavam para seguir sempre. Obrigada!

Aos meus amigos de graduação, Marina Franco Galli, Nathalia Pamplona Barbosa, Thaís Türmer, André Wink e Paulo Alberto de Azevedo por todo apoio, pelas horas de conversas, pelos conselhos, pelas risadas, obrigado por estarem comigo nesta etapa. Amo muito vocês!

Às minhas amigas, Michele Feijó, Victoria Freitas de Oliveira, Jennifer Lopes, Thauana Heberle e Latóia Maltzahn obrigada a vocês que me ajudaram, me escutaram, que me incentivaram, proporcionaram momentos de alegria, vivências que jamais esquecerei. Muito obrigada!

Em especial, a Raíssa Martins e a Karine Janner, pelo apoio, pelas horas não dormidas me auxiliando, pelo carinho, pelo amor, por me aturar, me

aguentar, pelas risadas, pelos mates, pela dedicação e preocupação quando eu mais precisei! Eu amo vocês e obrigada!

Agradeço a WiNet, pelo suporte fornecido para a realização deste trabalho. Muito Obrigada.

A todos amigos e colegas do CGF, pelo carinho e amizade. Obrigada por toda ajuda que tive sempre que precisei.

A professora orientadora, Dra. Camila Pegoraro, pela orientação, apoio, confiança e ensinamentos transmitidos.

As pesquisadoras co-orientadoras Dra. Vívian Ebeling Viana e Dra. Viviane Kopp da Luz, pelas conversas, disponibilidade e auxílio sempre que precisei.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, em especial ao professor Ph.D. Antônio Costa de Oliveira e Dr. Luciano Carlos da Maia, pelas diversas contribuições e ensinamentos transmitidos.

A Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), a Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) pela oportunidade de cursar o curso de pós-graduação e as instituições de pesquisa CAPES e CNPq por oportunizar a formação profissional.

Obrigada.

Resumo

ZENKER, Stefânia G. **Caracterização de genes *Whirly* em acessos selvagens do gênero *Oryza* e resposta a salinidade e baixas temperaturas em arroz cultivado**. 2021. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Condições ambientais desfavoráveis, como salinidade e baixas temperaturas fazem com que a produtividade do arroz (*Oryza sativa* L.) seja afetada. Na principal região produtora de arroz do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul, a incidência de baixas temperaturas acarreta em perdas significativas na produtividade. Além disso, problemas com salinidade são comuns, pois a fonte de água para irrigação das lavouras, em destaque a Planície Costeira, é advinda da Laguna dos Patos, que dependendo da precipitação mensal acaba recebendo água do Oceano Atlântico, o que faz aumentar o teor de sal na água. A utilização de genótipos tolerantes é uma das estratégias para minimizar as perdas ocasionadas por estresses abióticos. A identificação de genes envolvidos com a resposta de tolerância a estresses abióticos pode auxiliar no desenvolvimento de novos genótipos. A expressão gênica é fundamental para a sinalização frente a estresses abióticos, iniciando com a ativação de fatores de transcrição (FTs), que se ligam a elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs), localizados na região promotora e outras regiões regulatórias dos genes envolvidos na resposta a estresse, formando uma cascata de sinalização. A busca por FTs que estejam envolvidos na resposta das plantas sob estresses é constante, e várias pesquisas têm sido conduzidas. No entanto, há poucos estudos relacionados com a família *Whirly*. Nesse contexto, este estudo buscou identificar e caracterizar genes *Whirly* em espécies do gênero *Oryza* e investigar a participação desses genes em plântulas de arroz submetidas a baixas temperaturas e salinidade. O primeiro estudo demonstrou que os genes *Whirly* são conservados quanto ao número e localização entre as espécies do gênero *Oryza*, no entanto possuem variações estruturais, o que pode ser utilizado como fonte de variabilidade genética para tolerância a estresses. Ainda, a região promotora dos genes *Whirly* é composta por ERACs alvos de FTs DREB/CBF, AREB/ABF, MYB, MYC, WRKYs, que possuem envolvimento na sinalização de estresses abióticos. Estes resultados sugerem que os genes *Whirly* podem estar envolvidos na resposta aos estresses por baixas temperaturas e salinidade em arroz. No segundo estudo, conduzido com plântulas das cultivares BRS Pampa (sensível) e BRS Bojuru (tolerante) submetidas a baixas temperaturas e salinidade, verificou-se que, de maneira geral, que a condição de estresse ocasionou a indução dos genes *Whirly2* e *Whirly6* no genótipo tolerante. Os promotores dos genes *Whirly* diferem quanto ao tipo e número de ocorrências de elementos de ação *cis* entre as cultivares sensível e tolerante, o que pode explicar a diferença no acúmulo de transcritos observado entre elas. Os resultados encontrados mostram os primeiros indícios do envolvimento dos genes *Whirly* na sinalização a resposta a estresse por salinidade e baixas temperaturas em plântulas de arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; ERACs; estresse abiótico; expressão gênica.

Abstract

ZENKER, Stefânia G. **Characterization of *Whirly* genes in wild accessions of the *Oryza* genus and response to salinity and low temperatures in cultivated rice.** 2021. 120 f. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Graduate Program in Agronomy, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Unfavorable environmental conditions, such as salinity and low temperatures affect rice (*Oryza sativa* L.) productivity. In Rio Grande do Sul state, the main rice growing region in Brazil, incidence of low temperatures results in significant yield losses. In addition, problems with salinity are common, as the source of the water for the irrigation in the field, especially in the Coastal Plain, comes from Laguna dos Patos, and depending on the monthly precipitation receives water from the Atlantic Ocean, which increases its salt content. The use of tolerant genotypes is one of the strategies to minimize the losses caused by abiotic stresses. The identification of genes involved in the tolerance response to abiotic stresses can help the development of new tolerant genotypes. The gene expression is essential in abiotic stress signaling, starting with the activation of transcription factors (TFs), which are linked to *cis*-acting regulatory elements (CREs), located in the promoter and other regulatory regions in genes involved in stress responses, activating a signaling cascade. The search for TFs involved in plant response to stresses is constant, and several researches have been conducted. However, there are few studies related to *Whirly* family. In this context, this study aimed at identify and characterize *Whirly* genes in species of *Oryza* genus and to investigate the role of these genes in rice seedlings submitted to low temperatures and salinity. The first study demonstrated that the *Whirly* genes are conserved in terms of number of copies and location in chromosomes among the species of *Oryza* genus. However, they have structural variations, that can be used as a source of genetic variability for stress tolerance. In addition, the promoter region of *Whirly* genes has CREs targeted by TFs DREB/CBF, AREB/ABF, MYB, MYC, WRKYs, which are involved in abiotic stress signaling. These results suggest that *Whirly* genes can be involved in low temperatures and salinity stress response in rice. The second study was performed using seedlings of BRS Pampa (sensitive) and BRS Bojuru (tolerant) cultivars submitted to low temperatures and salinity. In general, the studied stress condition leads to a transcriptional activation of *Whirly2* and *Whirly6* genes in the tolerant genotype. *Whirly* gene promoters differ in type and occurrences of CREs between the sensitive and tolerant cultivars. This finding may explain the difference in the transcript accumulation observed between them. The results found show the first insights in the involvement of *Whirly* genes in stress response signaling to salinity and low temperatures in rice seedlings.

Key-words: *Oryza sativa* L.; CREs; abiotic stress; gene expression.

Lista de Figuras

Figura 1. Efeitos das baixas temperaturas (<i>chilling</i>) e congelamento (<i>freezing</i>) na célula.	27
Figura 2. Diagrama esquemático dos elementos reguladores da transcrição sob estresse por frio na via de sinalização dependente de ABA.	29
Figura 3. Diagrama esquemático dos elementos reguladores da transcrição sob estresse por frio na via de sinalização independente de ABA.	30
Figura 4. Efeitos adversos do estresse por sal no crescimento da planta.	37
Figura 5. Principais processos envolvidos com a tolerância ao estresse salino.	38
Figura 6. Sinalização ABA dependente e ABA independente.	41
Figura 7. Estruturas da proteína Whirly. A- StWHY1 tetramérica B- monomérica	48
Figura 8. Relação filogenética, estrutura dos genes e análise dos motivos conservados nas proteínas Whirly em <i>Oryza</i> . A. Árvore filogenética das proteínas foi construída com o pacote BEAST através de análise bayesiana utilizando réplicas de bootstrap de 1.000.000. A árvore é mista, onde em laranja encontram-se as espécies do gênero <i>Oryza</i> no gene Whirly6 e em verde as espécies do gênero <i>Oryza</i> no gene Whirly2. B. Estrutura exons-íntrons dos genes Whirly em <i>Oryza</i> . Os blocos azuis representam os exons e as linhas azul claro representam os íntrons. C. Os motivos proteicos são indicados em diferentes cores. A variação dos motivos ocorre de 1 a 10. OsJAP - <i>O. sativa japonica</i> ; OsIND - <i>O. sativa indica</i> ; ORUF - <i>O. rufipogon</i> ; ONIV - <i>O. nivara</i> ; ORGLU - <i>O. glumaepatula</i> ; OGLA - <i>O. glaberrima</i> ; OBAR - <i>O. barthii</i> ; OMER - <i>O. meridionalis</i> ; OPUN - <i>O. punctata</i> ; OBRA - <i>O. brachyantha</i> ; OLON - <i>O. longistaminata</i> ; e LPER - <i>L. perrieri</i>	78
Figura 9. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores preditos dos genes Whirly, alvos de fatores de transcrição (FTs) sinalizados via dependente e independente de ácido abscísico (ABA) nas espécies do gênero <i>Oryza</i> . OsJAP: <i>Oryza sativa ssp. japonica</i> ; OsIND: <i>O. sativa ssp. Indica</i> ; ORUF: <i>O. rufipogon</i> ; OPUN: <i>O. punctata</i> ; ONIV: <i>O. nivara</i> ; OMER: <i>O. meridionalis</i> ; OGLU: <i>O. glumaepatula</i> ; OGLA: <i>O. glaberrima</i> ; OBRA: <i>O. brachyantha</i> ; OBAR: <i>O. barthii</i>	80

Figura 10. Imagem do experimento. (A) Recipientes de 700 mL contendo solução nutritiva com as plântulas de arroz com volume máximo mantido com solução nutritiva, (B) Plântulas da cultivar BRS Bojuru nas condições controle, baixas temperaturas e salinidade, (C) Plântulas de arroz da cultivar BRS Pampa nas condições de controle, baixas temperaturas e salinidade. CGF/FAEM/UFPel 2021.	88
Figura 11. Quantificação da expressão relativa dos genes <i>Whirly2</i> e <i>Whirly6</i> nos tecidos da parte aérea e da raiz de plântulas dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos a salinidade (2,34 g/L) por 7 dias. As barras representam os valores de erro padrão para a média de três replicatas biológicas	98
Figura 12. Quantificação da expressão relativa dos genes <i>Whirly2</i> e <i>Whirly6</i> nos tecidos da parte aérea e da raiz de plântulas de arroz dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos a baixas temperaturas (13°C) por 7 dias. As barras representam os valores de erro padrão para a média de três replicatas biológicas.	100
Figura 13. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores (1000pb) dos genes <i>Whirly</i> , alvos de fatores de transcrição (FTs) sinalizados via dependente e independente de ácido abscísico (ABA) nas cultivares BRS Pampa e BRS Bojuru.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição de eventos e marcadores morfológicos relativos às fases e estádios de desenvolvimento da planta de arroz.	24
Tabela 2. Genes <i>Whirly</i> identificados nas espécies de <i>Oryza</i> . OsJAP - <i>O. sativa japonica</i> ; OsIND - <i>O. sativa indica</i> ; ORUF - <i>O. rufipogon</i> ; ONIV - <i>O. nivara</i> ; OGLU - <i>O. glumaepatula</i> ; OGLA - <i>O. glaberrima</i> ; OBAR - <i>O. barthii</i> ; OMER - <i>O. meridionalis</i> ; OPUN - <i>O. punctata</i> ; OBRA – <i>O. brachyantha</i> ; OLON - <i>O. longistaminata</i> ; e LPER - <i>L. perrieri</i>	75
Tabela 3. Informações referentes aos iniciadores utilizados nas análises de expressão dos genes <i>Whirly</i> em RT-qPCR. CGF/FAEM/UFPel, 2021.....	92
Tabela 4. Informações referentes aos iniciadores utilizados para amplificação dos promotores dos genes <i>Whirly</i>	95
Tabela 5. Resumo da análise de variância para o desempenho relativo (DR) dos caracteres comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco de raiz (PSR), dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos ao estresse por baixas temperaturas.	96
Tabela 6. Resumo da análise de variância para o desempenho relativo (DR) dos caracteres comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco de raiz (PSR), dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos ao estresse por salinidade..	97

Sumário

Resumo	9
Abstract.....	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas	13
1. Introdução geral	16
1.1 Objetivo geral	18
1.2 Hipótese.....	18
Referências Bibliográficas	18
2. CAPÍTULO I	20
Revisão Bibliográfica.....	20
2.1. Classificação botânica, morfologia e aspectos genéticos do arroz	20
2.2. Importância econômica	21
2.3. Efeito dos estresses abiótico no arroz	22
2.4. O problema das baixas temperaturas	23
2.5. O estresse por baixas temperaturas	25
2.6. Sinalização celular sob estresse por baixas temperaturas	28
2.7. Mecanismos adaptativos das plantas ao estresse por baixas temperaturas.....	32
2.8. O problema da salinidade	34
2.9. O estresse por salinidade	36
2.10. Sinalização celular sob estresse salino.....	39
2.11. Mecanismos adaptativos das plantas ao estresse salino.....	42
2.12. Fatores de transcrição, Elementos Regulatórios de ação <i>cis</i> (ERACs) e Sinalização.....	44
2.13. Fatores de transcrição Whirly (Why)	45
Referências Bibliográficas	54
3. CAPÍTULO II.....	71
Identificação e caracterização dos genes <i>Whirly</i> no gênero <i>Oryza</i>.....	71
3.1 Introdução	71
3.2 Material e Métodos.....	72
3.2.1 Obtenção de sequências, construção de árvore filogenética, estrutura dos genes e estrutura de proteínas Whirly.....	72
3.2.2 Identificação de Elementos Regulatórios de Ação <i>cis</i> (ERACs) em promotores de genes <i>Whirly</i>	73
3.3 Resultados e Discussão.....	74

3.3.1 Identificação e caracterização de genes <i>Whirly</i> em <i>Oryza</i>	74
3.3.2 Regulação da expressão de genes <i>Whirly</i> no gênero <i>Oryza</i>	79
3.4 Conclusão	81
Referências Bibliográficas	82
4. CAPÍTULO III	85
Caracterização funcional de genes <i>Whirly</i> em plântulas de arroz sob estresse por baixas temperaturas e salinidade	85
4.1 Introdução	85
4.2 Material e métodos	87
4.2.1 Caracterização morfológica	88
4.2.2 Extração de RNA total	89
4.2.3 Síntese de cDNA	90
4.2.4 Desenho de iniciadores para RT-qPCR	90
4.2.5 Validação dos iniciadores	93
4.2.6 Expressão gênica em tempo real	93
4.2.7 Regulação da expressão gênica	94
4.3 Resultados e discussão	96
4.3.1 Avaliação morfológica de plântulas de arroz sob condição de estresse por baixas temperaturas e salinidade	96
4.3.2 Expressão gênica	97
4.3.3 Presença de ERACs na região promotora de genes <i>Whirly</i> em genótipos de arroz tolerante e sensível a salinidade e baixas temperaturas	100
4.4 Conclusão	102
Referências Bibliográficas	103
Apêndices	106

1. Introdução geral

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. É considerado a base alimentar para mais da metade da população mundial (VANLALSANGA e YENGKHOM, 2019), desempenhando papel importante nos níveis econômicos e sociais de países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (SECK et al., 2012). Além da alta demanda de arroz para o consumo humano, tem-se registrado alterações ambientais que afetam o desenvolvimento e a produtividade do arroz. Estes fatores ambientais tornam os genótipos cultivados mais propensos à estresses abióticos como seca, calor, frio e salinidade (FAHAD et al., 2017). Os estresses abióticos são eventos complexos, que podem provocar danos para a cultura em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (AHMAD, 2019).

No Rio Grande do Sul é bastante comum a ocorrência de baixas temperaturas, principalmente durante o período noturno, geralmente a partir do mês de fevereiro, o que acaba coincidindo com o estágio reprodutivo do arroz, diminuindo seu potencial produtivo (STEINMETZ, DEIBLER e SILVA, 2013). Existem alternativas para se evitar que o estágio reprodutivo coincida com o período de baixas temperaturas, como, por exemplo, utilizar cultivares precoces ou antecipar a semeadura, fazendo com que no período reprodutivo as temperaturas sejam mais amenas (MERTZ, et al., 2009). Entretanto, um dos desafios é encontrar genótipos precoces que se adequem as necessidades do produtor, apresentando boa resposta frente ao ambiente de cultivo e bom potencial produtivo. Já a antecipação da semeadura do arroz também predispõe as sementes, plântulas e plantas jovens ao frio, tornando inevitável a exposição do cereal a esse fator estressante (MERTZ, et al., 2009).

Além das baixas temperaturas, o Rio Grande do Sul, principal região produtora de arroz no Brasil, apresenta incidência de salinidade no solo em muitas regiões, o que causa perdas na produtividade (LEMES, 2018). A salinidade torna-se um problema neste estado devido a fonte de água para irrigação das lavouras, principalmente nas planícies costeiras. A água nesta região é advinda da Laguna dos Patos, que dependendo da taxa pluviométrica mensal, acaba recebendo água salina do Oceano Atlântico, aumentando o teor de sal no solo (SOSBAI, 2018). Ademais, a própria formação do solo afeta o desenvolvimento das plantas, pois esses são originários de sedimentos

costeiros, que por si só já justifica os altos índices de sais solúveis (PEDROTTI, 2015).

Visto que as alterações ambientais adversas causam uma série de impactos não benéficos para o crescimento e desenvolvimento do arroz, a biotecnologia surge como uma aliada na busca por cultivares que sejam tolerantes ao estresse por frio nas fases críticas da cultura. A busca por genótipos tolerantes é uma alternativa viável, em função da dificuldade que se tem de controlar as temperaturas através das práticas de manejo comumente empregadas na cultura (CRUZ e MILLACH, 2000).

O controle da tolerância à estresses abióticos como baixas temperaturas e salinidade apresentam herança quantitativa, ou seja, o processo é controlado por muitos genes, o que acaba dificultando os processos relacionados com o melhoramento genético na obtenção de genótipos eficientes quando submetidos a esses estresses (COLLINS, 2008). De modo a auxiliar os estudos, ferramentas como a biologia molecular apresenta-se promissoras, principalmente na identificação de genes que podem estar associados com a participação na resposta a estresses (SAHEBI, et al., 2018).

Durante o processo de resposta a condições de estresse, as plantas apresentam diferentes mudanças, tanto na expressão de genes quanto no metabolismo e fisiologia (LICHTENTHALER, 1998). A regulação da expressão gênica é um elemento importante na sinalização de estresses abióticos, e esta é mediada através da ativação de genes pelos fatores de transcrição (FTs) (ALMEIDA, 2016). Os FTs se ligam a elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs), que normalmente estão presentes na região promotora do gene-alvo, dando início a uma cascata de sinalização. Isto resulta em redes complexas de regulação para padrões de expressão altamente controlados e específicos. Com muito esforço, a comunidade científica têm identificado diferentes famílias de FTs envolvidos na resposta das plantas sob condições de estresses (PRIYA e JAIN, 2013).

Inúmeros estudos têm sido conduzidos para identificar e avaliar a funcionalidade de FTs, no entanto, a família *Whirly* é pouco estudada. Essa família está envolvida na resposta ao ataque do patógeno *Phytophthora infestans* em batata (MATTON e BRISSON, 1989), além de estar relacionada com tolerância a estresses por déficit hídrico e maior resistência a *Pseudomonas solanacearum* em tabaco (ZHAO et al., 2018). Tendo em vista que a cascata de

sinalização do estresse por seca, que desencadeia a ativação dos *Whirly*, pode ser semelhante a cascata de ativação para sal e baixas temperaturas, é interessante verificar se esses genes estão envolvidos nestes estresses. Entretanto, a participação dos FTs da família *Whirly* em respostas a estresses por baixas temperaturas e salinidade em arroz ainda não é conhecida.

Com base no exposto, é importante identificar e caracterizar esses genes em espécies selvagens, como possíveis fonte de variabilidade genética. Além disso, é de fundamental importância entender a participação dos FTs *Whirly* na resposta de plântulas de arroz sob condições de salinidade e baixas temperaturas. A compreensão da sinalização em resposta aos estresses pode contribuir com o aumento da capacidade de tolerância do arroz aos estresses ambientais.

1.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar os genes *Whirly* no gênero *Oryza* e investigar a participação desses genes na resposta aos estresses por salinidade e baixas temperaturas em plântulas de arroz.

1.2 Hipótese

Espécies do gênero *Oryza* acumularam mutações com relação ao número e estrutura dos genes *Whirly*, os quais estão envolvidos na resposta aos estresses por baixas temperaturas e salinidade em plântulas de *Oryza sativa*.

Referências Bibliográficas

- AHMAD, R.; HUSSAIN, S.; ANJUM, M. A.; KHALID, M. F.; SAQIB, M.; ZAKIR, I.; HASSAN, A.; FAHAD, S.; AHMAD, S. Abiotic Stress Responses in **Plants: Present and Future** In: MANTRI, N.; PATADE, V.; PENNA, S.; FORD, R.; PANG, E. (Eds.). Plant Abiotic Stress Tolerance, p. 18-36, 2019.
- ALMEIDA, D. S. M. Estudos funcionais de fatores de transcrição envolvidos na interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa*. 2016. 135p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2016.
- COLLINS, N. C.; TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? **Plant Physiology**, v.147, p.469-486, 2008.
- CRUZ, R. P. da; MILACH, S. C. K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 909-917, 2000.
- FAHAD, S.; BAJWA, A. A.; NAZIR, U.; ANJUM, S. A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A.; SADIA, S.; NASIM, W.; ADKINS, S.; SAUD, S.; IHSAN, M. Z.; ALHARBY, H.; ADKINS, S.; WU, C.; WNAG, D.; HUANG, J. Crop production under drought and

heat stress: Plant responses and management options. **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017.

LEMES, E. S.; MENEGHELLHO, G. E.; OLIVEIRA, S. de.; MENDONÇA, A. O. de.; NEVES, E. H.; AUMONDE, T. Z. Salinidade na cultura do arroz irrigado: características agronômicas e qualidade de sementes. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.4, 2018.

LICHTENTHALER, H. K. The stress concept in plants: an introduction. **Annals New York Academy of Sciences**, v.851, p.187-198, 1998.

MATTON, D.P; BRISSON N. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts in potato. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 2, p. 325-331, 1989.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; SOARES, R. C.; BALDIGA, R. F.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, 2009.

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; PRATA, A.P. N.; LUCAS, A. A. T.; SANTOS, P. B. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.19, n.2, p.1308-1324, 2015.

PRIYA, P.; JAIN, M. RiceSRTFDB: A database of rice transcription factors containing comprehensive expression, cis-regulatory element and mutant information to facilitate gene function analysis. **Database**, v.2013, 2013.

SAHEBI, M.; HANAFI, M. M.; RAFII, M. Y.; MAHMUD, T. M. M.; AZIZI, P.; OSMAN, M.; ABIRI, R.; TAHERI, S.; KALHORI, N.; SHBANIMOFRAD, M.; MIAH, G.; ATABAKI, N. Improvement of drought tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.): Genetics, Genomic tools, and the WRKY gene family. **BioMed Research International**, v.18, 20p., 2018.

SECK, P. A.; DIAGNE, A.; MOHANTY, S.; WOPEREIS, M. C. S. Crops that feed the world 7: Rice. **Food Security**, v.4, p.7-24, 2012.

SOSBAI - **Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado**. Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Cachoeirinha: SOSBAI, 2018. 205p.

STEINMETZ, S.; DEIBLER, A. N.; SILVA, J. B. da. Estimativa da produtividade de arroz irrigado em função da radiação solar global e da temperatura mínima do ar. **Ciência Rural**, v.43, n.2, 2013.

VANLALSANGA, S. P. S.; YENGKHOM, T.S. Rice of Northeast India harbor rich genetic diversity as measured by SSR markers and Zn/Fe content. **BMC Genetics**, v.20, p. 79, 2019.

ZHAO, S. Y.; WANG, G. D.; ZHAO, W. Y.; KONG, F. Y.; MENG, Q. W. Overexpression of tomato WHIRLY protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. **Biologia Plantarum**, v.62, n.1, 2018.

2. CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

2.1 Classificação botânica, morfologia e aspectos genéticos do arroz

O arroz é uma planta de origem tropical, pertencente à família Poaceae, subfamília Pooideae, tribo Oryzae e gênero *Oryza*, classificado como gramínea monocotiledônea (NCBI TAXONOMY, 2019). O gênero *Oryza* é composto por 23 espécies (VAUGHAN e CHANG, 1995; ZHAO et al., 2009), e destas, somente duas são cultivadas, a *Oryza sativa* L. domesticada na Ásia há 10.000 anos, e por isso chamada muitas vezes de arroz asiático, e a *Oryza glaberrima* Steud. domesticada na África há 3.000 anos (PEREIRA e MORAIS, 2014). No caso da *O. sativa*, devido a uma série de eventos evolutivos e domesticação, inúmeros indivíduos geneticamente diferentes foram se formando, de modo a dividir a espécie em duas principais subespécies, *indica* e *japonica*, que apresentam características morfológicas distintas (SWEENEY e MCCOUCH, 2006). Porém, alguns estudos dividem a espécie *O. sativa* em sete grupos, *indica*, *japonica temperada*, *japonica tropical*, *aus*, *aromatico*, *ashina* e *rayada* (GLASZMANN, 1987; WANG et al., 2014).

O. sativa L. é uma espécie semi-aquática, adaptada a uma variedade de condições climáticas (HEMAMALINI et al., 2000; TERRA et al., 2013). Caracteriza-se por apresentar flores reduzidas, aquênios especializados como frutos e colmos ocos. A planta se caracteriza morfológicamente por apresentar raízes fibrosas e do tipo adventícias. O caule é composto por um colmo principal e seus afilhos, e as folhas apresentam variação entre os genótipos, sendo que a última folha presente no colmo é denominada de folha bandeira. A panícula é uma inflorescência característica desta planta, onde se formam os grãos (SOUZA et al., 2015).

A inflorescência do arroz é composta por espiguetas, que são formadas por um par de glumelas florais estéreis (pálea e a lema) as quais apresentam a função de proteção da semente (OUYANG e ZHANG, 2013). Cada espiguetas é composta por seis estames e um pistilo (DATTA, 1981). Durante a reprodução, o estigma revela a capacidade de capturar os grãos de pólen que estão presentes nos estames, e os conduzem ao ovário, onde entram em contato com o óvulo e ocorre a fecundação. A auto-fertilização é favorecida devido ao fenômeno denominado cleistogamia, no qual as anteras possuem deiscência na

época do amadurecimento da parte feminina, ocorrendo a polinização de forma natural, e sem a abertura das flores (JAGOE, 1931; MATSUI e KAGATA, 2003; KOIKE et al., 2015).

O arroz (*O. sativa* L.) foi uma das primeiras espécies cultivadas a ter seu genoma completamente sequenciado. O sequenciamento realizado através do *International Rice Genome Sequencing Project* envolveu laboratórios de diversos países (IRGSP, 2005) e revelou características de extrema importância para estudos de genômica funcional (IZAWA e SHIMAMOTO, 1996; GOFF, 1999, SHIMAMOTO e KYOZUKA, 2002; JACKSON, 2016). O arroz apresenta um genoma de 390 Mb, 12 cromossomos e diploide ($2n=24$) (MAGALHÃES; OLIVEIRA, 2008). Comparado aos principais cereais cultivados, sorgo, milho, trigo e cevada, o genoma do arroz é considerado pequeno (OHMIDO et al., 2010), e serve como referência em estudos com outras culturas importantes na agricultura por apresentar colinearidade com os genomas de outros cereais (MOORE et al., 1995).

2.2. Importância econômica

Atualmente, o arroz é considerado uns dos mais importantes alimentos destinados a dieta humana, servindo como fonte de energia para mais da metade da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (SECK et al., 2012), desempenhando papel estratégico nos níveis econômico e social. Os países asiáticos são os maiores consumidores de arroz, apresentando as médias mais elevadas ($78 \text{ kg pessoa ano}^{-1}$). Dentre os países da América do Sul, o Brasil se destaca pelo alto consumo de arroz, com média de 32 kg/pessoa/ano (SOSBAI, 2018).

A produção mundial de arroz na safra 2018/2019 foi de 490 milhões de toneladas (t), em 162,7 milhões de hectares (ha) de área cultivada, com produtividade média de $4,500 \text{ kg ha}^{-1}$, sendo a China líder do ranking de produção mundial (USDA, 2019). Além do destaque de consumo dentre os países da América do Sul, o Brasil é o principal produtor de arroz fora do continente asiático, tendo sido registrada uma produção de 11,2 milhões de toneladas na safra de 2018/2019, em uma área de 1,8 milhões de ha, e produtividade de 6.100 kg ha^{-1} . A região sul do Brasil é responsável por grande parte do arroz produzido, e o estado do Rio Grande do Sul (RS), com 7,8 milhões

de toneladas produzidas, e produtividade média maior que a nacional, de 7.700 kg ha⁻¹, sendo considerado o Estado com maior produção (CONAB, 2019). A alta produção de arroz no RS se deve ao sistema de produção, o qual utiliza irrigação por inundação.

Os dados de produção demonstram que o arroz apresenta papel importante na segurança alimentar mundial, a qual está ameaçada pelo aumento progressivo da população e as mudanças climáticas adversas em curso (QIAN et al., 2016). Algumas alterações ambientais que vem sendo registradas têm impacto direto no desenvolvimento e potencial produtivo da cultura do arroz. Nesse sentido, a busca por genótipos tolerantes aos estresses torna-se uma das principais estratégias utilizadas nos programas de melhoramento genético de arroz (CRUZ e MILACH, 2000).

2.3. Efeito dos estresses abióticos no arroz

As plantas crescem sob condições ambientais variáveis, que muitas vezes podem ser desfavoráveis para o seu crescimento e desenvolvimento (ASHRAF et al., 2018). Estas condições compreendem os estresses abióticos causados por fatores ambientais, como por exemplo excesso ou déficit hídrico, altas ou baixas temperaturas e salinidade, os quais são os maiores desafios em escala global na produtividade do arroz. Um estresse abiótico é definido como um evento complexo, causado por condições ambientais adversas e possui a capacidade de provocar danos em distintos estádios de desenvolvimento da planta. Essa, por sua vez responde de forma diversa a esses eventos (CRAMER, 2010) através de variados mecanismos, e da combinação desses, para que possam tolerar essa condição (SKIRYCZ e INZE, 2010).

A complexidade dos eventos de estresse abiótico em plantas é devido a participação de diversos genes de resposta, compreendendo uma herança quantitativa (COLLINS et al., 2008; HONG et al., 2016). Dessa forma, o envolvimento de diversos genes na resposta ao estresse dificulta os processos de melhoramento genético que visam a identificação de genes associados a tolerância para posterior utilização no desenvolvimento de genótipos capazes de sobreviver e se desenvolver sob estresses (MICKELBART et al., 2015). Os produtos desses genes levam a uma série de modificações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas nas plantas, e muitas vezes as cascatas de

sinalizações moleculares e fisiológicas podem ser confundidas entre os diferentes estresses, o que torna difícil a identificação dos genes de tolerância para estresses específicos (VINOCUR e ALTMAN, 2005; LEI et al., 2013). Dentre vários estresses abióticos que causam redução na produtividade, o estresse por baixas temperaturas e a salinidade são uma ameaça para a cultura do arroz, devido a esses eventos causarem forte redução na produtividade. Além disso, a resposta a esses estresses é controlada por um grande número de genes, que se expressam em diversos estádios de desenvolvimento da planta (ZENG et al., 2001; ANDAYA e MACKILL, 2003; CRUZ et al., 2013; HOANG et al., 2016).

2.4. O problema das baixas temperaturas

As mudanças climáticas, que levam a instabilidade das condições ambientais, são um desafio para a produção de arroz. O arroz cresce e se desenvolve em temperatura ideal entre 25 °C e 30 °C (YOSHIDA, 1981). No entanto, temperaturas inferiores são registradas nas regiões produtoras de arroz, e podem afetar um ou mais estádios de desenvolvimento, causando perdas significativas na produtividade deste cereal (BOSETTI et al., 2012).

As baixas temperaturas constituem um grande problema para o cultivo de arroz em 25 países, por exemplo, na Austrália, a perda média de rendimento devido ao estresse pelo frio foi de 0,5 a 2,5 t ha⁻¹ em 75% dos anos (SINGH, et al., 2002). No norte da Coreia e do Japão as baixas temperaturas afetam principalmente o estágio reprodutivo do arroz, sendo que nessa região do Japão, geralmente a mais produtiva comparado com outras regiões, há grandes flutuações na produtividade ano após ano, com perdas notáveis nos anos de temperaturas mais baixas (NAKAGOMI, 2013). A perda de rendimento por baixas temperaturas não ocorre apenas em áreas de alta latitude ou alta altitude, mas também em países tropicais como Filipinas e Tailândia (ALMADANIM et al., 2017).

No Sul da América Latina, o Chile apresenta temperaturas menores que a ótima requerida para o cultivo do arroz, durante todo o período de crescimento e desenvolvimento da cultura (outubro a março), afetando principalmente os estádios vegetativo e de floração (BACERRA et al., 2017). No Uruguai e Argentina, as baixas temperaturas podem reduzir até 25% do rendimento final do arroz, sendo a subespécie *indica* representando quase a totalidade do arroz,

a qual apresenta a característica de sensibilidade a baixas temperaturas (ARSHAD et al., 2017).

No Brasil, maior produtor de arroz fora do continente Asiático e líder do ranking de produção no continente Americano, as baixas temperaturas causam danos na cultura, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul (RS), que representa 70% da produção nacional (CRUZ et al., 2013). Neste Estado, o arroz é semeado de setembro a dezembro, com predominância nos meses de outubro e novembro, período em que a temperatura média é de 15°C (CRUZ et al., 2006). Pela predominância da subespécie *indica* nas áreas de cultivo no RS, o estresse por baixas temperaturas causa uma série de mudanças moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas. Este efeito se deve por esta subespécie apresentar sensibilidade a baixas temperaturas, no início do plantio, o que afeta negativamente a sobrevivência e adaptação das plantas sob estas condições desfavoráveis (MARTINI et al., 2014).

No período reprodutivo, especialmente no momento de extrusão da panícula, quando esta começa a emergir da bainha da folha bandeira (estádio R3) (Tabela 1) (COUNCE et al., 2000), as baixas temperaturas provocam dano maior do que aquele que acomete as plântulas, por reduzir diretamente o rendimento. O impacto no rendimento se dá pois nesse estágio há a produção dos grãos de pólen, que é afetado pelas baixas temperaturas que causa distúrbios na meiose e mitose, afetando a formação dos micrósporos, causando a esterilidade das espiguetas (SHINADA et al. 2013; MAIA et al., 2017). A tolerância ao estresse causado pelo frio é importante ao longo do ciclo de vida da planta de arroz (KOSEKI et al., 2010), também tem impacto na germinação (estádio S3) quando o coleóptilo se alonga (COUNCE et al., 2000) e a medida em que a plântula se desenvolve (estádios V1 a V4) (Tabela 1) (SHAKIBA et al., 2017).

Tabela 1. Descrição de eventos e marcadores morfológicos relativos às fases e estádios de desenvolvimento da planta de arroz.

Fase de desenvolvimento	Estádio	Marcador morfofisiológico
Germinação	S0	Semente
	S1	Emergência do coleóptilo
	S2	Emergência da radícula

Vegetativa	S3	Emissão da primeira folha incompleta
	V1	Formação do colar da 1ª folha no colmo principal
	V2	Formação do colar da 2ª folha no colmo principal
	V3	Formação do colar da 3ª folha no colmo principal
	V4	Formação do colar da 4ª folha no colmo principal
	Vn	Formação do colar da na folha (folha-bandeira) no colmo principal
Reprodutiva	R0	Início do desenvolvimento da panícula
	R1	Diferenciação da panícula
	R2	Formação do colar da folha-bandeira
	R3	Emissão da panícula na bainha, ponta acima do colar
	R4	Antese: um ou mais floretes da panícula em antese
	R5	Expansão do grão em comprimento e largura: ao menos uma cariopse da panícula do colmo principal apresenta alongamento
	R6	Expansão do grão em comprimento e largura: ao menos uma cariopse da panícula do colmo principal preencheu completamente a casca
	R7	Secamento do grão: ao menos um grão do colmo principal apresenta-se com pericarpo amarelo
	R8	Maturação do grão: ao menos um grão do colmo principal apresenta-se com pericarpo marrom
	R9	Completa maturidade da panícula: todos os grãos apresentam-se com pericarpo marrom.

Fonte: Adaptada de COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. L., A Uniform and adaptative system for expressing rice development. Crop Science, v.40, p.436-443. 2000.

2.5. O estresse por baixas temperaturas

A ocorrência de baixas temperaturas é um dos fatores mais importantes que levam à substanciais perdas agrícolas em diversas culturas, sendo assim, a capacidade das plantas em tolerar essa condição torna-se um fator determinante para a produtividade. O clima da área de origem da espécie tem grande influência na sua sensibilidade em relação ao congelamento e resfriamento (ZHENG et al., 2016). Muitas plantas temperadas podem tolerar temperaturas

abaixo de zero e após a exposição dessas à baixas temperaturas, por certo período de tempo, aumentam a tolerância ao congelamento, processo denominado de aclimação (XIN e BROWSE, 2000). No entanto, plantas que se desenvolvem em áreas tropicais ou subtropicais, como é o caso do arroz, a exposição a temperaturas baixas, porém acima de 0°C, pode induzir perdas na produtividade (SHINKAWA et al., 2013).

Para que as plantas possam manter a homeostase celular durante o estresse por baixas temperaturas, diversas mudanças em seus processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos são requeridos. Estas alterações estão associadas com as diferentes respostas ao estresse por baixas temperaturas ou *chilling* (0°C a 15°C) e por congelamento ou *freezing* (<0°C) (MALEKI e GHORBANPOUR, 2018).

Quando as plantas são afetadas pelo estresse por baixas temperaturas e/ou congelamento, uma das reações é a mudança da composição lipídica das membranas plasmáticas celulares e dos cloroplastos. No entanto, diferenças marcantes ocorrem durante os tipos de estresse. No congelamento (*freezing*) com a formação dos cristais de gelo no espaço apoplástico celular, o potencial osmótico da água diminui, o que resulta na saída deste soluto para o meio extracelular, causando desidratação da célula, podendo levar à morte celular. No processo de aclimação, para evitar a desidratação da célula, solutos compatíveis, como os carboidratos, se acumulam na célula de modo a reduzir a diferença de potencial da água entre o espaço apoplástico e dentro da célula (Figura 1) (RUELLAND et al., 2009).

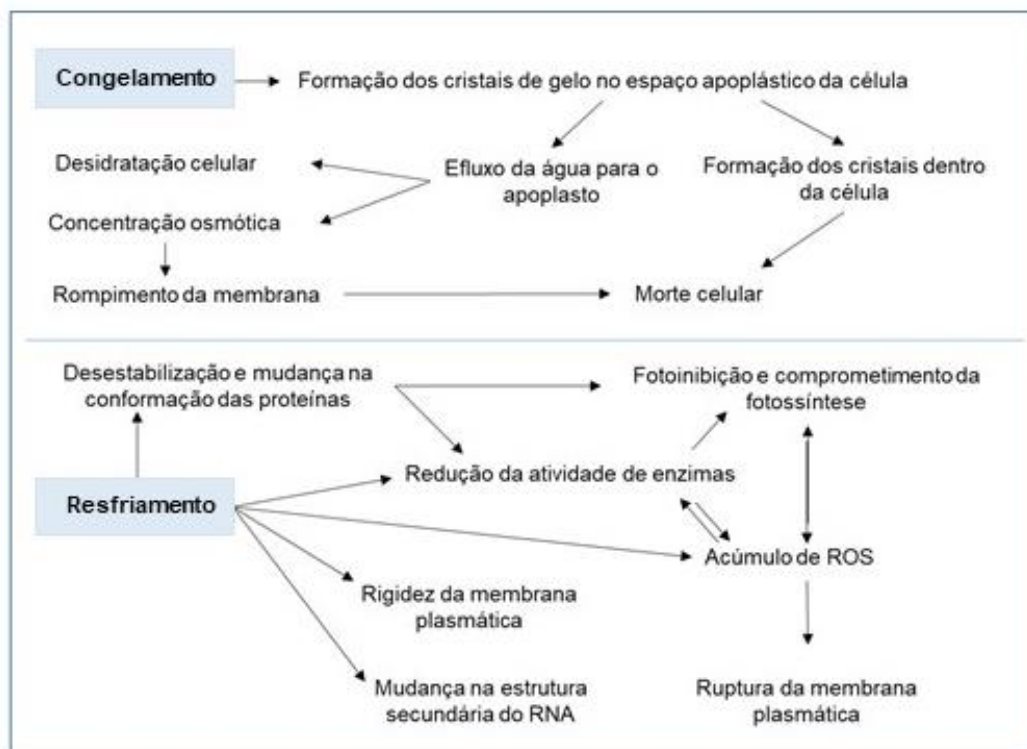


Figura 1. Efeitos das baixas temperaturas (*chilling*) e congelamento (*freezing*) na célula.

Fonte: Adaptada de RUELLAND, E.; VAUTIER, M.; ZACHOWSKI, A.; HURRY, V. Cold signaling and cold acclimation in plants. In: *Advances in Botanical Research*, v.49, 2009, p.35-150.

Por outro lado, as baixas temperaturas (*chilling*) têm a capacidade de reduzir de forma termodinâmica a cinética das reações metabólicas que ocorrem dentro da célula, fazendo com que haja perturbação na estabilidade de proteínas ou complexos de proteína, podendo mudar a conformação dessas. Este desequilíbrio favorece que a membrana plasmática fique rígida, o que leva à perturbação de suas funções, dentre elas, a abertura de canais iônicos e reações de transferência de elétrons associadas à membrana plasmática (RUELLAND et al., 2009).

Além disto, o estresse por baixas temperaturas também está associado à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como $^1\text{O}_2$ (oxigênio singleto), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superóxido) e o seu acúmulo no meio celular (MALEKI et al., 2017). Essas moléculas participam de uma aprimorada rede de vias de sinalização em plantas, em resposta à situações de estresse, com a influência na expressão de vários genes, agindo, portanto, como moléculas sinalizadoras ou mensageiros secundários (BARBOSA et al., 2014). As EROs são produzidas em pequenas quantidades dentro dos cloroplastos,

mitocôndrias e peroxissomos (MITTLER, 2017). Sob a condição de baixas temperaturas as EROs aumentam, e a atividade das enzimas que realizam a eliminação dessas moléculas é reduzida, o que prejudica as reações de transferências de elétrons mitocondriais e cloroplásticos, levando ao comprometimento da fotossíntese. O acúmulo de EROs tem efeitos deletérios, especialmente na membrana plasmática, resultando no extravasamento de íons. Além disso, as baixas temperaturas afetam a formação das estruturas secundárias do RNA, perturbando dessa forma a expressão de genes e proteínas (RUELLAND et al., 2009).

2.6. Sinalização celular sob estresse por baixas temperaturas

As membranas celulares das plantas têm a capacidade de receber sinais intra e extracelulares, fato esse permitido graças ao processo evolutivo desde as primeiras membranas fosfolipídicas até as atuais (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2010). As moléculas de fitohormônios, por sua vez, desempenham papel de mensageiros químicos para comunicar atividades celulares em plantas (VOB et al., 2014), participando na coordenação de várias vias de transdução de sinal durante a exposição da planta ao estresse, regulando estímulos externos e internos da célula (WANI et al., 2016). Entre os fitohormônios, o ácido abscísico (ABA), auxina, ácido giberélico e ácido jasmônico estão relacionados às respostas a baixas temperaturas de forma positiva ou negativa (MIURA e FURUMOTO, 2013).

O ABA é um fitohormônio de extrema importância nas plantas, devido a sua relação com a regulação de diversos processos celulares, os quais inclui a superação de dormência de sementes, transição do estado embrionário para o estado de dormência e crescimento vegetativo, exercendo também funções na resposta à estresses (SAH et al., 2016). Quando as plantas são expostas as baixas temperaturas, para muitas espécies há um aumento transitório no conteúdo de ABA, que está associado a aclimação ao frio e a indução de fatores de transcrição (FTs) (HEIDARVAND; AMIRI, 2010). Nas plantas, a resposta ao estresse por frio é regulada por vias independentes de ABA com diafonia (*crosstalk*) entre vias dependente e independentes de ABA (KASHYAP; DESWAL, 2019).

Na via de sinalização dependente de ABA ocorre a ativação de genes responsivos ao frio (genes COR) (SHI; YANG, 2014). Esses genes apresentam em suas regiões promotoras o ERAC ABRE (elemento de resposta ao ABA) (XIONG et al., 2002). Esses ERACs são reconhecidos por FTs AREBs / ABFs (elemento de ligação responsivo ao ABA / fator de ligação a ABRE) (Figura 2). Proteínas de ligação AREB / ABF pertencem a subfamília bZIP. Outros fatores de transcrição também atuam na sinalização dependente de ABA, como MYB, MYC e WRKY (NAKASHIMA et al., 2014; SINGH e LAXMI, 2015), ligando-se em ERACs presentes na região promotora de diferentes genes funcionais ativando-os.

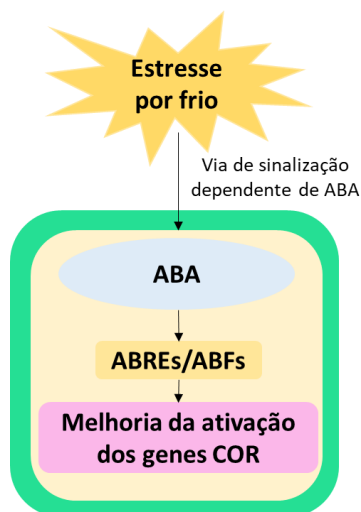


Figura 2. Diagrama esquemático dos elementos reguladores da transcrição sob estresse por frio na via de sinalização dependente de ABA.

Fonte: Adaptada de SHI; DING; YANG, 2014. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation. In: Plant and Cell Physiology, v.56, n.1, p.7-15, 2014.

Na via de sinalização independente de ABA, FTs como CBFs (fator de ligação a repetição C) e DREB1s (fatores de ligação responsivos a desidratação) controlam a expressão dos genes COR em resposta ao estresse por frio. Estes FTs se ligam nos ERACs do DNA responsivos ao frio e à desidratação (DRE) e também as CRTs (região C repetitiva). Os ERACs CRT/DRE contêm a sequência central conservada do CCGAC, que quando ligados por CBFs/DREBs é suficiente para induzir a transcrição de genes COR sob estresse por frio (HEIDARVAND; AMIRI, 2010) (Figura 3).

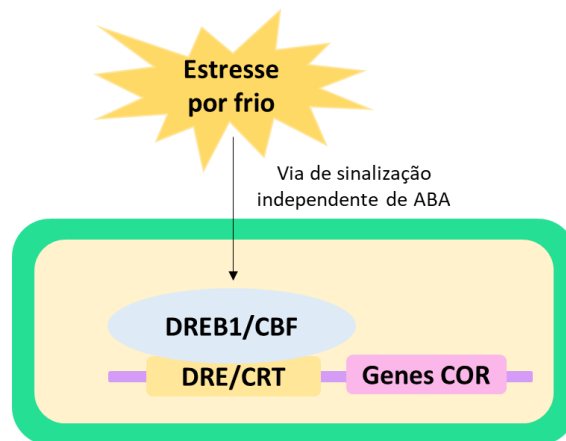


Figura 3. Diagrama esquemático dos elementos reguladores da transcrição sob estresse por frio na via de sinalização independente de ABA.

Fonte: Adaptada de FERNANDO, 2018. Cross talk between cold stress response signaling pathway and other stress response pathways. In: WANI, S. H.; HERATH, V. (Ed.). Cold Tolerance in Plants, 2018, p. 103-109.

Alguns genes COR contém ERACs ABRE, juntamente com CRT/DRE em sua região promotora, podendo ser ativados por AREBs / ABFs e DREBs, ou seja, de modo dependente e independente de ABA (UNO et al., 2000). O ácido giberélico participa da sinalização nas plantas em condição de estresse. Entre os componentes de sinalização deste ácido, as proteínas DELLA participam como as moléculas de sinalização que impedem o crescimento das plantas em condições ambientais adversas, promovendo a sobrevivência (ACHARD et al., 2008). Além disto, as proteínas DELLA contribuem significativamente para a função da ativação dos fatores de transcrição CBF durante a aclimação ao frio e a tolerância ao congelamento, pela via de sinalização ao estresse independente de ABA. Os CBFs inibem o crescimento das plantas pela via de sinalização ácido giberélico/DELLA (KASHYAP; DESWAL, 2019).

O ácido jasmônico é um fitohormônio que em condições de estresse afeta negativamente o crescimento das plantas (WASTERNAK, 2013). Na via de sinalização do estresse causado por baixas temperaturas, dependente do FT CBF, o ácido jasmônico atua na via ácido giberélico/DELLA. Os ácidos giberélicos e jasmônicos têm efeito antagônico no crescimento das plantas, podendo ocorrer a inibição da síntese de ácido giberélico ativo como também de outras vias de sinalização via proteínas DELLA (HEINRICH et al., 2013).

A auxina é responsável por regular o crescimento e desenvolvimento das plantas. Entretanto, em condição de baixas temperaturas, há uma inibição seletiva do tráfego intracelular de um subconjunto de proteínas, incluindo

transportadores do efluxo de auxina, fazendo com que haja um transporte reduzido desse fitohormônio (RAHMAN, 2012). Na condição de estresse por baixas temperaturas, um componente da via de sinalização do estresse por frio dependente do FT CBF, denominando SIZ1, reprime a poliubiquitinação do ICE1 (indutor da expressão do CBF) (MIURA et al., 2007), afetando a arquitetura da raiz. A raiz é remodelada negativamente por falta de fosfato mediado pelo controle da auxina (MIURA et al., 2011), e isto, faz com que a raiz fique mais superficial.

A mudança de fluidez na membrana plasmática é um dos efeitos imediatos ocasionado pelo estresse por frio, considerado, portanto, como um sensor primário à baixas temperaturas (UDAWAT; DEVESHWAR, 2018; VISWANATHAN; ZHU, 2002). O influxo de Ca^{2+} no citosol é um evento precoce da aclimação ao frio (ZHAO et al., 2017). A rigidez da membrana plasmática em microdomínios pode levar a um rearranjo do citoesqueleto, indução dos canais sensíveis ao Ca^{2+} e aumento de Ca^{2+} no citosol, que desencadeia a expressão gênica induzida pelo frio e a aclimação a ele (VISWANATHAN; ZHU, 2002). Uma série de proteínas podem detectar o cálcio intracelular incluindo calmodulina (CaM) (ZIELINSKI, 1998), proteínas do tipo CaM (CML), proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) e proteínas do tipo calcineurina B (CBLs) (ALMADANIM et al., 2018). Estas proteínas sofrem modificações em suas conformações mediadas pelo cálcio, levando a alterações na estrutura e atividade (fosforilação ou desfosforilação), que posteriormente, junto aos mensageiros secundários (fitohormônio ABA e EROs), realizam a sinalização ao frio (UDAWAT; DEVESHWAR, 2018).

O estresse por baixas temperaturas causa o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células das plantas (LIU et al., 2019). O acúmulo excessivo desta molécula na célula ocasiona estresse oxidativo e pode levar a danos e a morte da planta. Durante o curso evolutivo, as plantas, passaram a utilizar o H_2O_2 como molécula de ignição para ativação de genes em condição de estresse (DRÖGE, 2002). Em resposta ao estresse por frio, o H_2O_2 trabalha em coordenação com óxido nítrico (LIU et al., 2020), ABA, ácido jasmônico e etileno (WANG et al., 2016). Especialmente na resposta ao frio, as EROs, como H_2O_2 , podem alterar estímulos necessários ao acúmulo de cálcio, ativar proteínas quinases (MAPK) e FTs responsivos a reações redox (KHEDIA; AGARWAL;

AGARWAL, 2019), além de participar da expressão dos genes COR (genes responsivos ao frio) (LEE et al., 2002), importantes para aclimação das plantas sob esse estresse (TEIGE et al., 2004).

2.7. Mecanismos adaptativos das plantas ao estresse por baixas temperaturas

As plantas tolerantes ao frio desenvolveram ao longo da evolução mecanismos adaptativos. Durante a aclimação ao frio inúmeros processos fisiológicos preparam as plantas para enfrentar temperaturas abaixo de zero. Nas plantas tolerantes existem proteínas que auxiliam na capacidade de suportar o congelamento, denominadas anticongelantes (GUPTA; DESWAL, 2014). Estas proteínas apresentam duas funções importantes, a histerese térmica (DEVRIES et al., 1970) e a inibição da recristalização do gelo (KNIGHT; DUMAN, 1986). As proteínas anticongelantes ligam-se aos cristais de gelo que são formados preferencialmente no apoplasto. Quando o gelo cresce, as moléculas de soluto são excluídas da estrutura de gelo, exceto estas proteínas. O ácido jasmônico durante o estresse por baixas temperaturas é responsável pelo acúmulo de proteínas anticongelantes no meio celular (GUPTA; DESWAL, 2014).

O gelo se forma devido à cristalização das moléculas de água e cresce devido à recristalização do gelo, isto é, moléculas maiores de gelo crescem às custas das menores. As moléculas maiores de gelo são letais, pois impõem estresse físico à membrana plasmática e podem rompê-la, levando à morte da célula. Sendo assim, as proteínas anticongelantes inibem a recristalização e controlam o tamanho dos cristais para evitar danos físicos. Além disto, estas proteínas também apresentam a capacidade de reduzir a temperatura de congelamento da solução aquosa presente nas células, levando-a abaixo do seu ponto de fusão, causando uma diferença nos pontos de congelamento e fusão. Propriedade conhecida como histerese térmica. A água pura congela a 0°C a 1 atm; no entanto, devido à presença de vários solutos, a seiva celular congela entre -3°C e -4°C. Na presença de proteínas anticongelantes, o ponto de congelamento da seiva celular diminui ainda mais, evitando assim a formação de gelo nas plantas, mesmo se todo o resto estiver congelado do lado de fora (GUPTA; DESWAL, 2014).

A aclimação das plantas ao frio leva a respostas adaptativas com a finalidade de minimizar os efeitos adversos da desidratação celular. Estas respostas estão associadas ao acúmulo de solutos compatíveis e proteínas hidrofílicas, incluindo as desidrinas em vários compartimentos celulares. As desidrinas induzidas por baixas temperaturas exibem várias funções protetoras como: função crioprotetora, atividade anticongelante, fosforilação induzível ao frio, ligação de íons metálicos e atividades de eliminação de EROs. As desidrinas expressas por baixas temperaturas são reguladas pelas vias sinalizadoras dependente e independente de ABA (KOSOVÁ et al., 2010).

Moléculas crioprotetoras como açúcares solúveis (sacarose, rafinose, estaquiose, trealose), álcoois de açúcar (sorbitol, ribitol, inositol) e compostos nitrogenados de baixo peso molecular (prolina, glicina betaína) também são produzidos de modo a garantir melhores respostas das plantas às baixas temperaturas. Estes compostos juntamente com as desidrinas e proteínas anticongelantes agem em conjunto para estabilizar fosfolipídeos e proteínas da membrana citoplasmática, manter as interações hidrofóbicas, homeostase de íons e auxiliar na eliminação de EROs. Além da estabilização da membrana, estes compostos que auxiliam na aclimação ao frio também afetam a composição lipídica celular, necessária para a manutenção da funcionalidade da membrana plasmática (JANSKÁ et al., 2010).

Nas plantas a tolerância ao estresse causado por temperaturas extremas também está relacionada positivamente com o aumento de compostos antioxidantes. Vários sistemas de defesa, seja enzimático e não enzimático são observados nas plantas, de modo a minimizar os efeitos deletérios das EROs. Isto incluem enzimas (catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase, dehidroascorbato redutase, monodehidroascorbato redutase) e compostos não enzimáticos como o ascorbato, carotenoides, entre outros (GILL; TUTEJA, 2010; HASANUZZAMAN et al., 2012). Estudos em arroz demonstraram que um maior teor de ascorbato está associado a maior capacidade antioxidante e tolerância ao frio (GUO; ZHOU; ZHANG, 2006). Em alguns cereais verificou-se que o aumento de ascorbato e α -tocoferol nas folhas das plantas tolerantes ao frio ajudou a manter melhores os níveis de fotossíntese em comparação com as sensíveis (STREB; SHANG; FEIERABEND, 1999). Isto ocorreu pois devido a superprodução de ascorbato e α -tocoferol, o estresse

oxidativo foi minimizado, através da redução de EROs como H_2O_2 e $OH^\bullet$ (FORTUNATO et al., 2010).

2.8. O problema da salinidade

A necessidade pela produção de alimentos tem aumentado a cada ano devido ao crescimento populacional. Adicionalmente, o cultivo das culturas destinadas a alimentação humana é altamente dependente das condições climáticas (KROMDJIK; LONG, 2016), assim como, afetado pela concentração de sal nos solos (MAHMOOD-UR-RAHMAN et al., 2019), podendo levar a perdas significativas na produção. A salinidade do solo existe antes mesmo do início da prática da agricultura. No entanto, o problema agravou-se devido a práticas agrícolas como a irrigação (PARIHAR et al., 2014), utilização de água salobra (CARILLO et al., 2011), intrusão de água do mar, e oscilação do lençol freático (SOSBAI, 2018). Sendo, portanto, a salinidade, considerada como uma das principais causas de degradação dos solos, tornando-os inadequados ao cultivo (HOSSAIN, 2019).

Depois do estresse por déficit hídrico, a salinidade é a condição mais limitante para produção e produtividade das culturas em todo globo terrestre (OMISUN et al., 2017). A salinidade afeta, mundialmente, uma área estimada em cerca de 450 milhões de hectares (FAO, 2015). Estima-se que 50% da área cultivável do mundo será afetada com a salinidade até 2050 (FAO, 2009). Em particular, nas zonas costeiras do Sul e Sudeste da Ásia, responsáveis por mais de 65% da produção global de arroz, apresenta grande problema com a salinização dos solos, devido ao aumento do nível do mar, ocasionado pelas mudanças climáticas. Isto leva ao aumento da inundação e da entrada de sal na água doce, no interior do continente, encarregada da irrigação do arroz. Este problema leva ao abandono de muitas áreas para o pousio, o que reduz significativamente a produção do arroz e a segurança alimentar nessas regiões (RANDANIELSON et al., 2018; WASSMANN et al., 2009).

A Tailândia é um país de base agrícola e apresenta importante mercado mundial de arroz. No Nordeste deste país, aproximadamente 17% da área agricultável é afetada por sal devido a rochas salinas. Ao longo da região Sul e Leste, os solos costeiros são salinos por influência das marés, com a entrada de água salobra ou marinha. Estas regiões são usadas tanto para o cultivo de arroz

quanto para outras culturas comerciais, o que leva a perdas significativas na produtividade (ARUNIN; PONGWICHIAN, 2015). Nestas áreas, quando a salinidade e a água não eram fatores limitantes para produção, o suprimento de nutrientes do solo era suficiente para que se atingisse cerca de 80% do rendimento máximo da cultura do arroz (CLERMONT-DAUPHIN et al., 2010).

Na Índia, o arroz é um alimento básico para milhões de habitantes, fonte de subsistência para milhares de famílias, e arraigado na rica tradição cultural. O cenário referente à salinidade compromete a economia deste país, pois 8,4 milhões de hectares de terras agricultáveis são afetadas pelo alto teor de sal. Com isto, a maioria dos pequenos agricultores que vivem nestas regiões, costeiras, cultivando arroz, apresentam a necessidade de complementar suas baixas rendas com atividades econômicas fora das áreas afetadas. Em locais severamente afetados pelo sal, os que vivem da agricultura de subsistência, migram para áreas urbanas em busca de atividades que garantam o seu sustento, abalando a produção de arroz (THORAT; BAGKAR; RAUT, 2018; THIMMAPPA et al., 2019).

No Brasil, o Rio Grande do Sul, estado responsável por 70% da produção nacional de arroz, em geral não apresenta problemas com a salinização dos solos devido ao grande volume de chuvas, que são suficientes para lixiviar os sais (DENARDIN et al., 2018). Entretanto, nas planícies costeiras deste Estado, os solos são formados por sedimentos marinhos e fluviais-lacustres (VILLWOCK; TOMAZELLI, 1995). A salinidade das áreas agrícolas nestas regiões está atribuída principalmente à água de irrigação, proveniente dos rios costeiros e da Laguna dos Patos, sendo esta a principal fonte de irrigação dos arrozais (DENARDIN et al., 2018). A salinização da Laguna dos Patos ocorre frequentemente em janeiro e fevereiro, devido a entrada de água do Oceano Atlântico, e essa época corresponde ao estágio reprodutivo da cultura do arroz (CASTELÃO et al., 2003; SOSBAI, 2018).

O acúmulo de sal no solo prejudica o desenvolvimento do arroz, devido à alta sensibilidade dessa cultura ao estresse (GAO et al., 2007; FRAGA et al., 2010). Solos salinos apresentam grandes quantidades de sais solúveis como sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}), cloreto (Cl^-) e sulfato (SO_4^{2-}) (HUSSAIN et al., 2017). Além disto, podem ser classificados como solos sódicos, solos salinos-sódicos e solos salinos. Os solos sódicos apresentam condutividade elétrica do

extrato de saturação inferior a 4 dS/m, pH entre 8,5 a 10 e porcentagem de sódio trocável (PST) superior a 15%. Os solos salinos-sódicos possuem PST superior a 15%, condutividade elétrica superior a 4 dS m⁻¹ e pH próximo 8,5 (DAKER, 1988). Os solos salinos, de acordo com o laboratório de salinidade do USDA (em inglês, *United States Department of Agriculture*) podem ser definidos como aqueles que possuem condutividade elétrica acima de 4,0 dS/m, medido a temperatura de 25°C, pH abaixo de 8,5 e PST abaixo de 15% (KANAWAPEE et al., 2013). No arroz apenas 3,5 dS/m é suficiente para reduzir 10% do rendimento e 7,2 dS/m, pode causar 50% de perda na produtividade (HOANG et al., 2016; MUNNS; TESTER, 2008).

2.9. O estresse por salinidade

O ambiente de estresse salino desencadeia diversas alterações metabólicas em diferentes vias da planta. O sal pode influenciar negativamente em todos os estádios de desenvolvimento do arroz, sendo esse, portanto, extremamente sensível na germinação e nos estádios iniciais de desenvolvimento (HEENAN et al., 1988; LUTTS et al., 1995). No estágio reprodutivo, o excesso de sal causa esterilidade das espiguetas, o que representa grande ameaça para a produtividade do arroz (KARGBO et al., 2019; YEO; FLOWERS, 1984).

Os efeitos adversos do estresse por sal causam mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas nas plantas, comprometendo o rendimento de grãos e a produção de biomassa. Os efeitos incluem a compactação e dureza dos solos, fazendo com que a planta não consiga estabelecer um sistema radicular eficaz (MACHADO; SERRALHEIRO, 2017); deficiências nutricionais causadas pela menor absorção de nutrientes, incluindo nitrogênio, potássio e cálcio; e toxicidade de íons (Figura 2) (RAZZAQ et al., 2020). O tipo de planta, influenciará na resposta ao estresse, dependendo se esta é sensível à salinidade do solo ou tolerante a elevadas concentrações de sal, definidas como glicófitas e halófitas, respectivamente (TUTEJA et al., 2011) (Figura 4).

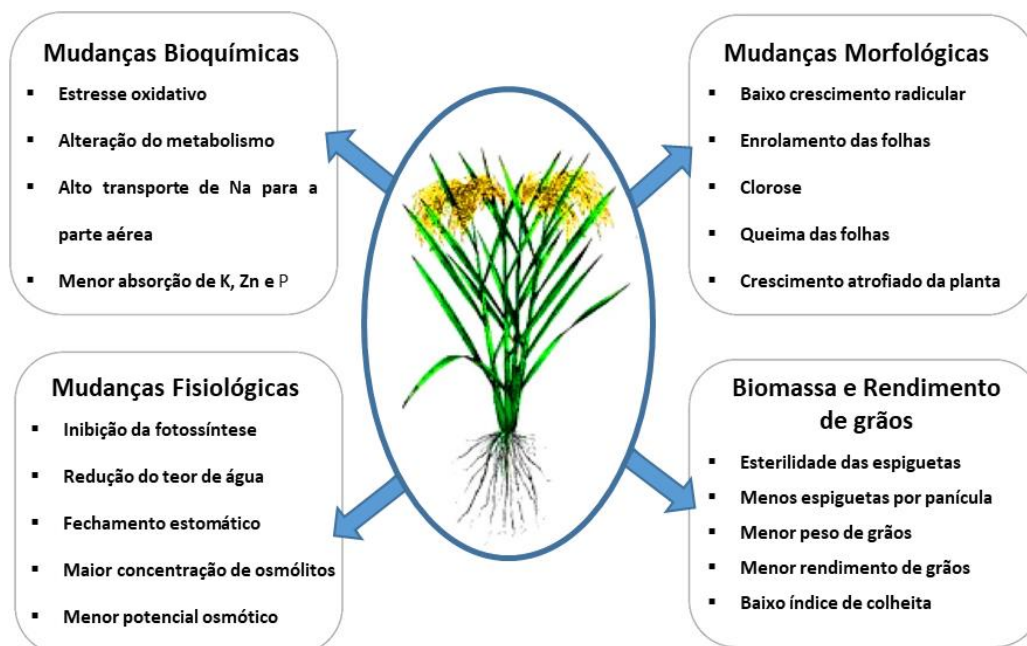


Figura 4. Efeitos adversos do estresse por sal no crescimento da planta.

Fonte: Adaptada de RAZZAQ et al. Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality. In: Journal of Food Science, v. 85, n.1, 2020, p.14-20.

As respostas fisiológicas de uma planta à salinidade são frequentemente complexas e multifacetadas (NEGRÃO; SCHMÖCKEL; TESTER, 2017), e podem ser divididas em duas fases principais. A primeira fase ocorre em minutos ou dias, denominado estresse osmótico. Devido ao excesso de soluto fora das raízes, diminui-se significativamente a capacidade de extração de água do solo, o que afeta o turgor celular, fechamento estomático e inibição da expansão celular, principalmente na parte aérea (MUNNS; PASSIOURA, 1984; MUNNS; TERMAAT, 1986; RAJENDRAN; TESTER; ROY, 2009). A segunda fase acontece durante dias ou até semanas, designada de estresse iônico, causado pelo influxo excessivo de íons sódio (Na^+) na planta, responsáveis por diminuir os processos metabólicos, causando senescência prematura e, por fim, morte celular (MUNNS; TESTER, 2008; ROY et al., 2014). A alta concentração de sal também induz a formação de EROs, e seu acúmulo excessivo resulta em dano oxidativo dos lipídeos da membrana celular, proteínas e ácido nucleico (GILL; TUTEJA, 2010; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2009).

Da mesma forma que existem vários efeitos adversos causados pela salinidade nas plantas, existem mecanismos para as plantas tolerarem esse estresse. Os mecanismos de tolerância a salinidade podem ser classificados em diferentes categorias. A tolerância osmótica é regulada por sinais de longa

distância, acionada antes do acúmulo de Na^+ , reduzindo o crescimento da parte aérea. A exclusão de íons, faz com que o transporte de Na^+ e Cl^- nas raízes reduzam o acúmulo em concentrações tóxicas desses mesmos íons nas folhas. A tolerância do tecido, onde as altas concentrações de sal encontradas nas folhas são compartimentalizadas em nível celular e intracelular (especialmente no vacúolo) e a manutenção de um balanço K^+/Na^+ favorável no citosol (Figura 5) (NEGRÃO; SCHMÖCKEL; TESTER, 2017; ROY et al., 2014; YANG; GUO 2018).

Mesmo mantendo o equilíbrio osmótico e iônico, na condição de estresse salino, a planta também necessita se proteger contra estresses secundários, destacando-se o estresse oxidativo. Devido ao fechamento estomático é possível que ocorra desequilíbrio da fotossíntese, que por sua vez pode ocasionar acúmulo excessivo de energia nos fotossistemas dos cloroplastos e consequentemente a formação de espécies reativas de oxigênio na célula vegetal. Para lidar com estes distúrbios metabólicos, as plantas apresentam um arsenal de defesas, principalmente os pigmentos antioxidantes de baixa massa molecular e enzimas catalisadoras de reações de eliminação de EROs (desintoxicação) (ABDELGAWAD et al., 2016; AHMAD et al., 2019; SILVEIRA et al., 2010; YANG; GUO, 2018).

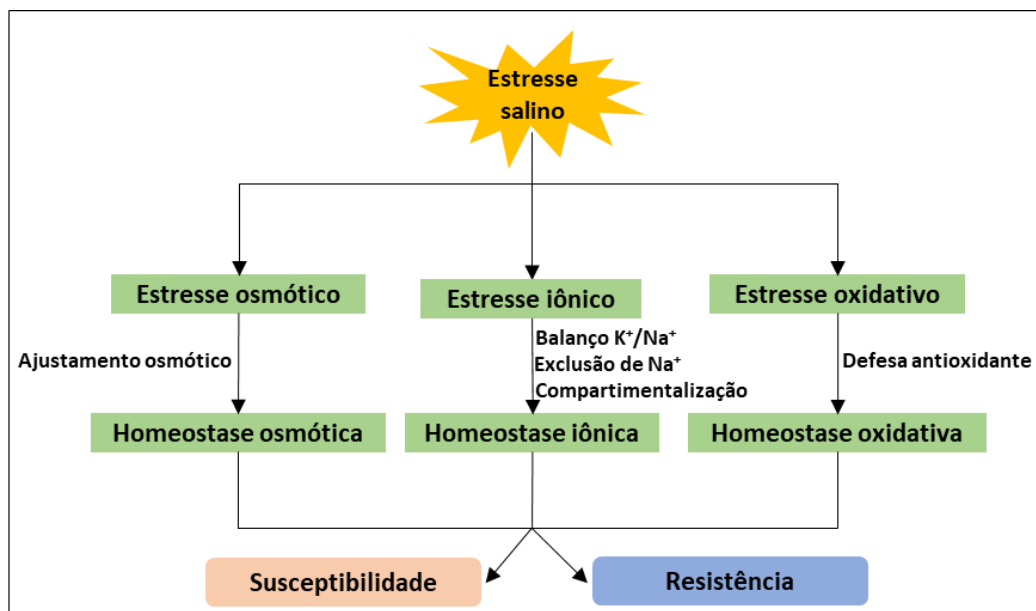


Figura 5. Principais processos envolvidos com a tolerância ao estresse salino.

Fonte: Adaptada de SILVEIRA et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: HEYI, H. R.; DIAS, N. da S.; LACERDA, C. F. de (Ed.). Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados, 2010, p. 167-185.

2.10. Sinalização celular sob estresse salino

Os fitohormônios são moléculas que participam no processo de sinalização das plantas em condições de estresses bióticos e abióticos, como é o caso do estresse salino. Os principais envolvidos na ativação dos mecanismos de defesa das plantas sob este estresse são: citocinina, giberelina, auxina, brassinosteróides, etileno e ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2011). O estresse salino causa forte impacto nos níveis de expressão dos receptores de citocinina (ZALABÁK et al., 2013), reduzindo sua atividade, como também das giberelinas, promotores de crescimento. Além disso, aumenta a atividade de ABA (inibidor de crescimento) nas folhas (ITAI et al., 1968; TAIZ; ZEIGER, 2011). As citocininas causam a abertura estomática sendo que o ABA é responsável por seu fechamento. Esta observação foi relacionada à inibição da fotossíntese, o que leva à redução do crescimento da planta e aumento da senescência foliar daquelas estressadas pelo sal e pela seca (TAIZ; ZEIGER, 2011).

A auxina, fitohormônio fundamental na regulação de processos relacionados ao crescimento das plantas, quando apresenta acúmulo e redistribuição alterados causados pelo estresse, promove hipersensibilidade das plantas à salinidade, consequentemente diminui o crescimento e desenvolvimento dessas (RYU; CHO, 2015). Os brassinosteróides estão envolvidos na resposta das plantas ao estresse salino, desempenhando papel positivo por diminuir a intensidade dos efeitos nocivos da salinidade no potencial produtivo das plantas (FAHAD et al., 2014). Já o etileno, participa como mediador da sinalização de estresses, incluindo receptores de membrana, componentes do citoplasma e FTs. A produção bifásica deste fitohormônio está associada a sensibilidade das plantas ao estresse salino, podendo também estar relacionado a aclimação das plantas à salinidade. Isto, graças a ativação de uma via complexa de sinalização que inclui H_2O_2 e o catabolismo da poliamina (FREITAS, 2015).

Como o estresse salino induz o estresse osmótico nas células vegetais, a sinalização é necessária para restabelecer o equilíbrio osmótico das plantas estressadas (YANG, GUO, 2018). Durante estresse osmótico várias moléculas são sintetizadas, como as proteínas quinases transmembranares (histidina quinase e as quinases associadas a parede celular) (TÜRKAN; DEMIRAL, 2009;

ZHU, 2016). Durante a situação de estresse osmótico, influenciado pela salinidade, em *Arabidopsis thaliana*, observou-se que as células das raízes apresentam perda de turgescência, pois fora da célula o meio está hiperosmótico. Isto induz modificações na membrana plasmática celular, ativando a auto-fosforilação no resíduo da histidina no domínio da proteína receptora histidina quinase da membrana plasmática (AtHK1), caracterizado como sensor (CHINNUSAMY, et al., 2005; PRISCO et al., 2016). Como resultado da auto-fosforilação, o grupo fosfato, por sua vez, é transferido para um resíduo de aspartato, esse, situado no domínio regulador de resposta, atuante na transdução de sinal (PRISCO et al., 2016). Em arroz, proteínas da família MAPKs, descritas como MAP3Ks atuam na regulação positiva e negativa da resposta à meios hiperosmóticos e à salinidade (KIM et al., 2012).

A perda de volume celular pelo excesso de sal nas células das raízes das plantas, favorece a captação de íons pela membrana plasmática. Estes íons funcionam como osmosensores e promovem a despolarização da membrana (HAMILTON et al. 2015). Quando isto ocorre aumenta-se a concentração de cálcio no citoplasma (Ca^{2+}), fazendo com que ocorra a transdução de sinal. A sinalização por canais iônicos também associa-se à expressão de genes que codificam para proteínas membranares (por exemplo aquaporina), com função de regulação osmótica e biossíntese de osmólitos (PRISCO et al., 2016).

A salinidade induz o acúmulo de Na^{2+} no citosol (LECOURIEUX et al., 2006) e acúmulo apoplástico de H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio (MORENO et al., 2013). Devido à sua natureza não carregada, o H_2O_2 pode ser facilmente difundido através das membranas por tipos especiais de aquaporinas, chamados de peroxiporinas (SIES, 2014). Além disto, por ser estável, porém reativo, torna-se um candidato para sinalização ao estresse (SEWELAM et al., 2016). A oxidação quimio-seletiva do resíduo Cys (cisteína) de uma molécula de sinalização por H_2O_2 arbitrará a transdução de sinal intracelular (PAULSEN; CARROLL, 2010).

Além disto, através de estudos, verificou-se que os FTs, de alguma forma, são ativados pelas EROs, que é mediado pelas cascatas MAPK (ASAI et al., 2000). As respostas fornecidas por H_2O_2 são específicas do local, ou seja, quando geradas no cloroplasto, estão envolvidas na ativação dos FTs e dos genes biossintéticos que levam à produção de metabólitos secundários. Quando

produzidos em peroxissomos, sinalizam para a transcrição de genes envolvidos nas respostas de reparo de proteínas (SEWELAM et al., 2014).

A grande maioria dos genes acionados por transdução de sinal do componente osmótico é regulada por ABA, sendo também que essa expressão gênica pode ser regulada por rotas independentes desse fitohormônio (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006; PRISCO et al., 2016). Tanto nas vias de sinalização independentes e dependentes de ABA, os FTs interagem com regiões promotoras dos genes funcionais, o que auxilia na regulação da expressão gênica. Na sinalização ABA dependente, sob salinidade, as principais cascatas de sinalização ocorrem a montante dos FTs zíper de leucina (bZIP), envolvendo receptores associados à família PYRs de proteínas (SHINOZAKI et al., 2015), ligando-se no ERAC ABRE (ERACs responsivos ao ABA) presente na região promotora de genes funcionais (KUMAR et al., 2013) (Figura 6).

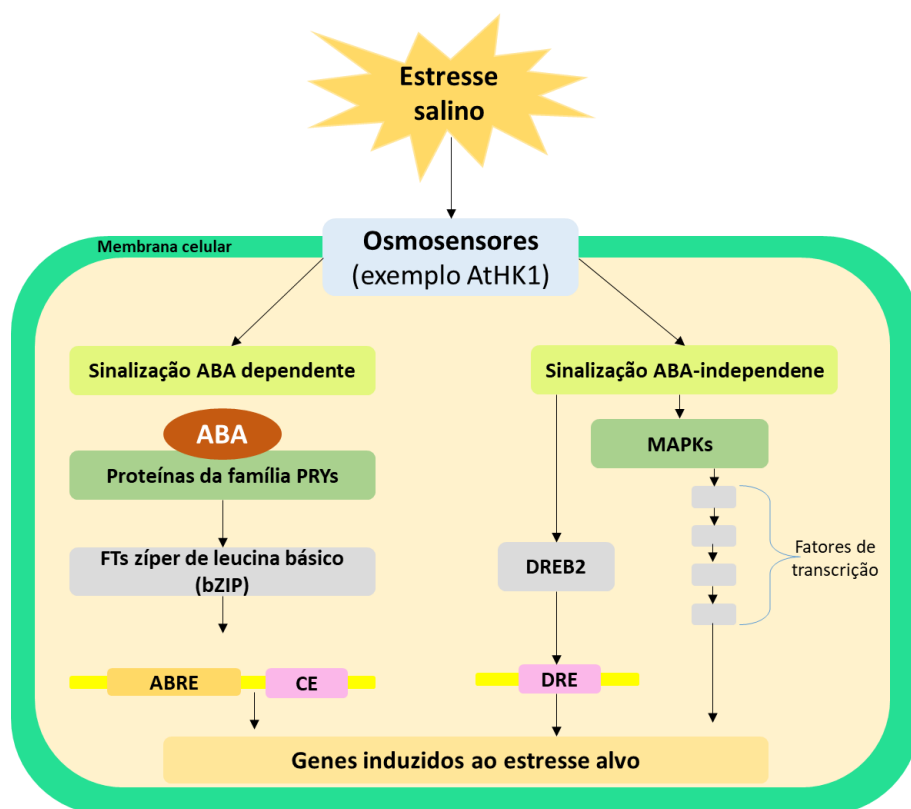


Figura 6. Sinalização ABA dependente e ABA independente.

Fonte: Adaptada de PRISCO et al. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. In: **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**, p.163-180, 2016.

Na via de sinalização independente do ABA, os promotores dos genes apresentam um ERAC diferente, denominado DRE (elemento responsivo à desidratação), que são ligados por fatores de transcrição DREB2 como também a participação da via de sinalização das MAPK (KUMAR et al., 2015; TAIZ; ZEIGER, 2011).

Alguns genes apresentam em seus promotores ambos ERACs ABRE e DRE, levando à intensificação da resposta ao estresse, uma vez que as duas vias estarão envolvidas na transdução do sinal. Neste caso os íons Ca^{2+} participam na interrelação entre as cascatas de sinalização (MAHAJAN; TUJETA, 2005; RYU; CHO, 2015) (Figura 4).

Para manter o equilíbrio iônico celular das plantas sob estresse salino, as proteínas SOS (sensível excessivamente ao sal) são responsáveis por mediar a sinalização celular (JI et al., 2013). Quando ocorre o estresse salino há um acúmulo de sódio tóxico (Na^{2+}) (TESTER; DAVENPORT, 2003). A elevação pronunciada do Na^{+} no citoplasma interrompe as funções enzimáticas, além de ser tóxica para as células e para a planta inteira (JI et al., 2013). O íon Na^{+} é identificado no meio extracelular e intracelular, através do receptor da membrana plasmática, e por proteínas de membrana e enzimas SOS, respectivamente (PRISCO et al., 2016).

A extrusão do íon Na^{2+} é um processo essencial para manter um equilíbrio dinâmico de íons essenciais como K^{+} e Ca^{2+} (JI et al., 2013). Estudos demonstraram que o excesso de Ca^{2+} no citoplasma pode proteger as plantas da toxicidade causada pelo íon Na^{2+} . Isto ocorre pois após a percepção do estresse salino, um pico de Ca^{2+} é gerado no citoplasma das células das raízes, ativando por sua vez, a cascata de transdução de sinal SOS auxiliando na minimização dos danos causados pelo acúmulo excessivo de íons (CHINNUSAMY et al., 2005; GUO et al., 2004; HALFTER et al., 2000; KNIGHT, 1999; ZHU, 2002).

2.11. Mecanismos adaptativos das plantas ao estresse salino

O acúmulo de osmólitos compatíveis nas células vegetais para a regulação osmótica, apresenta-se como uma estratégia primária das plantas para adaptarem-se ao estresse osmótico (YANG, GUO, 2018). Podendo acumular metabólitos carregados como a prolina, glicina betaína, poliois (por exemplo manitol e sorbitol), açúcares, açúcares complexos e íons

(BORIBOONKASET et al., 2013; HENRY et al., 2015; POMMERENIG et al. 2007; SLAMA et al., 2015; YAMADA et al., 2015). Estes osmólitos são de baixo peso molecular e altamente solúveis. Geralmente protegem as plantas através de diferentes rotas durante o estresse, o que inclui o ajuste osmótico celular, desintoxicação (EROs), proteção da integridade da membrana e estabilização de enzimas ou proteínas (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

No ajuste osmótico algumas enzimas desempenham papel fundamental na síntese de osmólitos para minimizar os efeitos causados pela salinidade (CHEN; HIANG, 2011). A prolina é um aminoácido (aa) importante à resistência as plantas ao estresse osmótico, e seu acúmulo celular é geralmente relacionado ao aumento da quantidade de moléculas do ácido L-glutâmico, um dos possíveis precursores da biossíntese desse aminoácido sob condição de estresse (ASHRAF; FOOLAD, 2007; KISHOR et al. 2005).

A glicina betaína também é considerado um importante osmólito para as plantas, cujo efeito primário nas células vegetais é equilibrar o potencial osmótico dos íons intracelulares e extracelulares. Isto porque mantém a água e reduz a toxicidade da salinidade. Possui também a finalidade de funcionar como um soluto compatível estabilizador da estrutura de proteínas, além de proteger dos efeitos adversos do Na^+ as enzimas, estruturas de membrana, aparelhos fotossintéticos, citoplasma e cloroplastos (RAZA et al. 2007).

O fechamento dos estômatos é uma resposta à diminuição do turgor foliar, devido ao déficit de pressão de vapor de água na atmosfera, como também aos sinais químicos gerados pelas raízes quando essas se encontram em situação de estresse por déficit hídrico e por salinidade. Quando fechados, diminui-se o suprimento de CO_2 para a RUBISCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase), predispondo o aparato fotossintético ao aumento de dissipação de energia. Quando em situação de estresse leve, um pequeno declínio na condutância estomática pode ter efeitos protetores, permitindo economizar a água e melhorar a eficiência no uso da água pela planta (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

As EROs são subprodutos comuns das vias metabólicas, como transporte fotossintético, processos de respiração e fotorrespiração (AHMAD et al., 2010). Porém sob estresse salino o suprimento de CO_2 é limitado, causando excesso de redução da cadeia de transporte de elétrons e vasta produção de EROs. A

taxa de geração de EROs supera a taxa de eliminação pelo sistema oxidante (YAN et al., 2013). Em algumas espécies de plantas a produção de antioxidantes é muito rápida, sendo, portanto, essa capacidade associada à tolerância à salinidade (TÜRKAN; DEMIRAL, 2009), por desempenhar importante função na transdução de sinal antes de sua desintoxicação pelos antioxidantes (TANG et al., 2014).

2.12. Fatores de transcrição, Elementos Regulatórios de ação *cis* (ERACs) e Sinalização

Através de modificações nos padrões de expressões gênicas, as células conseguem se adaptar a todo momento sob diferentes condições ambientais. É possível observar que em uma série de células de uma mesma espécie estão contidos os mesmos genes, mas nem todos os genes são ativos no mesmo momento (LAMBERT, 2018). Para que um organismo se desenvolva e sobreviva é necessário que ocorra o controle da expressão de genes (CASTRILLO et al., 2011).

A expressão gênica pode ser descrita como um aglomerado de processos que ocorrem para que seja possível a obtenção dos produtos de seus genes, proteínas e/ou RNAs (MARTINS e FILHO, 2010). O processo de transcrição e seu mecanismo de regulação tem o papel de promover a evolução funcional e morfológica. Esse processo pode ser manipulado através de ferramentas biotecnológicas como a introgressão de genes alvo através da transgenia para explorar características de interesse agrônomo (ZHANG, et al., 2005; HAEUSSLER; JOLY, 2010).

A expressão gênica só é possível devido a presença de proteínas, que são conhecidas como fatores de transcrição (FT) (TAN et al., 2020). E essa regulação ocorre tanto em condições ótimas quanto condições adversas. Algumas análises genômicas e moleculares têm demonstrado que, diversos sistemas de regulação da transcrição agrupando diferentes FTs estão envolvidos na indução de genes que respondem à condições adversas (SHINOZAKI, 2003).

Os FTs possuem funções fundamentais em quase todos os processos biológicos e assume-se que possuem um papel preponderante na evolução das espécies (CASSATI, 2008 apud GÓMEZ-MERINO, TREJO-TÉLLEZ e TIESSEN, 2009). A rede de sinalização, de percepção e de resposta, a alguns estresses

requer a interação entre diversos sensores. Logo após do reconhecimento do estresse pelas células, ocorre uma cascata de sinais que ativam genes envolvidos na resposta. Os FTs regulam a transcrição do gene, assim, uma mudança em suas atividades resulta em mudanças metabólicas e fenotípicas em resposta ao estímulo (VIANA, 2014).

Os FTs (ação *trans*) são proteínas que contém domínios de ligação com potencial para identificar e se ligar a sequências específicas do DNA, denominadas ERACs, geralmente na região promotora de genes (TOLOSA, 2020). Dependendo do tipo de domínio de ligação ao DNA, os FTs foram sendo classificados em várias famílias (ITO et al., 2012).

Sabe-se que um ou mais FTs podem regular a expressão de outros FTs por estarem ligados aos seus ERACs resultando em redes complexas de regulação para padrões de expressão altamente controlados e específicos (PRIYA e JAIN, 2013). Cada gene possui uma determinada combinação de ERACs de forma única, tornando o controle da transcrição temporal e espacial muito específico (VIGHI, 2016). Na grande maioria das vezes, o FT tem na sua estrutura a presença de dois domínios funcionais diferentes que ocorrem na ligação do DNA e na ativação / repressão transcricional. Em conjunto com outros motivos, esses dois participam no processo de transcrição quando a planta é submetida a estímulos endógenos e exógenos (TOLOSA, 2020).

Diferentes FTs têm sido identificados na resposta a estresses ocasionados por baixas temperaturas e salinidade, como DREBs, bZIPs, WRKY, MYB, MYC, entre outros. Inúmeras pesquisas foram conduzidas com esses FTs, gerando grandes avanços no entendimento a resposta ao estresse. No entanto, existe uma família de FTs chamada *Whirly*, para a qual há pouca informação na literatura com relação a participação desses FTs em resposta a estresses por frio e salinidade, evidenciando a necessidade de pesquisas.

2.13. Fatores de transcrição Whirly (Why)

Os FTs da família Whirly, também chamados de Why, ligam-se ao ssDNA (DNA fita simples – do inglês *single strand DNA*) e estão envolvidos no controle da expressão de genes relacionados a defesa (DESVEAUX et al., 2004). Atuam também no processo de proteção do DNA, de transcrição e manutenção dos telômeros, e se associam com nucleóides nos cloroplastos e mitocôndrias

(PRIKRYL et al., 2008). Membros da família Whirly estão relacionados a estresses abióticos e bióticos, como excesso de luz e ataque por patógenos, estão envolvidos no transporte das proteínas do cloroplasto para o núcleo, sendo este processo conhecido como sinalização retrógrada (ZHAO et al., 2017).

Chamada de PBF-2, a primeira proteína a ser caracterizada da família Whirly foi StWHY1 de *Solanum tuberosum*, anteriormente chamada de p24 (DADALTO, 2016), pois através de purificação foi constatado o tamanho de 24 kDa. Posteriormente, realizada a clonagem do seu cDNA, recebeu o nome de StWHY1 (DESVEAUX et al., 2005). Como principal função em batata, o PBF-2 (*PR10a Binding Factor*), regula a expressão do gene *PR10a* (DADALTO, 2016). O transcrito sofre indução após injúria, tratamento com elicitores (como ácido araquidônico e jasmônico) ou durante a infecção pelo patógeno *Phytophthora infestans* (MATTON e BRISSON, 1989). Sabe-se que o StWHY1 tem um maior potencial de se ligar ao promotor após o tratamento com elicitor ácido araquidônico do que com injúria, e não há ligação quando se analisa tubérculos não tratados (DESVEAUX et al., 2004). Os mesmos níveis de RNA de *PR10a* são encontrados quando há menor ligação de DNA após o tratamento com injúria, sugerindo que StWHY1 tem forte controle sobre *PR10a* (MATTON E BRISSON, 1989).

A maioria das plantas expressa duas proteínas Whirly, mas foi relatado que em *Arabidopsis* há três proteínas, sendo que duas estão localizadas no cloroplasto (AtWHY1 e AtWHY3) e uma na mitocôndria (AtWHY2) (DESVEAUX et al., 2004). Em *Solanum tuberosum*, há expressão de proteínas StWHY1 e StWHY2, e foram encontradas em espécies como *Arabidopsis*, arroz, milho, cevada e soja algumas sequências análogas a proteína StWHY1 (DADALTO, 2016). Em estudos realizados por Desveaux et al., (2004) o domínio SSB (*single strand binding*) é o mais conservado, sendo denominado domínio Whirly. Comparando as proteínas Whirly entre batata e *Arabidopsis*, encontra-se uma semelhança entre a proteína StWHY1 com AtWHY1 e AtWHY3, enquanto que a similaridade entre AtWHY2 e StWHY2 é visível. Isso é possível devido a presença de regiões presentes no domínio SSB que são conservadas ou por ocorrência de uma substituição por regiões semelhantes (KRAUSE et al., 2005, CAPPADOCIA et al., 2013).

A proteína StWHY1 apresenta-se de forma tetramérica em extratos de tubérculos tratados e não tratados com elicitores, mas em extratos não tratados a ligação ao DNA só acontece após cromatografia de troca aniônica, indicando que há um efeito negativo para regulação em tubérculos não tratados com elicitores (DESVEAUX et al., 2000). Isso é atribuído a uma possível interação de um regulador negativo com as proteínas Whirly no núcleo de células antes de ser submetidas ao estresse (DESVEAUX et al., 2004). Através da presença de ERAC ERE (*Elicitor Response Element*), contido na região promotora do gene *PR10a*, é que ocorre a atuação de StWHY1 em batatas. Esse processo é mediado por uma proteína C kinase (SUBRAMANIAN et al., 1997). Segundo Desveaux et al., (2002), cada um dos tetrâmeros de Whirly se liga a uma única molécula de DNA fita simples no ERE. Para que a atividade do ERAC ERE aconteça é necessário a presença de um elemento chamado de *PB core* (PBF-2 binding core), sendo este GTCAAAA/T (DESVEAUX et al., 2004).

O tetrâmero do Whirly apresenta simetria C4. Cada um dos protômeros apresenta uma superfície com 4 folhas beta pregueada e três alfa-hélices. Um motivo do tipo hélice-volta-hélice está situado na região C-terminal. Na região C-terminal é onde estão localizados os aminoácidos que fazem contato com outros protômeros. As alfas hélices estão voltadas para o centro do tetrâmero, por isso se torna uma região hidrofílica, com isso as folhas-beta divergem desta região. A região N-terminal, uma região desordenada, vai da ponta da primeira folha beta até o topo das alfa-hélices do centro através da formação da estrutura quaternária, que parece um cata-vento (do inglês, *Whirligig*), por isso dá-se o nome de Whirly para esta família de FTs (DESVEAUX et. al., 2002) (Figura 7).

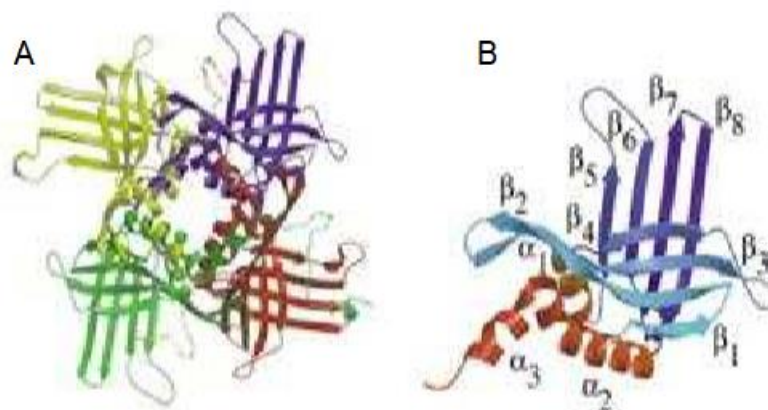


Figura 7. Estruturas da proteína Whirly. A- StWHY1 tetramérica B- monomérica

Fonte: DESVEAUX et al. A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. **Nature Structural Biology Journal**, v.9, p.512-517, 2002.

Através do domínio de ligação ao ssDNA, com sequência de aa KGKAAL e localizado entre os aa 86 e 109, é possível a ligação com o DNA de fita simples. A mudança desta sequência de aa para QGQGGV não altera a forma de tetrâmero, mas inibe a ligação do domínio ao ssDNA. A região N-terminal é contida de 11 glutaminas (Q) consecutivas, e *in vivo* o tetrâmero pode se ligar ao DNA dissociado através dessas glutaminas e então ativar a expressão do gene *PR10a*. Ao ajustar o DNA em 90°, através da simetria de PBF-2, para o protômero adjacente é possível que uma bolha no DNA dissociado apareça (DESVEAUX et al., 2002).

Segundo Cappadocia et al., (2010), as proteínas estão ligadas e podem ter função comum em cada organela, já que a proteína StWHY2 ao se ligar ao DNA não sofre muitas mudanças na sua conformação, pois, ao rotacionar a proteína e a mesma não se alterar, há uma indicação que a ligação ocorre somente ao ssDNA. Também há pouca interação entre sequência específica de StWHY2 e ERE. Além disso, a interação ocorre entre as bases e alguns resíduos hidrofóbicos e envolve sete ligações de hidrogênio e uma de água.

Através de pesquisas em banco de dados do Instituto de Pesquisa Genômica (*Institute for Genomic Research - TIGR*) e do Centro Nacional de Biotecnologia dos EUA (*US National Center for Biotechnology – NCBI*) várias sequências semelhantes de StWHY1 foram identificadas, sendo 23 sequências completas de 15 espécies vegetais de monocotiledôneas, eudicotiledôneas e gimnospermas. Em *arabidopsis* e soja foram encontrados 3 membros da família

Whirly, enquanto que batata, trigo, arroz e milho obtiveram 2 membros Whirly. As proteínas também foram encontradas em algas verdes unicelulares, indicando que a presença das mesmas antecede a separação de algas e plantas terrestres. Alguns alinhamentos de sequências múltiplas de proteínas Whirly demonstraram que uma parte das folhas beta compreende o domínio SSB de StWHY1, sendo a região mais conservada dentro da família, chamada de domínio Whirly (DESVEAUX, MARÉCHAL e BRISSON, 2005).

Em arroz (*Oryza sativa* L.) os FTs Whirly estão presentes através de duas proteínas. A primeira proteína (LOC_Os06g05350) está localizada no cromossomo 6 da espécie e segunda proteína (LOC_Os02g39140) está localizada no cromossomo 2 (MUJAHID, 2013).

Existem resíduos de aa como KGKAAL, YDW, Lys188 que são importantes para a atividade SSB e também são conservados. Isso mostra que a família Whirly possui um mecanismo parecido de atividade SSB. As regiões que constituem os tetrâmeros, as três hélices e a central, também são conservadas, propondo que essas proteínas possuem o tipo de estrutura quaternária *in vivo*. Já as regiões N-terminais e C-terminais são as mais variáveis em sua sequência (DESVEAUX, MARÉCHAL e BRISSON, 2005).

Como já descrito anteriormente, a presença de uma região de poliglutamina na região N-terminal de StWHY1 representa um domínio de transativação (DADALTO, 2016). Regiões ricas em prolina e serina na região N-terminal da família Whirly tem potencial para indicar papéis diferentes para os membros dessa família (TRIEZENBERG, 1995), podendo estar relacionadas a um peptídeo de trânsito sinalizando para o cloroplasto, já que em estudos posteriores identificaram que o StWHY1 se encontra no núcleo. Por isso, têm-se um ponto interessante para compreender a relação entre os dois espaços celulares (DESVEAUX et al., 2002).

Os FTs Whirly são classificados em cinco subfamílias. A primeira subfamília, em eudicotiledôneas, denominada de ESI, possui regiões ricas em serina, prolina e/ou glutamina na região N-terminal. Uma segunda família, também em eudicotiledôneas, denominada ESII, não possui nenhum domínio de transativação. A terceira subfamília ocorre em monocotiledôneas e recebe o nome de MSI, é rica em domínios de prolina, com transativação. A quarta subfamília também ocorre em monocotiledôneas, MSII, caracteriza-se por não

apresentar domínios de transativação. Separadas há mais de 300 milhões de anos das angiospermas, as gimnospermas apresentam a quinta subfamília, denominada GSI. Com isso, consegue-se agrupar as quatro subfamílias em mono e eudicotiledôneas, subdividindo-as quanto a presença ou ausência de transativação putativa (DESVEAUX, MARÉCHAL & BRISSON, 2005).

Estudos evidenciam que as proteínas monoméricas podem adotar conformação terciária parecidas e por isso é possível visualizar, por exemplo, em *arabidopsis*, batata, arroz, soja e trigo membros das subfamílias. Com isso, através da heterotetramerização acredita-se que proteínas Whirly sem domínios de transativação regulem a atividade de alguns membros da família. Outro ponto interessante, é a possível competição entre os homotetrâmeros de Whirly não ativadas e Whirly transativadoras por locais alvos de SSB, acarretando em um possível impedimento da ativação sob determinadas condições (DESVEAUX, MARÉCHAL & BRISSON, 2005).

A variabilidade presente em regiões transativadoras e regiões não ativadoras permitem a diferencial regulação da expressão gênica. Os processos biológicos controlados pela família de FTs Whirly podem aumentar dependendo do conjunto de alvos genômicos e das diferentes formas dos tetrâmeros. Por exemplo, vários domínios podem ser formados em um heterotetrâmero Whirly, podendo ter uma colaboração de outros componentes do complexo de pré-iniciação da transcrição (SAUER et al., 1995).

Em estudos utilizando dados de microarranjos de *arabidopsis*, em busca pelo *PB core* (alvos de ligação de Whirly), em regiões promotoras de genes que estão relacionados com defesa ao ataque de patógenos, Maleck et al., (2000) encontraram um acréscimo de expressão de 3,6 em 11 genes dos 26 que estão associados a SAR (Resistência Sistêmica Adquirida). Os autores sugerem que o elemento *PB core* pode ter relação com a expressão dos genes relacionados a defesa de patógenos. Desveaux et al., (2004) estudaram a atividade de ligação de AtWHY1 ao DNA e qual reação desta proteína com o Ácido salicílico (AS). Os autores obtiveram resultados promissores com o tratamento com AS, demonstrando que esse elemento estimula a ligação da proteína AtWHY1 com o DNA. Além disso, Xiong et al., (2009) observaram que além da proteína AtWHY1, AtWHY3 também apresentou um aumento de expressão de 3 a 4 vezes após tratamento com AS.

Um mutante de arábido, que apresenta a alteração Pro183Ser, denominado de *atwhy1.1*, induziu uma falha no motivo folha-beta, que está próximo ao domínio de ligação ao ssDNA, resultando na falha de ligação com o DNA. Já em outro mutante, que foi chamado de *atwhy1.2*, que apresenta a alteração Gly148Glu, resultou na não formação de tetrâmeros, já que está localizada na porção central da alfa-hélice, e a mesma é importante para que os monômeros interajam (DESVEAUX et al., 2004).

Plantas de milho e arábido com mutações nos genes *AtWHY1* e *AtWHY3* foram submetidas ao tratamento com indutores de DSB (quebras na dupla fita de DNA, do inglês, *double strand breaks*), e verificou-se que as plantas mutantes mostraram maior sensibilidade ao tratamento, apresentando maior rearranjo no ptDNA (DNA plastidial) causados por vias não conservativas de reparo, chamada de MMBIR (*microhomology-mediated break induced replication*), do que plantas do tipo selvagem. A ausência da proteína mitocondrial WHY2 em arábido também resulta no aumento de rearranjos no DNA após a indução de DSB (MARÉCHAL et al., 2009, CAPPADOCIA et al., 2010). Resultados obtidos com trabalho *in vitro* demonstram que WHY2 em contato com dsDNA tem poder de deslocar o equilíbrio para formar ssDNA, sendo importante para o reparo de DSB, pois em um momento as bases de uma das fitas são retiradas por exonucleases e o DNA fica como ssDNA, porém ligado a WHY2. Estudos revelam que WHY2 também está atuando na proteção do DNA da degradação por nucleases (CAPPADOCIA et al., 2010).

Têm sido demonstrado que a função mitocondrial é comprometida quando ocorre a superexpressão de *AtWHY2*, pois o mesmo está relacionado com a redução da expressão de genes presentes no mtDNA (DNA mitocondrial), acarretando mudanças no fenótipo, apresentando crescimento reduzido e também senescência foliar. Acredita-se que a ligação entre o mtDNA e *AtWHY2* seja não específica, mas de forma aleatória em todo o mtDNA, sendo que essa associação é conservada em arábido e milho (MARÉCHAL et al., 2008).

A superexpressão do gene *SlWHY2* (*Solanum lycopersicum*) em tabaco demonstrou maior tolerância ao estresse por déficit hídrico. O resultado foi observado através da quantificação do indicador malondialdeído, do maior conteúdo relativo de água e das atividades de superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, além da maior expressão dos genes *citocromo oxidase 1* (*NtCOX1*)

e *NtORF1* em linhagens transgênicas submetidas ao déficit hídrico. Os autores sugerem que a superexpressão de *SIWHY2* aumenta a tolerância ao estresse por déficit hídrico e também regula a transcrição de genes mitocondriais, e estabiliza a função das mitocôndrias. As linhagens transgênicas que também se mostraram mais tolerantes ao déficit hídrico, se mostraram mais resistentes a *Pseudomonas solanacearum*, por apresentar menor conteúdo de EROs e uma expressão maior de genes relacionados à defesa. Com isso, os estudos propõem que *SIWHY2* apresenta função regulatória positiva com relação a estresses bióticos e abióticos (ZHAO et al., 2018).

No ptDNA, a maior parte dos genes presentes codificam para proteínas que estão relacionadas a fotossíntese (GREEN, 2001 apud DADALTO, 2016). Através de danos no ptDNA ocorre a perda de eficiência na cadeia transportadora de elétrons e consequentemente o aumento de EROs. Portanto, é imprescindível que o ptDNA seja mantido íntegro para o pleno funcionamento da célula (LEPAGE et al., 2013). O dano ocorrido no ptDNA conhecido como DSBs pode acarretar mal pareamento na fita devido a colapsos que ocorrem na forquilha de replicação (PARENT et al., 2011). Nos cloroplastos há uma DNA polimerase do tipo I, a PolIB, que tem como principal função reparar o ptDNA. Os FTs Whirly que, por se ligarem na fita simples do ptDNA, atuam estabilizando-o e assim reduzindo pareamentos incorretos (MARÉCHAL et al., 2009).

Em cevada, os FTs Whirly são encontrados no núcleo e nos cloroplastos (GRABOWSKI et al., 2008). As proteínas WHY1 em plastídios de cevada (HvWHY1), têm o potencial de compactar o DNA em subpopulações de nucleóides e essa compactação interfere na expressão do ptDNA. Isso é notado em plantas que não expressavam o gene e que tiveram os níveis de expressão aumentados (KRUPINSKA et al., 2014). Os nucleóides, fração transcricionalmente ativa no ptDNA, estão relacionados à membrana tilacóide. Isso se confirma através de estudos proteômicos em cloroplastos de arabidopsis, onde foi detectado a presença de AtWHY1 na fração transcricionalmente ativa (GRABOWSKI et al., 2008).

No RNA plastidial de cevada, as proteínas Whirly tem o poder de interagirem com a região de introns, podendo estar relacionadas com processos de *splicing* (MELONEK et al., 2010). Em milho, as proteínas Whirly também se associam com RNA e DNA plastidiais *in vitro* e *in vivo* (PRIKRYL et al., 2008).

Em algumas frações ligadas a telômeros foram encontradas proteínas AtWHY1 e quando estas proteínas estão ausentes, formam-se mutantes que possuem telômeros maiores, o que faz os pesquisadores acreditarem que Whirly 1 está relacionado a inibição de telomerase (YOO et al., 2007). Por AtWHY1 possuir dupla localização, têm-se um candidato para sinalização retrógrada entre plastídeos e núcleo (DADALTO, 2016).

Estudos mostram que quando estão no núcleo, os FTs Whirly modulam a transcrição de alguns genes cujas proteínas são relacionadas a estresses, como *AtPK1* (XIONG et al., 2009), *PR1* e *PR2* (ISEMER et al., 2011), *WRKY53* (MIAO et al., 2013). Segundo Janack, et al., (2016), o silenciamento de *HvWHY1* acarreta modificações em histonas e também em níveis transcricionais de FTs da família WRKY, contribuindo também para tolerância ao déficit hídrico.

Existem vários estudos sobre como ocorre a ligação de FTs Whirly ao DNA, e uma possibilidade é através do conhecimento sobre as proteínas e ERACs que a mesma se liga. Por exemplo, os FTs WRKY e bZIP se ligam aos ERACs associados ao elemento *PB core* em dsDNA (*double stranded DNA*), enquanto que a família Whirly se liga ao ssDNA. O que pode acontecer é que em condições normais algumas dessas proteínas ligadas ao dsDNA impedem a ligação de proteínas Whirly na região promotora e vice-versa (DESVEAUX et. al., 2004).

Estudos em soja sobre os FTs Whirly revelaram que a família é muito maior e mais complexa comparada com *Arabidopsis*. Foram encontradas 18 sequências proteicas completas em sete locos. A expressão gênica foi diferente para raízes, caules, cotilédones, folhas primárias e folhas trifoliadas. O gene mais expresso em soja recebeu o nome de *GmWHY1A*. As plantas, ao serem expostas a estresses abióticos (baixas temperaturas) e bióticos (fungo *Phakopsora pachyrhizi*), apresentaram redução dos transcritos de *GmWHY1A*. Já para o tratamento com ácido salicílico ou ácido jasmônico, induziram a transcrição de *GmWHY1A*, ao contrário do etileno, que reduziu o acúmulo de transcritos desse gene. Sob condição de estresse abiótico, *GmWHY1A* teve sua expressão suprimida, porém os autores não sabem se a supressão está ligada a exposição ao estresse ou se é uma expressão reduzida de toda a célula. Com isso, têm-se que a resposta de *GmWHY1A* em soja apresenta regulação diferente em resposta a fitohormônios e estresses ambientais (DADALTO, 2016).

Os FTs Whirly podem estar envolvidos em vários processos, e apresentam variadas funções, dependendo da organela em que estão presentes. É visível, mesmo que com estudos ainda inconclusivos, que essas proteínas estão relacionadas a respostas a estresses bióticos e abióticos. Após a elucidação da função da família Whirly e as vias utilizadas para sua expressão, será possível a manipulação genética, como processos de transgenia (DADALTO, 2016) e edição de genomas, com o objetivo de obtenção de novas cultivares tolerantes a estresses bióticos e abióticos.

Referências Bibliográficas

- ABDELGAWAD, H.; ZINTA, G.; HEGAB, M. M.; PANDEY, R.; ASARD, H.; ABUELSOUD, W. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. **Frontiers in Plant Science**, n.7, p.1-11, 2016.
- ACHARD, P.; GONG, F.; CHEMINANT, S.; ALIOUA, M.; HEDDEN, P.; GENSHIK, P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. **Plant Cell**, v.20, p.2117-2129, 2008.
- AHMAD, P.; JALEEL, C. A.; SALEM, M. A.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews Biotechnology**, v.30, n.3, p.161-75, 2010.
- AHMAD, R.; HUSSAIN, S.; ANJUM, M. A.; KHALID, M. F.; SAQIB, M.; ZAKIR, I.; HASSAN, A.; FAHAD, S.; AHMAD, S. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanisms in Plants Under Salt Stress. In: HASANUZZAMAN, M.; HAKEEM, K.; NAHAR, K.; ALHARBY, H. (Eds.). **Plant Abiotic Stress Tolerance**, Springer, Cham, 2019, p. 191-205.
- ALMADANIM, M. C.; ALEXANDRE, B. M.; ROSA, M. T. G.; SAPETA, H.; LEITÃO, A. E.; RAMALHO, J. C.; LAM, T. T.; NEGRÃO, S.; ABREU, I. A.; OLIVEIRA, M. M. Rice calcium-dependent protein kinase OsCPK17 targets plasma membrane intrinsic protein and sucrose-phosphate synthase and is required for a proper cold stress response. **Plant, Cell & Environment**, v.40, p.1197-1213, 2017.
- ALMADANIM, M. C.; GONÇALVES, N. M.; ROSA, M. T. G.; ALEXANDRE, B. M.; CORDEIRO, A. M.; RODRIGUES, M.; SAIBO, N. J. M.; SOARES, C. M.; ROMÃO, C. V.; OLIVEIRA, M. M.; ABREU, I. A. The rice cold-responsive calcium-dependent protein kinase OsCPK17 is regulated by alternative splicing and post-translational modifications. **Molecular Cell Research**, v.1865, n.2, p.231-246, 2018.
- ANDAYA, V. C.; MACKILL, D. J. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica* x *indica* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v.116, p.1084-1090, 2003.

- ARSHAD, M. S.; FAROOQ, M.; ASCH, H. F.; KRISHNA, J. S. V.; PRASAD, P. V. V.; SIDDIQUE, K. H. M. Thermal stress impacts reproductive development and grain yield in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.115, p.57-72, 2017.
- ARUNIN, S.; PONGWICHIAN, P. Salt-affected soils and management in Thailand. **Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan**. v.39, p.319-325, 2015.
- ASAI, T.; STONE, J. M.; HEARD, J. E.; KOVTUN, Y.; YORGEY, P.; SHEEN, J.; AUSUBEL, F. M. Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate, ethylene, and salicylate-dependent signalling pathways. **Plant Cell**, v.12, p.1823-1836, 2000.
- ASHRAF, M. A.; AKBAR, A.; ASKARI, S. H.; IQBAL, M.; RASHEED, R.; HUSSAIN, I. Recent advances in abiotic stress tolerance of plants through chemical priming: a overview. In: RAKSHIT A., SINGH H. (Eds.). **Advances in Seed Priming**. Springer, Singapore, 2018, p.51-79.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, n.2, p.206-216, 2007.
- BACERRA, V.; PAREDES, M.; FERREIRA, M. E.; GUTIÉRREZ, E.; DÍAS, L. M. Assessment of the genetix diversity and population structure in temperate japônica rice germoplasm used in breeding in Chile, with SSR markers. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.77, n.1, p.15-26, 2017.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.
- BORIBOONKASET, T.; THEERAWITAYA, C.; YAMADA, N.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K.; CHA-UM, S.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. **Protoplasma**, v.250 p.1157-1167, 2013.
- BOSETTI, F.; MONTEBELLI, C.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; CHAMMA, H. P.; PINHEIRO, J. B. Genetic variation of germination cold tolerance in japanese rice germoplasm. **Breed Science**, v.62, n.3, p.209-215, 2012.
- CAPPADOCIA, L.; MARÉCHAL, A.; PARENT, J. S.; LEPAGE, E.; SYGUSCH, J.; BRISSON, N. Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in Arabidopsis Organelle Genome Repair. **The Plant Cell**, v.22, p.1849-1867. 2010.
- CAPPADOCIA, L.; PARENT, J. B.; SYGUSCH, J.; BRISSON, N. A Family portrait: structural comparasion of the Whirly proteins from Arabidopsis thaliana and *Solanum tuberosum*. **Acta Crystal**, v.69, p.1207-1211, 2013.
- CARILLO, P.; ANNUNZIATA, PONTECORVO, G.; FUGGI, A.; WOODROW, P. Salinity stress and salt tolerance. In: SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. (Eds.). **Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations**. InTech, Croatia, 2011, p.22-38.
- CASTELÃO, R.M., MÖLLER, J.R., O. O. Sobre a circulação tridimensional forçada por ventos na Lagoa dos Patos. **Atlântica** v.25, n.2, p.91-106, 2003.

- CASTRILLO G.; TURCK F.; LEVEUGLE M.; LECHARNY A.; CARBONERO P.; COUPLAND G.; PAZ-ARES J.; OÑATE-SÁNCHEZ L.; Speeding Cis-Trans 35 Regulation Discovery by Phylogenomic Analyses Coupled with Screenings of an Arrayed Library of Arabidopsis Transcription Factors. **Plos one**, v.6, n.6, 2011.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, n.4, p.551-560, 2009.
- CHEN, H.; HIANG, J. G. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. **Environmental Reviews**, v.8, p.309-319, 2010.
- CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. **Crop Science**, v.45, n.2, p. 437-448, 2005.
- CLERMONT-DAUPHIN, C.; SUWANNANG, N.; GRÜNBERGER, O.; HAMMECKER, C.; MAEGHT, J. L. Yield of rice under water and soil salinity risks in farmers' fields in northeast Thailand. **Field Crops Research**, v.118, p.289-296, 2010.
- COLLINS, N. C.; TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? **Plant Physiology**, v.147, p.469-486, 2008.
- CONAB -Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de arroz**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-dasafra-de-graos>. Acessado em: 22 de maio de 2019.
- COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL A. J. A uniform, objectives, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, n.40, p.436-443, 2000.
- CRAMER, G. R. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.16, n.1, p.23-28, 2010.
- CRUZ, R. P. da; MILACH, S. C. K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 909-917, 2000.
- CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C. Rice cold tolerance at the reproductive stage in a controlled environment. **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p.255-261, 2006.
- CRUZ, R. P.; SPEROTTO, R. A.; CARGNELUTTI, D.; ADAMSKI, J. M.; TERRA, T. F.; FETT, J. P. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. **Food and Energy Security**, v.2, n.2, p.96-119, 2013.
- DADALTO, S. P. **Estudo da família de fatores de transcrição Whirly em soja**. 2016. 54 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2016.
- DAKER, A. **A água na agricultura**; manual de hidráulica agrícola. 7.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1988. 543p.
- DATTA, S. K. **Principles and practices of rice production**. New York: John Wiley & Sons, 1981, 618p.

DENARDIN, L. G. O.; CARMONA, F. C.; TIECHER, T.; MARTINS, A. P.; ALVEZ, L. A.; WEBER, E. J.; ANGHINONI, I. Salt-affected soils of the costal plains in Rio Grande do Sul. **Gerdoma Regional**, v.18, p.e00186, 2018.

DESVEAUX, D.; ALLARD, J.; BRISSON, N. SYGUSCH, J.; A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. **Nature Structural Biology Journal**, v.9, p.512-517, 2002.

DESVEAUX, D.; SUBRAMANIAM, R.; DESPRÉS, C.; MESS, J.; LEVESQUE, C.; FOBERT, P. R.; DANGI, J. L.; BRISSON, N.; A “Whirly” transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. **Cell Press Journal**, v.6, p.229-240, 2004.

DESVEAUX, D.; DESPRÉS, C. JOYEUX, A.; SUBRAMANIAM, R.; BRISSON, N.; PRF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR10 α gene activation in potato. **The Plant Cell**, v.12, p.1477-1498, 2000.

DESVEAUX, D.; MARÉCHAL, A.; BRISSON, N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. **Trends Plant Science**. v.10, p.95-102, 2005.

DEVRIES, A.L.; KOMATSU, S.K.; FEENEY, R.E. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.245, p.2901-2908, 1970.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiololigal Reviews**, v.82, n.1, p.47-95, 2002.

FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; MATLOOB, A.; KHAN, F. A.; KHALIQ, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; KHAN, F.; ULLAB, N.; FAIQ, M.; KHAN, M. R.; TAREEN, A. K.; KHAN, A.; ULLAH, A.; ULLAH, N.; HUANG. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation**, v.75, n.2, p.391-404, 2014.

FAO: **High Level Expert Forum-How to Feed the World in 2050**. Rome, Italy: Economic and Social Development, Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2009.

FAO-ITPS-GSP: **Status of the world's soil resources**. FAO-ITPS-GSP Main Report, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2015, p. 125-127.

FERNANDO, V. C. D. Cross talk between cold stress response signaling pathway and other stress response pathways. In: WANI, S. H.; HERATH, V. (Ed.). **Cold Tolerance in Plants**. Cham: Springer, 2018, p. 103-109.

FORTUNATO, A. S.; LIDON, F. C.; BATISTA-SANTOS, P.; LEITÃO, A. E.; PAIS, I. P.; RIBEIRO, A. I.; RAMALHO, J. C. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of Coffea sp. Under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.167, n.5, p.333-342, 2010.

FRAGA, T. I.; CARMONA, F. D. C.; ANGHINONI, I.; GENRO JUNIOR, S. A.; MARCOLIN, E. Flooded rice yield as affected by levels of water salinity in different stages of its cycle. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.3, n.1, p.163-173, 2010.

FREITAS, V. S. **Metabolismo das poliaminas e do etileno e indução do sistema de defesa antioxidativa em genótipos de milho com tolerância diferencial ao estresse salino**. 2015. 137p. Tese Doutorado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

GAO, J.P.; CHAO, D.Y.; LIN, H.X.; Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. **Journal Integrative Plant Biology**, v.49, n.6, p.742-750, 2007.

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

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

GOFF, S.A. Rice as a model for cereal genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p. 86-89, 1999.

GÓMEZ-MERINO, F.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; TIESSEN, A. Factores de transcripción. In: TIESSEN, A. **Fundamentos y metodologías innovadoras para el mejoramiento genético de maíz**. 1. ed. Editorial Fundación Ciencia Activa, 2009.

GRABOWSKI, E.; MIAO, Y.; MULISCH, M.; KRUPINKA, K. Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. **Plant Physiology**, v.147, p.1800-1804, 2008.

GUO, Y. P.; ZHOU, H. F.; ZHANG, L. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. **Scientia Horticulturae**, v.108, n.3, p.260-267, 2006.

GUO, Y.; QIU, Q.S.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; OHTA, M.; ZHANG, C.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.K. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v.16, n.2, p.435-449, 2004.

GUPTA, R.; DESWAL, R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. **Journal of Biosciences**, v.39, n.5, p.931-944, 2014.

HAEUSSLER, M.; JOLY, J. J. When needles look like hay: How to find tissue-specific enhancers in model organism genomes. **Developmental Biology**, v.350, p.239-254, 2010.

HALFTER, U.; ISHITANI, M.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.7, p.3735-3740, 2000.

HAMILTON, E. S.; JENSEN, G. S.; MAKSAEV, G.; KATIMS, A.; SHERP, A. M.; HASWELL, E. S. Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. **Science**, v.350, p.438-441, 2015.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; TEIXEIRA, S. J. A.; FUJITA, M. Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defenses is a key factors. In: BANDI, V.; SHANKER, A. K.; SHANKER, C.; MANDAPAKA, M. (eds).

Crop Stress and its management: Perspectives and Strategies. Springer, Berlin, 2012, p.261-316.

HEENAN, D. P.; LEWIN, L. G.; MCCAFFERY, D. W. Salinity tolerance in rice varieties at different growth stages. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.28, p.343-349, 1988.

HEIDARVAND, L.; AMIRI, M. What happens in plant molecular responses to cold stress? **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.3, p.419-431, 2010.

HEINRICH, M.; HETTENHAUSEN, C.; LANGE, T.; WÜNSCHE, H.; FANG, J.; BALDWIN, I. T.; WU, J. High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. **The Plant Journal**, v.73, p.591-606, 2013.

HEMAMALINI, G. S.; SHASHIDHAR, H. E.; HITTALMANI, S. Molecular marker assisted tagging of morphological and physiological traits under two contrasting moisture regimes at peak vegetative stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v.112, p.69-78, 2000.

HENRY, C.; BLEDSOE, S.W.; GRIFFITHS, C.A.; KOLLMAN, A.; PAUL, M.J.; SAKR, S.; LAGRIMINI, L.M. Differential role for trehalose metabolism in salt-stressed maize. **Plant Physiology**, v.169, n.2, p.1072-1089, 2015.

HOANG, T. M. L.; TRAN, T. N.; NGUYEN, T. K. T.; WILLIAMS, B.; WURM, P.; BELLAIRS, S.; MUNDREE, S. Improvement of salinity stress tolerance in rice: challenges and opportunities. **Agronomy**, v.6, n.4, p.1-23, 2016.

HOANG, T.M.L.; TRAN, T.N.; NGUYEN, T.K.T.; WILLIAMS, B.; WURM, P.; BELLAIRS, S.; MUNDREE, S. Improvement of salinity stress tolerance in rice: Challenges and opportunities. **Agronomy**, v.6, n.4, p.54, 2016.

HONG, Y.; ZHANG, H.; HUANG, L.; LI, D.; SONG, F. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.4, p.1-19, 2016.

HOSSAIN, S. Present scenario of global salt affected soils, its management and importance of salinity research. **International Research Journal of Biological Sciences**, v.1, n.1, p.1-3, 2019.

HUSSAIN, S.; ZHANG, J. H.; ZHONG, C.; ZHU, L. F.; CAO, X. C.; YU, S. M.; JAMES, A. B.; HU, J. J.; JIN, Q. Y. Effects of salt stress on rice growth, development characteristics, and the regulating ways: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 11, p. 2357-2374, 2017.

IRGSP - International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p.793-800, 2005.

ISEMER, R.; MULISCH, M.; SCHAFER, A.; KIRCHNER, S.; KOOP, H. U.; KRUPINSKA, K. Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. **FEBS Letters**, v.586, p.85-88, 2011.

ITAI, C.; RICHMOND, A.; VAADIA, Y. The role of root cytokinins during water and salinity stress. **Israel Journal of Botany**, v.17, p.187-193, 1968.

ITO, T. M.; RAMPIM, M. C.; POLIDO, P. B.; SOUZA, S. G. H. de. Fatores de transcrição da família AP2/ERF e resposta em plantas aos estresses abióticos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 207-214, 2012.

IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends Plant Science**, v.1, p.95-99, 1996.

JACKSON, S. A. Rice: The First Crop Genome. **Rice**, v.9, n.14, p.1-3, 2016.

JAGOE, R.B. Hybridization of selected strain of padi. **The Malayan Agricultural Journal**, v.19, p.530-534, 1931.

JANACK, B.; SOSOI, P.; KRUPINKA, K.; HUMBERT, K. *Knockdown* of WHIRLY1 affects drought stress-induced leaf senescence and histone modifications of the senescence-associated gene HVS40. **Plants (Basel)**, v.5, n.3, p.37, 2016.

JANSKÁ, A.; MARŠÍK, P.; ZELENKOVÁ, S.; & OVESNÁ, J. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment?. **Plant Biology**, v.12, n.3, p.395-405, 2010.

JI, H.; PARDO J.M.; BATELLI, G.; OOSTEN, M.J.V.; BRESSAN, R.A.; LI, X. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. **Molecular Plants**, v.6, n.2, p.275-286, 2013.

KANAWAPEE, N.; SANITCHON, J.; SRIHABAN, P.; THEERAKULPISUT, P. Physiological changes during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salt tolerance under saline field condition. **Plant Soil**, v.370, n.1-2, p.89-101, 2013.

KARGBO, S. S.; SHOWEMIMO, F. A.; PORBENI, J. B. O.; AKINTOKUN, P. O. Response of rice genotypes to salinity under hydroponic conditions. **Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension**, v.18, n.3, p.11-18, 2019.

KASHYAP, P.; DESWAL, R. Phytohormones Regulating the Master Regulators of CBF Dependent Cold Stress Signaling Pathway. In: RAJPAL, V. R.; SEHGAL, D.; KUMAR, A.; RAINA, S. N. (eds) **Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches**, Springer, India, 2019, p. 249-264.

KHEDIA, J.; AGARWAL, P.; AGARWAL, P. K. Deciphering hydrogen peroxide-induced signalling towards stress tolerance in plants. **3 Biotech**, v.9, n.11, p.1-13, 2019.

KIM, J.; WOO, D.; KIM, S.; LEE, S.; PARK, H.; SEOK, H. Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. **Plant Cell Reports**, v.31, p.217-224, 2012.

KISHOR, P.B.K.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N.; LAXMI, P.S.; NAIDU, K.R.; RAO, K.R.S.S.; RAO, S.; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v.88, p.424-438, 2005.

KNIGHT, C.A.; DUMAN, J.G. Inhibition of the recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. **Cryobiology**, v.23, p.256-262, 1986.

KNIGHT, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. **International Review of Cytology**, v.195, p.269-324, 1999.

KOIKE, S.; YAMAGUCHI, T.; OHMORI, S.; HAYASHI, T.; YATOU, O.; YOSHIDA, H. Cleistogamy Decreases the Effect of High Temperature Stress at Flowering in Rice. **Plant Production Science**, v.18, n.2, p.111-117, 2015.

KOSEKI, M.; KITAZAWA, N.; YONEBAYASHI, S.; MAEHARA, Y.; WANG, Z.X.; MINOBE, Y. Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage. **Molecular Genetics and Genomics**, v.284, p.45–54, 2010.

KOSOVÁ, K.; PRÁŠIL, I. T.; VÍTÁMOVÁS, P. Role of dehydrins in plant stress response. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of Plant and Crop Stress**, New York, CRC Press, 2010, p.239-285.

KRAUSE, K.; KILBIENSKI, I.; MULISCH, M.; RODIGER, A.; SCHAFER, A.; KRUPINSKA, K. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. **FEBS Letters**, v.579, p.3707-3712, 2005.

KROMDIJK, J.; LONG, P. S. One crop breeding cycle from starvation? How engineering crop photosynthesis for rising CO₂ and temperature could be one important route to alleviation. **Proceedings of the Royal Society B**, v.283, n.1826, p.1-8, 2016.

KRUPINSKA, K.; OETKE, S.; DESEL, C.; MULISCH, M.; SCHAFER, A.; HOLLMANN, J.; KUMLEHN, J.; HENSEL, G.; WHIRLY1 is a major organizer of chloroplast nucleoids. **Frontiers in Plant Science**, v.5, n.432, p.1-11, 2014.

KUMAR, K.; KUMAR, M.; KIM, S. R.; RYU, H.; CHO, Y. G. Insights into genomics of salt stress response in rice. **Rice**, v. 6, n. 27, p. 1-15, 2013.

KUMAR, V.; SINGH, A.; MITHRA, S.V.A.; KRISHNAMURTHY, S.L.; PARIDA, S. K.; JAIN, S.; TIWARI, K. K.; KUMAR, P.; RAO, A. R.; SHARMA, S. K.; KHURANA, J. P.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). **DNA Research**, v. 22, n.2, p.133-145, 2015.

LAMBERT, S. A.; JOLMA, A.; CAMPITELLI, L. F.; PRATYUSH, K. das.; YIN, Y.; ALBU, M.; CHEN, X.; TAIPALE, J.; HUGHES, T. R.; WEIRAUCH, M. T. The human transcription factors. **Cell**, v. 172, n.4, 2018.

LECOURIEUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. **New Phytologist**, v.171, p.249-269, 2006.

LEE, B.H.; LEE, H.; XIONG, L.; ZHU, J.K. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. **The Plant Cell**, v.14, p.1235-1251, 2002.

LEI, D.; TAN, L.; LUI, F.; CHEN, L.; SUN, C. Identification of heat-sensitive QTL derived from common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). **Plant Science**, v.201-202, p.121-127, 2013.

LEPAGE, E.; ZAMPINI, E.; BRISSON, N. Plastid genome instability leads to reactive oxygen species production and plastid-to-nucleus retrograde signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.163, p.867-881, 2013.

LIU, T.; DU, Q.; LI, S.; YANG, J.; LI, X.; XU, J.; CHEN, P.; LI, J.; HU, X. GSTU43 gene involved in ALA-regulated redox homeostasis, to maintain coordinated chlorophyll synthesis of tomato at low temperature. **BMC Plant Biology**, v.19, p.323, 2019.

- LIU, T.; YE, X.; LI, M.; LI, J.; QI, H.; HU, X. H₂O₂ and NO are involved in trehalose-regulated oxidative stress tolerance in cold-stressed tomato plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.171, p.103961, 2020.
- LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.12, p.1843-1852, 1995.
- MACHADO, R. M. A.; SERRALHEIRO, R. P. Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. **Horticulturae**, v.3, n.30, 2017.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, n.2, p.139-158, 2005.
- MAHMOOD-UR-RAHMAN; MUNAZZA, I.; SHANZAY, Q., SHAZIA, A. B.; KAUSAR M. Abiotic stress signaling in rice crop. In: HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; NAHAR, K.; BISWAS, J. K. (eds.) **Advances in rice research for abiotic stress tolerance**. Springer, India, 2019, p.551-569.
- 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.; OLIVEIRA, A. C.; SILVEIRA, C. F.; BRAGA, E. J.B.; FONSECA, G. M.; BENITEZ, L. C.; MAIA, L. C.; LUZ, V. K. Ácido abscísico e o estresse abiótico. (**Documento 307/** Embrapa Clima Temperado) Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010, 30 p.
- MAIA, L. C.; CADORE, P. R. B.; BENITEZ, L. C.; DANIELOWSKI, R.; BRAGA, E. J. B.; FAGUNDES, P. R. R.; MAGALHÃES, A. M.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Transcriptome profiling of rice seedlings under cold stress. **Functional Plant Biology**, v.44, n.4, p.1-11, 2017.
- MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K. A.; DANGL, J. L.; DIETRICH, R.A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, v.26, n.4, p.403-10, 2000.
- MALEKI, M.; GHORBANPOUR, M. Cold tolerance in plants: molecular machinery deciphered. In: **Biochemical, physiological and molecular avenues for combating abiotic stress tolerance in plants**. Elsevier Science & Technology, San Diego, 2018, p 57–71.
- MALEKI, M.; GHORBANPOUR, M.; KARIMAN, K. Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. **Plant Gene**, v.11, p. 247-254, 2017.
- MARÉCHAL, A.; PARENT, J. S.; LAFORTUNE, F. V.; JOYEUX, A.; LANG, B. F.; BRISSON, N. Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.106, p.14693-14698, 2009.
- MARÉCHAL, A.; PARENT, J. S.; SABAR, M.; LAFORTUNE, F. V.; RACHED, C. A.; BRISSON, N. Overexpression of mtDNA-associated AtWHY2 compromises mitochondrial function. **BMC Plant Biology**, v.8, n.42, 2008.

MARTINI, L. F. D.; BURGIS, N. R.; NOLDIN, J. A.; AVILA, L. A.; SALAS, R. A. Absorption, traslocation and metabolism of bispyribac-sodium on rice seedlings under cold stress. **Pest Management Science**, v.71, n.7, p.1021-1029, 2014.

MARTINS, E. A. C.; FILHO, P. R. M. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. **Revista da Biologia**, v.4, 2010.

MATSUI, T.; KAGATA, H. Characteristics of floral organs related to reliable self-pollination in rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**, v.91, n.4, p.473-477, 2003.

MATTON, D.P; BRISSON N. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts in potato. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 2, p.325-331, 1989.

MELONEK, J.; MULISCH, M.; SCHMITZ-LINNEWEBER, C.; GRABOWSKI, E.; HENSEL, G.; KRUPINSKA, K. Associates with intron containing RNAs and rarely colocalizes with nucleoids. **Planta**, v.232, p.471481, 2010.

MIAO, Y.; JIANG.; J.; REN, Y.; ZHAO, Z. The single-stranded DNA-binding protein WHIRLY1 represses WRKY53 expression and delays leaf senescence in a developmental stage-dependent manner in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.163, p.746-756, 2013.

MICKELBART, M. V.; HASEGAWA, P. M.; BAILEY-SERRES, J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**, v.16, n.4, p.237-251, 2015.

MITTLER, R. ROS are good, **Trend in Plant Science**, v.22, n.1, p.11-19, 2017.

MIURA, K.; FURUMOTO, T.; Cold signaling and cold response in plantas. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.3, p. 5312-5337, 2013.

MIURA, K.; JIN, J. B.; LEE, J.; YOO, C. Y.; STIRM, V.; MIURA, T.; ASHWORTH, E. N.; BRESSAN, R. A.; YUN, D. J.; HASEGAWA, P. M. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.19, n.4, p.1403-1414, 2007.

MIURA, K.; OHTA, M.; NAKAZAWA, M.; ONO, M.; HASEGAWA, P. M. ICE1 Ser403 is necessary for protein stabilization and regulation of cold signaling and tolerance. **The Plant Journal**, v.67, p.269-279, 2011.

MOORE, G.; FOOTE, T.; HELENTJARIS, T.; DEVOS, K.; KURATA, N.; GALE, M. Was there a single ancestral cereal chromosome? **Trends in Genetics**, v.11, p.81-82, 1995.

MORENO, A. R.; POSCHENRIEDER, C.; SHABALA, S. Transition metals: a double edge sword in ROS generation and signaling. **Plant Signaling e Behavior**, v.8, n.3, p.1559-2324, 2013.

MUJAHID, H.; TAN, F.; ZHANG, J.; NALLAMILLI, B. R. R.; PENDARVIS, K.; PENG, Z. Nuclear response to cell wall removal in rice (*Oryza sativa*). **Proteome Science**, v.26, 2013.

MUNNS, R.; PASSIOURA, J. B. Hydraulic resistance of plants. III. Effects of NaCl in barley and lupin. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.11, p.351-359, 1984.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.143-160, 1986.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

NAKAGOMI, K. Selection of new check rice varieties for evaluating high cold tolerance and the development of breeding lines with high cold tolerance in the Tohoku region of Japan. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.47, n.1, p.1-7, 2013.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.170, 2014.

NCBI Taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> - acesso em 13 de outubro de 2019.

NEGRÃO, S.; SCHMÖCKEL, S. M.; TESTER, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v.119, n.1, p.1-11, 2017.

OHMIDO, N.; FUKUI, K.; KINOSHITA, T. Recent advances in rice genome and chromosome structure research by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and Biological**, v.86, n.2, p.103-16, 2010.

OMISUN, T.; SAHOO, S.; SAHA, B.; PANDA, S. K. Relative salinity tolerance of rice cultivars native to North East India: a physiological, biochemical and molecular perspective. **Protoplasma**, n.255, v.1, p.193-202, 2017.

OUYANG, Y.; ZHANG, Q. Understanding Reproductive Isolation Based on the Rice Model. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.111-135, 2013.

PARENT, J. S.; LEPAGE, E.; BRISSON, N. Divergent roles for the two Polllike organelle DNA polymerases of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.156, p.254-262, 2011.

PARIHAR, P.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, n.22, v.6, p.4056-4075, 2014.

PAULSEN, C. E.; CARROLL, K. S. Orchestrating redox signalling networks through regulatory cysteine switches. **ACS Chemical Biology**, v.5, n.1, p.47-62, 2010.

PEREIRA, J. A.; MORAIS, O. P. As Variedades de Arroz Vermelho Brasileiras. **(Documentos 229/ Embrapa Meio-Norte)** Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2014, 39 p.

PÉREZ-LÓPEZ, U.; ROBREDO, A.; LACUESTA, M.; SGHERRI, C.; MUÑOZ-RUEDA, A.; NAVARI-IZZO, F. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. **Physiologia Plantarum**, v.135, p.29-42, 2009.

POMMERENIG, B.; PAPINI-TERZI, F.S.; SAUER, N. Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. **Plant Physiology**, v.144, n.2, p.1029-1038, 2007.

- PRIKRYL, J.; WATKINS, K. P.; FRISO, G.; VAN-WIJK, K. J.; BARKAN, A. A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-Binding proteins that is essential for chloroplast biogenesis. **Nucleic Acids Research**, v.36, p.5152-5165, 2008.
- PRISCO, J. T.; FILHO, E. G.; MIRANDA, R. S. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**, p.163-180, 2016.
- PRIYA, P.; JAIN, M. RiceSRTFDB: A database of rice transcription factors containing comprehensive expression, cis-regulatory element and mutant information to facilitate gene function analysis. **Database**, v.2013, 2013.
- QIAN, Q.; GUO, L.; SMITH, S. M.; LI, J. Breeding high-yield superior quality hybrid super rice by rational design. **National Science Review**, v.3, p.283-294, 2016.
- WASSMANN, S. V. K.; JAGADISH, K.; SUMFLETH, H.; PATHAK, H.; HOWELL, A.; ISMAIL, R.; SERRAJ, E.; REDONA, R. K.; SINGH, S. H. Regional vulnerability of climate change impacts on Asian rice production and scope for adaptation. **Advances in Agronomy**, v.102, p.99-133, 2009.
- RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum**, v.147, n.1, p.28-35, 2012.
- RAJENDRAN, K.; TESTER, M.; ROY, S. J. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. **Plant Cell & Environment**, v.32, p.237-249, 2009.
- RANDANIELSON, A.M.; GAYDON, D. S.; LI, T.; ANGELES, O.; ROTH, C. H. Modeling salinity effect on rice growth and grain yield with *ORYZA* v3 and APSIM-Oryza. **European Journal of Agronomy**, v.100, p.44-55, 2018.
- RAZA, S. H.; ATHAR, H. R.; ASHRAF, M.; HAMEED, A. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, n.3, p. 368-376, 2007.
- RAZZAQ, A.; ALI, A.; SAFDAR, L. B.; ZAFAR, M. M.; RUI, Y.; SHAKEEL, A.; SHAUKAT, A.; ARHRAF, M.; GONG, W.; YUAN, Y. Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality. **Journal of Food Science**, v. 85, n.1, p.14-20, 2020.
- ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.115-124, 2014.
- RUELLAND, E.; VAUTIER, M.; ZACHOWSKI, A.; HURRY, V. Cold signaling and cold acclimation in plants. In: **Advances in Botanical Research**, p.35-150, 2009.
- RYU, H.; CHO Y. G. Plant hormones in salt stress tolerance. **Journal of Plant Biology**, v. 58, n.3, p. 147-155, 2015.
- SAUER, F.; HANSEN, S. K., e TJIAN, R. Multiple TAFII's Directing Synergistic Activation of Transcription. **Science**, v.270, n.5243, p.1783–1788, 1995.
- SECK, P. A.; DIAGNE, A.; MOHANTY, S.; WOPEREIS, M. C. S. Crops that feed the world 7: Rice. **Food Security**, v.4, p.7-24, 2012.

- SEWELAM, N.; JASPERT, N.; KELEN, K. V. D.; SCHMITZ, J.; FRERIGMANN, H.; TOGNETTI, V. B.; ACHMITZ J, STAHL, E.; ZEIER, J.; VAN, B. F.; MAURINO, V. G. Spatial H₂O₂ signalling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes differentially modulates the plant transcriptome. **Molecular Plant**, v.7, p.1191-1210, 2014.
- SEWELAM, N.; KAZAN, K.; SCHENK, P. M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.187, 2016.
- SHAKIBA, E.; EDWARDS, J. D.; JODARI, F.; DUKE, S. E.; BALDO, A. M.; KORNILIEV, P.; MACCOUCH, S. R.; EIZENGA, G. C. Genetic architecture of cold tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through high resolution genome-wide analysis. **PLoS ONE**, v.12, n.3, p. e0172133, 2017.
- SAH, S. K.; REDDY, K. R.; LI, J. Absciscic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 571, 2016.
- SHI, Y.; DING, Y.; YANG, S. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation. **Plant and Cell Physiology**, v.56, n.1, p.7-15, 2014.
- SHI, Y.; YANG, S. ABA Regulation of the Cold Stress Response in Plants. In: ZHANG, P. D. (Ed.). **Absciscic Acid: Metabolism, Transport and Signaling**. Dordrecht: Springer, 2014, p.337-363.
- SHIMAMOTO, K.; KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.399-419, 2002.
- SHINADA, H.; IWATA, N.; SATO, T.; FUJINO, K. Genetical and morphological characterization of cold tolerance at fertilization stage in rice. **Breeding Science** v.63, p.197-204, 2013.
- SHINKAWA, R.; MORISHITA, A.; AMIKURA, K.; MACHIDA, R.; MURAKAWA, H.; KUCHITSU, K.; ISHIKAWA, M. Absciscic acid induced freezing tolerance in chilling-sensitive suspension cultures and seedlings of rice. **BMC Research Notes**, v.6, n.351, p.1-14, 2013.
- SHINOZAKI K.; SHINOZAKIY K. Y.; SEKI M.; Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.410–417, 2003.
- SHINOZAKI, K.; UEMURA, M.; BAILEY-SERRES, J.; BRAY, E. A.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (ed.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2. ed. Oxford: Wiley Black Well, 2015. p.1264.
- SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.13, p.8735-8741, 2014.
- SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEY, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Eds.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicado**, Expressão Gráfica e Editora, Fortaleza, 2010, p. 161-180.
- SINGH, D.; LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response: A tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**, n.6, p.895, 2015.

- SKIRYCZ, A.; INZE, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Plant Biotechnology**, v.21, n.2, p.197-203, 2010.
- SINGH, R. P.; BRENNAM, J. P.; FARRELL, T.; WILLIAMS, R.; REINKE, R.; LEWIN, L.; MULLEN, J. Economic analysis of improving cold tolerance um rice in Australia. Final Report, **CRC for Sustainable Rice Production**, Yanco. 2002.
- SLAMA, I.; ABDELLY, C.; BOUCHEREAU, A.; FLOWERS, T.; SAVOURÉ, A. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v.115, p.433-447, 2015.
- SOSBAI - **Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado**. Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Cachoeirinha: SOSBAI, 2018. 205p.
- SOUZA, J. M. O.; CARNEIRO, M. F. H.; PAULELLI, A. C. C.; GROTTTO, D.; MAGALHÕES JÚNIOR, A. M.; JÚNIOR, F. B.; BATISTA, B. L. Arsenic and rice: toxicity, metabolism, and food safety. **Química Nova**, v.38 n.1, 2015.
- STREB, P.; SHANG, W.; FEIERABEND, J. Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress, **Plant, Cell & Environment**, v.22, n.10, p.1211-1223, 1999.
- SUBRAMANIAN, R.; DESPRÉS, C.; BRISSON, N. A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. **The Plant Cell**, v.9, p.653-664, 1997.
- SWEENEY, M.; MCCOUCH, S. The Complex History of the Domestication of Rice. **Oxford journals**, v.100, p.951-957, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 5 ed., 2011. 778p.
- TAN, L.; IJAZ, U.; SALIH, H.; CHENG, Z.; HTET, N. N. W.; GE, Y. AZEEM, F. Genome-Wlde identification and comparative analysis of MYN transcription fator Family in *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. **Plants**, v.9, 2020.
- TANG, X.; MU, X.; SHAO, H.; WANG, H.; BRESTIC, M. Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.35, n.4, p.425-437, 2014.
- TEIGE, M.; SCHEIKL, E.; EULGEM, T.; SHINOZAKI, K.; DANG, J. L.; HIRT, H.; DOCZI, R.; ICHIMURA, K. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. **Molecular Cell**, v.15, p.141-152, 2004.
- TERRA, T. G. R.; LEAL, T. C. A. B.; BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.2, p.201-208, 2013.
- TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, v.91, p.503-527, 2003.
- THIMMAPPA, K.; RAJU, R.; TRIPATHI, R. S.; DAGAR, J. C.; YADAV, R. K. Management of salt-affected soils in India: gender and socioeconomic dimensions for sustainable livelihoods. In: DAGAR, J. C.; YADAV, R. K.; SHARMA, P. C. (eds.). **Research developments in saline agriculture**. Springer, Singapura, 2019, p.835-851.

THORAT, B. S.; BAGKAR, T. A.; RAUT, S. M. Responses of rice under salinity stress: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v.6, n.4, p.1441-1447, 2018.

TOLOSA, L. N.; ZHANG, Z. The role of major transcription factors in Solanaceous food crops under diferente stress conditions: Current and future perspectives. **Plants**, v.9, n.56, 2020.

TRIEZENBERG, S. J. Structure and function of transcriptional activation domains. **Current Biology**, v.5, n.2, p.190-196, 1995.

TÜRKAN, I.; DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p.2-9, 2009.

TUTEJA, N.; GILL, S. S.; TUTEJA, R. Omics and Plant Stress Tolerance. **Bentham Science**, p.39-64, 2011.

UDAWAT, P.; DEVESHWAR, P. Signalling during cold stress and its interplay with transcriptional regulation. In: Zargar, S. M.; Zargar, M. Y. (Eds.). **Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective**. Springer Nature Singapore, India, 2018, p.309-328.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.97, n.21, p.11632-7, 2000.

USDA - United State Departament Of Agriculture – **World Agricultural Production**. Disponível em: <http://usda.library.cornell.edu/>. Acessado em: 22 de maio de 2019.

VAUGHAN, D. A.; CHANG, T.T. Collecting the rice gene pool. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; REID, R. Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. Wallingford: **CAB International**, p.659-675, 1995.

VIANA, V. E. **Expressão de genes WRKY e alterações morfológicas em arroz sob estresse por submergência**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2014.

VIGHI, I. L.; BENITEZ, L. C.; AMARAL, M. N. do.; AULER, P. A.; MORAES, G. P.; RODRIGUES, G. S.; MAIA, L. C. da.; PINTO, L. S.; BRAGA, E. J. B. Changes in gene expression. And catalase activity in *Oryza sativa* L. under abiotic stress. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.4, 2016.

VILLWOCK, J.A., TOMAZELLI, L.J. **Geologia costeira do Rio Grande do Sul**. Notas Técnicas. CECO, Instituto de Geociências, UFRGS, Porto Alegre, n.8, 1995, p.1-45.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.123-132, 2005.

VISWANATHAN, C.; ZHU, J. K. Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. **Philosophical Transaction of The Royal Society B: Biological Sciences**, v.357, n.1423, p.877-886, 2002.

- VOB, U.; BISHOPP, A.; FARCOT, E.; BENNETT, M. J. Modelling hormonal response and development. **Trends Plant Science**, v.19, p.311-319, 2014.
- 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, F., GUO, Z., LI, H.; WANG, M.; ONAC, E.; ZHOU, J.; XIA, X.; SHI, K.; YU, J.; ZHOU, Y. Phytochrome A and B function antagonistically to regulate cold tolerance via abscisic acid-dependent jasmonate signaling. **Plant Physiology**, v.170, p.459-471, 2016.
- WANI, S. H.; KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; SAH, S. K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v.4, n.3, p. 162-176, 2016.
- WASTERNAK, C. Action of jasmonates in plant stress responses and development: applied aspects. **Biotechnology Advances**, v.32, p.31-39, 2013.
- XIN, Z.; BROWSE, J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. **Plant, Cell and Environment**, v.23, n.9, p.893-902, 2000.
- XIONG, J. Y.; LAI, C. X.; QU, Z.; YANG, X. Y.; QIN, X. H.; LIU, G. Q. Recruitment of AtWHY1 and AtWHY3 by a distal element upstream of the kinesin gene AtKP1 to mediate transcriptional repression. **Plant Molecular Biology**, v.71, p.437-449, 2009.
- XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; TANAKA, Y.; STEVENSON, B.; KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; ZHU, JK. Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.99, n.16, p.10899–10904, 2002.
- YAMADA, N.; TAKAHASHI, H.; KITOU, K.; SAHASHI, K.; TAMAGAKE, H.; TANAKA, Y.; TAKABE, T. Suppressed expression of choline monooxygenase in sugar beet on the accumulation of glycine betaine. **Plant Physiol Biochem**, v.96, p.217-221, 2015.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.781-803, 2006.
- YAN, K.; SHAO, H.; SHAO, C.; CHEN, P.; ZHAO, S.; BRESTIC, M.; CHEN, X. Physiological adaptive mechanisms of plants grown in saline soil and implications for sustainable saline agriculture in coastal zone. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.2867-2878, 2013.
- YANG, Y.; GUO, Y. Unraveling salt stress signaling in plant. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.60, n.9, p. 796-804, 2018.
- YEO, A. R.; FLOWERS, T. J. Nonosmotic effects of polyethylene glycols upon sodium transport and sodium-potassium selectivity by rice roots. **Plant Physiology**, v.75, p.298-303, 1984.
- YOO, H. H.; KWON, C.; LEE, M. M.; CHUNG, I. K. Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. **Plant Journal**, v.49, p.442-451, 2007.

- YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1981. cap.1, p.1-63.
- ZALABÁK, D.; POSPÍŠILOVÁ, H.; ŠMEHILOVÁ, M.; MRÍZOVÁ, K.; FRÉBORT, I.; GALUSZKA, P. Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. **Biotechnology Advances**, v.31, n.1, p.97–117, 2013.
- ZENG, L.; SHANNON, M. C.; LESCH, S. M. Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. **Agricultural Water Management**, v.48, n.3; p.191-206, 2001.
- ZHANG, W.; RUAN, J.; HO, T. D.; YOU, Y.; YU, T.; QUATRANO, R. S. *Cis*-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v.2, n.14, p.3074–3081, 2005.
- ZHAO, C.; WANG, P.; SI, T.; HSU, C. C.; WAN, L.; ZAYED, O.; YU, Z.; ZHU, Y.; DONG, J.; TAO, W. A.; ZHU, J. K. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability. **Developmental Cell**, v.43, p. 618-629, 2017.
- ZHAO, S. Y.; WANG, G. D.; ZHAO, W. Y.; ZHANG, S.; KONG, F. Y.; DONG, X. C.; MENG, Q. W. Overexpression of tomato WHIRLY protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. **Biologia Plantarum**, v.62, n.1, 2018.
- ZHAO, X.; YANG, L.; ZHENG, Y.; XU, Z. Subspecies-specific intron length polymorphism markers reveal clear genetic differentiation in common wild rice (*Oryza rufipogon* L.) in relation to the domestication of cultivated rice (*O. sativa* L.). **Journal of Genetics and Genomics**, v.36, p.435-442, 2009.
- ZHENG, G.; LI, L.; LI, W. Glycerolipidome responses to freezing- and chilling-induced injuries: examples in *Arabidopsis* and rice. **BMC Plant Biology**, v.16, n.70, p.1-15, 2016.
- ZHU, J. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, v.167, n.2, p.313-324, 2016.
- ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.53, p 247–273, 2002.
- ZIELINSKI, R. E. Calmodulin and calmodulin binding proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p. 697–725, 1998.

3. CAPÍTULO II

Identificação e caracterização dos genes *Whirly* no gênero *Oryza*

3.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) serve de fonte para alimentação de milhões de pessoas, é um dos cereais mais produzidos sendo consumido por mais da metade da população mundial (FAIRHURST e DOBERMANN, 2002). Exerce funções importantes tanto em níveis econômicos quanto sociais em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (KYNDT et al., 2014). Alterações ambientais desfavoráveis podem prejudicar o desenvolvimento e a produtividade do arroz tornando-o mais propenso a estresses abióticos como baixas temperaturas e salinidade (FAHAD et al., 2017).

Na principal região produtora de arroz do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul (RS), a incidência de salinidade e baixas temperaturas ocorre em todos estádios de desenvolvimento da cultura, afetando seu potencial produtivo (LEMES, et al., 2018; MERTZ, et al., 2009). Considerando que as condições climáticas desfavoráveis impactam negativamente o crescimento e desenvolvimento do arroz, o melhoramento genético de plantas busca constantemente o desenvolvimento de novas cultivares tolerantes às condições adversas. Nesse sentido, identificar genes que estão associados com a tolerância aos estresses por salinidade e baixas temperaturas é uma abordagem importante para auxiliar os melhoristas na obtenção de genótipos tolerantes.

Fatores de transcrição (FTs) estão envolvidos na sinalização inicial em resposta a estresses (FARIA, 2009). Os FTs se ligam em sequências regulatórias e ativam genes envolvidos na resposta e tolerância a estresses. Várias famílias de FTs, como bZIPs, WRKYs, CBFs, DREBs e demais ERFs têm sido caracterizados pela associação à tolerância a estresses por baixas temperaturas e salinidade. No entanto, a família de FTs *Whirly* apresenta pouca informação na literatura, principalmente no caso do arroz, e tem se mostrado forte candidata para estudos relacionados a tolerância em diferentes espécies sob estresses (DESVEAUX et al., 2005; PENG et al., 2015; DADALTO, 2016;

JANACK et al., 2016; ZHAO et al. 2018; AKBUDAK e FILIZ, 2019; ZHUANG et al., 2020; YAN et al., 2020).

O desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses é possível através da variabilidade genética existente entre os acessos. Porém, o processo de domesticação e posteriormente o uso das mesmas cultivares ao longo dos anos por produtores e melhoristas ocasionou uma erosão da variabilidade genética, tornando o processo de melhoramento mais complexo (GOVINDARAJ et al., 2015; BUSANELLO et al., 2020; GAIKWAD et al., 2020). Para lidar com essa situação, alguns genes importantes foram transferidos de espécies selvagens para os genótipos modernos (HEDDEN, 2003; HOISINGTON et al., 1999; MANJUNATHA e KRISHNAPPA, 2019), fazendo das espécies selvagens fonte de variabilidade genética (RAM et al., 2007).

As espécies selvagens de arroz podem ter alelos benéficos, que foram perdidos durante o processo de domesticação. Com isso, essas espécies são a base para recuperar a diversidade genética perdida em arroz. De maneira geral, as espécies selvagens de arroz estão melhor adaptadas a diferentes ecologias e podem tolerar muitos estresses bióticos e abióticos devido ao seu reservatório de alelos e QTLs. Entretanto, apenas algumas espécies selvagens foram estudadas e caracterização molecular e morfológica ainda não foi alcançada (GAIKWAD et al., 2020).

Considerando o exposto, esse estudo visa a identificação e caracterização de genes *Whirly* em espécies do gênero *Oryza*, trazendo uma proposta inicial para utilização desses genes em arroz visando tolerância a estresses abióticos como salinidade e baixas temperaturas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção de sequências, construção de árvore filogenética, estrutura dos genes e estrutura de proteínas *Whirly*

Inicialmente, os genes *Whirly* presentes em arroz foram identificados no banco de dados *Plant Transcription Factor Database* - PlantTFDB v5.0 (<http://planttfdb.gao-lab.org/>). As sequências dos genes *Whirly* em *Oryza sativa* ssp. *japonica* foram obtidas no banco de dados *The Rice Annotation Project Database* (RAP-DB) (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>). A partir das

sequências gênicas de *O. sativa* ssp. *japonica* foram identificados os genes *Whirly* em *O. sativa* ssp. *indica* e das demais espécies do gênero *Oryza* (*O. rufipogon*, *O. nivara*, *O. glumepatula*, *O. glaberrima*, *O. barthii*, *O. meridionalis*, *O. punctata*, *O. brachyantha*, *O. longistaminata*) e *L. perrieri* através da ferramenta BLAST, disponível no banco de dados ENSEMBL PLANTS (<http://plants.ensembl.org/index.html>), totalizando 12 genomas. Foram escolhidos para análise somente os genes *Whirly* que apresentavam máximo *score* associado com alta cobertura, e-*value* altamente significativo. Para avaliar a presença de eventos de duplicação de genes foi definido um valor de ponto de corte de no máximo e-*value* de $1e^{-10}$.

Utilizando o programa MEGA7 (KUMAR et al., 2016) foi possível alinhar as sequências das proteínas com a ferramenta *Clustal W* (LARKIN et al., 2007) e determinar o melhor modelo de substituição. O modelo apropriado foi selecionado para uso na análise Bayesiana utilizando o pacote *BEAST* (DRUMMOND E RAMBAUT, 2007) com 1.000.000 de réplicas de *bootstrap*. A árvore resultante foi visualizada no software *FigTree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). A espécie *Leersia perrieri* foi escolhida como *outgroup*. A identificação dos motivos das proteínas *Whirly* foi feita utilizando *Multiple Motif In Elicitation* versão 4.11.1 (MEME; <http://meme-suite.org/tools/meme>) (BAILEY et al., 2009), sendo 10 o número máximo de motivos.

A análise estrutural foi realizada utilizando as sequências dos genes *Whirly*. Para a construção da estrutura dos genes *Whirly* nas espécies do gênero *Oryza* foi utilizado o software de anotação AUGUSTUS (STANKE et al., 2004) e para a visualização o software GSDS 2.0 (HU et al., 2014).

3.2.2 Identificação de Elementos Regulatórios de Ação cis (ERACs) em promotores de genes *Whirly*

As sequências dos promotores (1500 pb *upstream*) dos genes *Whirly* nas 9 espécies selvagens do gênero *Oryza*, *O. sativa* spp. *japonica* e *O. sativa* spp. *indica* foram obtidas através da plataforma ENSEMBL PLANTS (<http://plants.ensembl.org/index.html>). As sequências promotoras dos genes *Whirly* foram investigadas quanto à identificação e abundância de elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs). As sequências foram analisadas utilizando o

banco *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (PLACE) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (HIGO et al., 1999).

3.3 Resultados e Discussão

Os fatores de transcrição (FTs) codificados pelos genes *Whirly* estão relacionados com a proteção do DNA, transporte de proteínas, manutenção dos telômeros e função regulatória positiva com relação a estresses bióticos e abióticos, como excesso de luz e ataque por patógenos (ZHAO et al., 2017). Esses FTs possuem função de se ligar ao ssDNA (DNA fita simples – do inglês *single strand DNA*) e estão envolvidos no controle da expressão de genes relacionados a defesa (DESVEAUX et al., 2004). A superexpressão de genes *Whirly* de tomate em tabaco promoveu respostas de tolerância ao estresse por déficit hídrico (ZHAO et al., 2018). Janack et al., (2016) também verificaram o envolvimento dos genes *Whirly* na sinalização em resposta a seca em cevada. Ainda, foi demonstrado que genes *Whirly* promovem tolerância ao calor em tomate (ZHUANG et al., 2020). Esses estudos demonstram o potencial desses genes no desenvolvimento de plantas de arroz superiores, com tolerância a diferentes estresses abióticos, incluindo salinidade e baixas temperaturas.

3.3.1 Identificação e caracterização de genes *Whirly* em *Oryza*

Foram identificados dois genes *Whirly*, sendo estes localizados nos cromossomos 2 e 6 nos 12 genomas analisados. Não foram identificadas duplicações gênicas em nenhuma das espécies (Tabela 2). Dessa forma, um total de 24 sequências correspondentes aos genes *Whirly* localizados no cromossomo 2 e 6, foram identificados nas espécies de *Oryza* e na espécie *Leersia perrieri*. Todas as espécies analisadas apresentaram uma cópia correspondente a *Whirly2* e uma cópia correspondente a *Whirly6*, mantendo a localização nos cromossomos 2 e 6, respectivamente. Esse perfil sugere que o evento de duplicação dos genes *Whirly* ocorreu antes da divisão das espécies do gênero *Oryza*.

A manutenção de *Whirly2* e *Whirly6* nos diferentes genomas ao longo da evolução demonstra a importância desses FTs no gênero *Oryza*, sugerindo que atuam como genes essenciais. Genes essenciais codificam proteínas envolvidas

em processos celulares centrais necessários para viabilidade de um organismo. Com isso, o papel central dos genes essenciais sugere que eles devem ser altamente conservados durante a evolução. Genes essenciais tendem a permanecer essenciais durante evolução, ou seja, se um gene é essencial em um organismo, então os ortólogos desse gene normalmente serão essenciais em outros organismos. Porém, alguns genes não seguem esses padrões, isto significa que alguns genes que são essenciais em um organismo não são essenciais em outros organismos; e em alguns casos, genes que são essenciais em um organismo foram perdidos nos genomas de outros organismos. Neste caso, outro gene (gene parálogo ou não relacionado) pode executar a função essencial (BERGMILLER et al., 2012).

Tabela 2. Genes *Whirly* identificados nas espécies de *Oryza*. *OsJAP* - *O. sativa japonica*; *OsIND* - *O. sativa indica*; *ORUF* - *O. rufipogon*; *ONIV* - *O. nivara*; *ONGLU* - *O. glumaepatula*; *OGLA* - *O. glaberrima*; *OBAR* - *O. barthii*; *OMER* - *O. meridionalis*; *OPUN* - *O. punctata*; *OBRA* - *O. brachyantha*; *OLON* - *O. longistaminata*; e *LPER* - *L. perrieri*.

Gênero <i>Oryza</i>	Genes	Referência para RAP- DB/Ensembl ID	Localização	Início	Fim	Tamanho	ID	E-value
OsJAP	<i>Whirly 2</i>	Os02g0158400	Chro 2	3182926	3187016	4090	-	-
OsJAP	<i>Whirly 6</i>	Os06g0145800	Chro 6	2405409	2408049	2640	-	-
OsIND	<i>Whirly 2</i>	BGIOSGA007096	Chro 2	3730184	3733821	3637	100.0	0.0
OsIND	<i>Whirly 6</i>	BGIOGA022297	Chro 6	2729567	2731973	2406	99.8	0.0
ORUF	<i>Whirly 2</i>	ORUFIO2G04590	Chro 2	2907531	2911377	3846	99.9	0.0
ORUF	<i>Whirly 6</i>	ORUFIO6G03010	Chro 6	2167393	2170248	2855	99.9	0.0
OPUN	<i>Whirly 2</i>	OPUNC02G03720	Chro 2	2630851	2634587	3736	96.4	0.0
OPUN	<i>Whirly 6</i>	OPUNC06G02750	Chro 6	1886169	1889035	2866	95.3	0 e-173
ONIV	<i>Whirly 2</i>	ONIVA02G04450	Chro 2	2849758	2854252	4494	99.7	0.0
ONIV	<i>Whirly 6</i>	ONIVA06G03980	Chro 6	2624508	2628992	4484	99.9	0.0
OMER	<i>Whirly 2</i>	OMERIO2G05290	Chro 2	4362910	4377925	15016	97.5	0.0
OMER	<i>Whirly 6</i>	OMERIO6G03280	Chro 6	2719754	2723534	3780	95.6	0.0
OLON	<i>Whirly 2</i>	KN539194.1 FG001 AMDW01040645.1 FG001	Chro 2	4985474	4987734	2260	98.2	0.0
OLON	<i>Whirly 6</i>		Chro 6	2307348	2308435	1087	97.4	0.0
ONGLU	<i>Whirly 2</i>	OGLUM02G04370	Chro 2	3132453	3136297	3844	99.6	0.0
ONGLU	<i>Whirly 6</i>	OGLUM06G0310	Chro 6	2128600	2146970	18370	95.0	0.0
OGLA	<i>Whirly 2</i>	ORGLA02G0041200	Chro 2	2858526	2862160	3634	99.9	0.0
OGLA	<i>Whirly 6</i>	ORGLA06G0029900	Chro 6	2254601	2257000	2399	99.7	0.0
OBRA	<i>Whirly 2</i>	OB02G13770	Chro 2	2233481	2238805	5324	90.9	7.3 e-60
OBRA	<i>Whirly 6</i>	OB06G12750	Chro 6	1642026	1644939	2913	93.2	2.2 e-71
OBAR	<i>Whirly 2</i>	OBART02G04450	Chro 2	2895803	2899642	3839	99.8	0.0
OBAR	<i>Whirly 6</i>	OBART06G03050	Chro 6	2186702	2189554	2852	99.7	0.0
LPER	<i>Whirly 2</i>	LPERR02G03890	Chro 2	2543180	2547124	3944	93.8	1.2 e-61
LPER	<i>Whirly 6</i>	LPERR06G02670	Chro 6	1786778	1789886	3108	91.5	6.8 e-87

De maneira geral, proteínas Whirly2 de diferentes espécies são mais similares entre si do que com proteínas Whirly6 dentro da mesma espécie (Figura 8A). Esse perfil demonstra que para a maioria das espécies os genes *Whirly2* e *Whirly6* acumularam mutações nas sequências e estrutura gênica, tornando-os diferentes (Figura 8B). Por exemplo, com relação ao tamanho do gene, verifica-se que, de maneira geral, *Whirly6* é menor que *Whirly2* devido a ausência de dois exons (Figura 8B). Dessa forma, as proteínas codificadas por eles apresentam diferenças. Essas mudanças são importantes para a evolução, pois genes similares como *Whirly2* e *Whirly6* podem apresentar funções distintas, que podem ocasionar mudanças no fenótipo e interação com ambiente (BARTLETT e WHIPPLE, 2013). Ainda, parece ocorrer maior conservação na estrutura de *Whirly6* do que *Whirly2*, sugerindo que *Whirly6* (mais recente, menor número de mutações) surgiu a partir da duplicação de *Whirly2* (mais antigo, maior número de mutações).

A proteína codificada pelo gene *Whirly2* de *O. brachyantha* é a mais distante, seguido das proteínas Whirly2 de *O. punctata* e *L. perrieri* (outgroup), que também se distanciam das demais espécies. Nesse sentido, *O. punctata* poderia ser utilizada como fonte de variabilidade para *Whirly2*. Da mesma forma, *O. brachyantha* também é uma possível fonte de variabilidade entre as espécies do gênero *Oryza* para o gene *Whirly2*, e essa variabilidade é devida a um grande éxon na porção inicial do gene (Figura 8B).

O. meridionalis também apresenta um éxon grande na região 5' de *Whirly2*, diferindo das outras espécies (Figura 8B), porém, apresenta apenas dois dos nove motivos encontrados nas demais espécies (Figura 8C), o que sugere a perda/alteração de função desse gene. De modo interessante *Whirly6* de *O. glumaepatula* apresenta um longo íntron em sua estrutura, que não é encontrado nas outras espécies analisadas (Figura 8B), o que poderia ser uma importante fonte de variabilidade considerando eventos de *splicing* alternativo e regulação gênica (JO e CHOI, 2015). Porém, a sua estrutura proteica apresenta apenas um motivo (Figura 8C), sugerindo alteração de função.

Neste estudo, verificou-se que os genes com maior tamanho (*Whirly2* de *O. meridionalis* e *Whirly6* de *O. glumaepatula*) codificaram proteínas

aparentemente sem função. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para caracterizar esses genes e proteínas nas diferentes espécies.

Estudos de caracterização de germoplasma e programas de melhoramento ao longo de muitos anos têm demonstrado que, de maneira geral, as plantas cultivadas apresentam menor tolerância a estresses bióticos e abióticos quando comparadas a parentes selvagens. Esses caracteres de tolerância podem ser transferidos dos parentes selvagem para a espécie cultivada (sensível) por meio de melhoramento convencional (se houver compatibilidade sexual), transgênese ou outras tecnologias emergentes (MAMMANDOV et al., 2018). Nesse sentido, estudos com espécies selvagens são fundamentais para identificação de fontes de variabilidade assim como genes candidatos para introgressão para plantas cultivadas.

A introgressão de genes de interesse de parentes selvagens para espécies cultivadas, por meio de melhoramento convencional entre espécies compatíveis, pode ocasionar algumas complicações devido ao arraste de características indesejáveis, ocasionado pela ligação de genes. Porém, o retrocruzamento assistido por marcadores é uma técnica capaz de eliminar rapidamente o arraste de ligação com um número mínimo de gerações. Se existir barreiras que impedem a transferência de genes entre as espécies, pode-se utilizar a transgenia. A transgênese, além de possibilitar a transferência de genes entre espécies não compatíveis, elimina o arraste de ligação (MAMMANDOV et al., 2018). Mas para isso, é necessária a identificação de genes candidatos, como os *Whirly*, para que possam ser testados em estudos de introgressão via transgenia. Genes *Whirly*, assim como outros genes codificadores de fatores de transcrição são particularmente interessantes, pois são responsáveis pela regulação de inúmeros outros genes.

Uma coletânea de estudos de introgressão de genes de espécies selvagens para espécies cultivadas de arroz foi feita por Mammandov et al. (2018). Os autores reportaram estudos de introgressão para tolerância a insetos (*Nilaparvata lugens* Stål), tolerância a doença (*Magnaporthe oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, e algumas viroses), tolerância a estresses abióticos (calor, seca, solo ácido, solo com alumínio, salinidade e frio). Esses estudos evidenciam a importância das pesquisas em parentes selvagens como fonte de variabilidade.

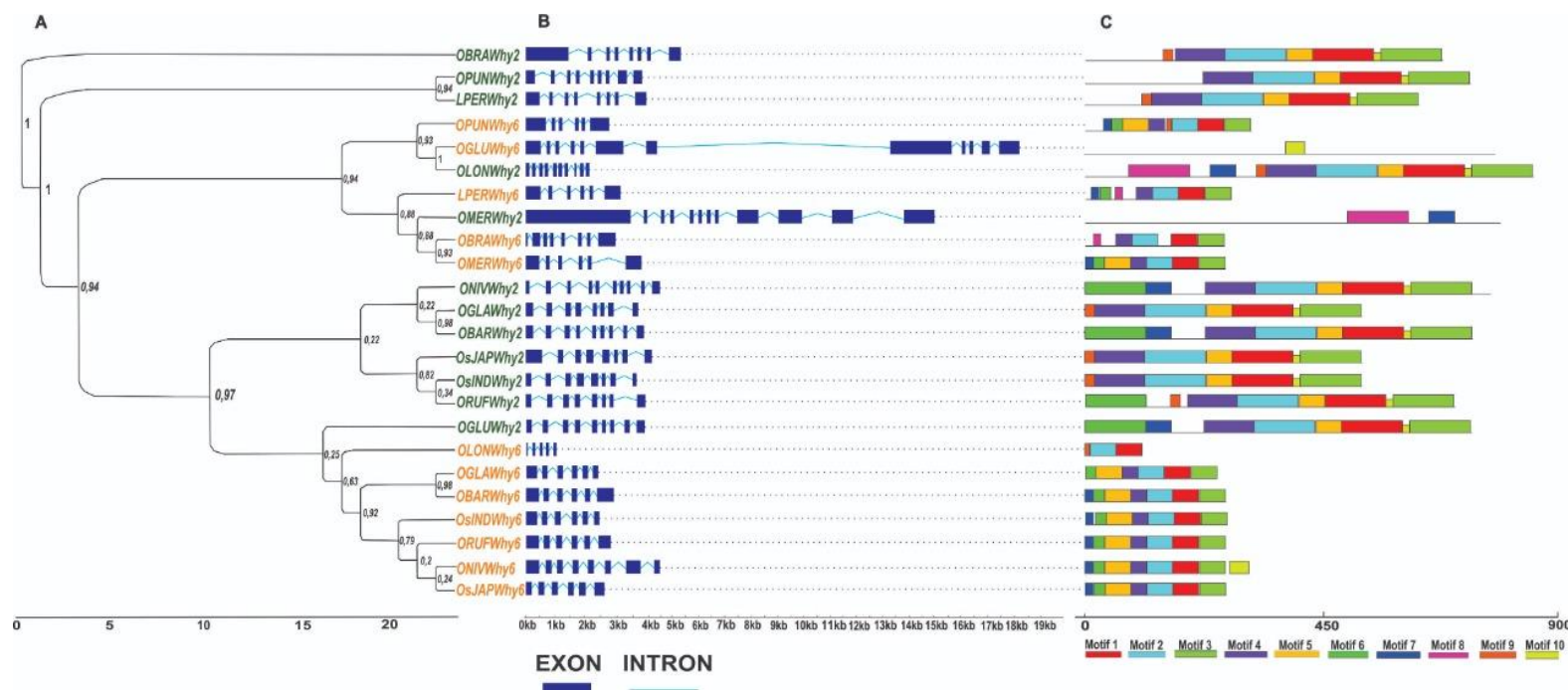


Figura 8. Relação filogenética, estrutura dos genes e análise dos motivos conservados nas proteínas Whirly em *Oryza*. **A.** Árvore filogenética das proteínas foi construída com o pacote BEAST através de análise bayesiana utilizando réplicas de bootstrap de 1.000.000. A árvore é mista, onde em laranja encontram-se as espécies do gênero *Oryza* no gene *Whirly6* e em verde as espécies do gênero *Oryza* no gene *Whirly2*. **B.** Estrutura exons-íntrons dos genes *Whirly* em *Oryza*. Os blocos azuis representam os exons e as linhas azul claro representam os íntrons. **C.** Os motivos proteicos são indicados em diferentes cores. A variação dos motivos ocorre de 1 a 10. OsJAP - *O. sativa japonica*; OsIND - *O. sativa indica*; ORUF - *O. rufipogon*; ONIV - *O. nivara*; ORGLU - *O. glumaepatula*; OGLA - *O. glaberrima*; OBAR - *O. barthii*; OMER - *O. meridionalis*; OPUN - *O. punctata*; OBRA - *O. brachyantha*; OLON - *O. longistaminata*; e LPER - *L. perrieri*.

3.3.2 Regulação da expressão de genes *Whirly* no gênero *Oryza*

Avaliando a sequência dos promotores dos genes *Whirly* nas diferentes espécies *Oryza* foi detectada a presença de sequências reguladoras de resposta a estresses abióticos. Foram detectados um total de 162 ERACs em genes *Whirly*, considerando todas as ocorrências nos 11 genomas do gênero *Oryza* (Apêndice A). Como os estresses por salinidade e baixas temperaturas são sinalizados na planta por vias dependentes e independentes de ácido abscísico (ABA), foram selecionados ERACs que atuam nas duas vias de sinalização (Figura 9).

O fator de transcrição DREB/CBF (proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação/fator de ligação à repetição C) atua na sinalização de forma independente de ABA (SINGH e LAXMI, 2015). Nesse estudo, dois ERACs (DRECRTCOREAT e CBFHV), sítios de ligação de DREB/CBF, foram comuns para os promotores dos dois genes *Whirly* e se mantiveram conservados na grande maioria das espécies (Figura 9). Em um estudo realizado com *Arabidopsis thaliana* a superexpressão de *AtDREB1/CBF* conferiu tolerância a frio, seca e alta salinidade, indicando que esse FT regulou genes envolvidos na tolerância aos estresses (revisado por KIMOTHU et al., 2019). Dessa forma, os resultados encontrados sugerem que os genes *Whirly* podem fazer parte da sinalização de resposta a estresses nas espécies do gênero *Oryza*, já que são alvos de DREBs. Outros ERACs, sítios de ligação de DREB/CBF (DRE2COREZMRAB17, CRTDREHVCBF2, LTRE1HVBTL49, LTRECOREATCOR15) não apresentaram um padrão de presença e ausência entre as espécies do gênero *Oryza*.

Sinalização		FTs	CRE	OsrapWhy2	OsrapWhy6	OsindWhy2	OsindWhy6	OrufWhy2	OrufWhy6	OpunWhy2	OpunWhy6	OnivWhy2	OnivWhy6	OmerWhy2	OmerWhy6	OgluWhy2	OgluWhy6	OglaWhy2	OglaWhy6	ObraWhy2	ObraWhy6	ObarWhy2	ObarWhy6	
ABA Independente	DREB/CBF	DRE2COREZMRAB17	1	0	2	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
		DRECRTCOREAT	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
		CBFHV	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	0	1	1	1	1	0	3	1	1
		CRTDREHVCBF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	
		LTRE1HVBLT49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		LTRECOREATCOR15	1	3	2	3	2	3	1	1	2	3	0	3	1	3	1	3	1	3	0	1	1	3
ABA Dependente	AREB/ABF	ABRELATERD1	2	0	2	0	2	0	4	0	2	0	0	2	0	2	2	0	16	0	0	3	2	0
		ABREOSRAB21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		ABRERATCAL	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		DPBFCOREDCDC3	3	2	2	3	2	3	5	2	2	4	0	1	1	3	1	2	3	3	1	2		
	MYB	MYB1AT	5	2	3	2	3	2	2	2	4	2	2	3	4	3	4	2	4	2	4	2	5	2
		EECCRAH1	1	3	1	4	1	3	2	4	1	3	1	4	1	4	1	3	3	1	1	3		
		IBOX	3	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0	3	2	0	0
		L1BOXATPDF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		MYB1LEPR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		MYB2CONSENSUSAT	4	5	5	2	5	4	5	2	4	6	0	4	4	4	5	4	2	3	5	5		
		MYBATRD22	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		MYBCORE	8	7	9	4	10	9	10	3	8	8	0	6	8	8	10	7	8	5	10	7		
		MYBCOREATCYCB1	0	4	0	2	0	4	0	3	0	9	0	4	0	4	0	4	0	4	0	3	0	4
		BOXLCOREDCPAL	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		MYBPZM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	
		MYBPLANT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		MYBST1	0	5	0	5	0	5	1	5	0	5	1	5	0	4	0	5	3	4	0	5		
		TATCCAOSAMY	0	2	0	1	0	2	0	4	0	2	1	0	0	0	0	1	2	1	0	2		
	MYC	T/GBOXATPIN2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
		BP5OSWX	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
		MYCATRD22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
		MYCATERD1	1	1	0	1	0	2	1	0	1	4	0	0	0	2	0	2	3	1	0	2		
		MYCCONSENSUSAT	16	6	14	8	14	8	16	4	16	14	6	8	12	12	14	6	16	10	14	4		
	WRKY	WBOXPCWRKY1	1	1	1	1	1	1	0	0	2	2	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1		
		WBOXATNPR1	4	6	3	4	3	5	2	2	4	8	0	4	3	6	3	6	3	2	3	6		
		WBOXHVIS01	1	5	2	5	1	5	1	3	1	6	1	4	2	5	2	5	5	0	2	5		
		WBOXNTCHN48	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	0	1	1	2	1	2	0	0	1	2		
		WBOXNTERF3	3	7	4	7	4	7	2	4	4	9	1	6	4	6	4	7	5	2	4	8		
		WRKY71OS	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
		WRKY71OS 12	12	0	0	0	0	12	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		ELRECOREPCR1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0		

Figura 9. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores preditos dos genes Whirly, alvos de fatores de transcrição (FTs) sinalizados via dependente e independente de ácido abscísico (ABA) nas espécies do gênero *Oryza*. *Osrap*: *Oryza sativa* ssp. *Japônica*; *Osind*: *O. sativa* ssp. *Indica*; *Oruf*: *O. rufipogon*; *Opun*: *O. punctata*; *Oniv*: *O. nivara*; *Omer*: *O. meridionalis*; *Oglu*: *O. glumaepatula*; *Ogla*: *O. glaberrima*; *Obra*: *O. brachyantha*; *Obar*: *O. barthii*.

Quando se considera a sinalização dependente de ABA, tem-se a atuação dos FTs AREB/ABF (proteína de ligação a ABRE/fator de ligação a ABRE), MYB (myeloblastosis), MYC (myelocytomatosis) e WRKYs (SINGH e LAXMI, 2015). Exceto no promotor de *Whirly2* de *Oryza meridionalis*, o ERAC DPBFCOREDCDC3, reconhecido por AREB/ABF, foi comum em todas as espécies para os dois genes, enquanto os demais ERACs reconhecidos por esse FT tiveram ocorrência reduzida nos promotores (Figura 9). Com isso, acredita-se que os genes *Whirly* também sejam regulados por AREB/ABF via DPBFCOREDCDC3 sob condição de estresse.

Treze ERACs alvos de MYB tiveram ocorrência comum entre as espécies, sendo dois deles (MYB1AT e EECCRCAH1) presentes em todas espécies de gênero *Oryza*. Os ERACs L1BOXATPDF1 e MYB1LEPR tiveram ocorrência apenas em *Oryza brachyantha*. ERACs alvos de MYCs apresentaram menor ocorrência, com apenas um elemento (MYCCONSUSAT) presente em todos os promotores analisados (Figura 9). A presença de ERACs alvos de MYB e MYC também sugerem o envolvimento dos genes *Whirly* na resposta a estresses, já que esses FTs são conhecidos por atuarem na sinalização sob condição de estresse (KIMOTHO et al., 2019).

Alta ocorrência de ERACs alvos de WRKYs foi encontrada nos promotores dos genes *Whirly* (Figura 9), sugerindo sua regulação preferencialmente por esses FTs. A participação de WRKY na sinalização a estresses (revisado por VIANA et al., 2018) e a presença de ERACs alvo desses FTs indica que os genes *Whirly* são fortes candidatos para tolerância a estresses.

3.4 Conclusão

Os genes *Whirly* possuem variações estruturais entre as diferentes espécies do gênero *Oryza*, entretanto não apresentam alterações quanto ao número e localização entre as espécies. Genes *Whirly* podem ser regulados através da sinalização dependente e independente de ABA.

Referências Bibliográficas

- AKBUDAK, M. A.; FILIZ, E. Whirly (Why) transcription factors in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): genome-wide identification and transcriptional profiling under drought and salt stresses. **Molecular Biology Reports**, 46, n.4, p.4139-4150, 2019.
- BAILEY, T. L.; BODEN, M.; BUSKE, F. A.; FRITH, M.; GRANT, C. E.; CLEMENTI, L.; NOBLE, W. S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic acids research**, v.37, p. W202-W208, 2009.
- BARTLETT, M. E.; WHIPPLE, C. J. Protein change in plant evolution: tracing one thread connecting molecular and phenotypic diversity. **Frontiers in Plant Science**, v.4, 2013.
- BERGMILLER, T.; ACKERMANN, M.; SILANDER, O. K. Patterns of evolutionary conservation of essential genes correlate with their compensability. **PloS Genetics**, v.8, n.6, 2012.
- BUSANELLO, C.; VENSKE, E.; STAFEN, C. F.; PEDROLO, A. M.; LUZ, V. K.; PEDRON, T.; PANIZ, F. P.; BATISTA, B. L.; JUNIOR, A. M. M.; OLIVEIRA, A. C.; PEGORARO, C. Is the genetic variability of the Southern Brazilian elite rice becoming really exhausted?. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.20, p. e2626202, 2020.
- DADALTO, S. P. **Estudo da família de fatores de transcrição Whirly em soja**. 2016. 54 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2016.
- DESVEAUX, D.; SUBRAMANIAM, R.; DESPRÉS, C.; MESS, J.; LEVESQUE, C.; FOBERT, P. R.; DANGI, J. L.; BRISSON, N.; A “Whirly” transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. **Cell Press Journal**, v.6, p.229-240, 2004.
- DESVEAUX, D.; MARÉCHAL, A.; BRISSON, N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. **Trends Plant Science**. v.10, p.95-102, 2005.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v.7, n.1, p. 214, 2007.
- FAHAD, S.; BAJWA, A. A.; NAZIR, U.; ANJUM, S. A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A.; SADIA, S.; NASIM, W.; ADKINS, S.; SAUD, S.; IHSAN, M. Z.; ALHARBY, H.; ADKINS, S.; WU, C.; WNAG, D.; HUANG, J. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017
- FAIRHURST, T. H.; DOBERMANN, A. Rice in the global food supply. **Better Crops International**, v.16, 2002.
- FARIA, J. A. Q. A. **Caracterização funcional do fator de transcrição GmNAC6 de soja (*Glycine max*) e padrão de expressão de genes GmNACs em resposta a estímulos bióticos**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

- GAIKWAD, K. B.; SINGH, N.; KAUR, P.; RANI, SUSHMA, R.; BABU H, P.; SINGH, K. Deployment of wild relatives for genetic improvement in rice (*Oryza sativa*). **Plant Breeding**, v.140, p. 23-52, 2021.
- GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, p. 1-14, 2015.
- HEDDEN, P. The genes of the Green Revolution. **Trends in Genetics**, v.19, n.1, p.5-9, 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.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J. M.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. Plant genetic resources: What can they contribute toward increased crop productivity?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, n.11, p.5937-5943, 1999.
- HU, B.; JIN, J.; GUO, A. Y.; ZHANG, H.; LUO, J.; & GAO, G. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v.31, n8, p. 1296-1297, 2014.
- JANACK, B.; SOSOI, P.; KRUPINKA, K.; HUMBERT, K. *Knockdown of WHIRLY1 affects drought stress-induced leaf senescence and histone modifications of the senescence-associated gene HVS40*. **Plants (Basel)**, v.5, n.3, p.37, 2016.
- JO, B.S.; CHOI, S. S.; Introns: The functional benefits of introns in genomes. **Genomics and Informatics**, v.13, n.4, p. 112-118, 2015.
- KIMOTHU, R. N., BAILLO, E. H., ZHANG, Z. Transcription factors involved in abiotic stress responses in maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era. **PeerJ Preprints**, 2019.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, n.33, v. 7, p. 1870-1874, 2016.
- KYNDT, T., FERNANDEZ, D., GHEYSEN, G. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. **Annual Review of Phytopathology**, v.52, p.135-153, 2014.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, n.23, v.21, p. 2947-2848, 2007.
- LEMES, E. S.; MENEGHELLO, G. E.; OLIVEIRA, S.; MENDONÇA, A. O.; NEVES, E. N.; AUMONDE, T. Z. Salinidade na cultura do arroz irrigado: características agrônomicas e qualidade de sementes. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.4, 2018.
- MAMMANDOV, J.; BUYARAPU, R.; GUTTIKONDA, S. K.; PARLIAMENT, K.; ABDURAKHMONOV, I. Y.; KUMPATLA, S. P. Wild relatives of Maize, Rice, Cotton, and Soybean: Treasure troves for tolerance to biotic and abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, 2018.

- MANJUNATHA, B.; KRISHNAPPA, M. Genetic variability, blast reaction sudeis and identification of blast tolerant lines in elite genotypes of rice. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n. 3, p. 726-729, 2019.
- MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; SOARES, R. C.; BALDIGA, R. F.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, 2009.
- PENG, X. WU, Q.; TENG, J.; TANG, F.; PI, Z.; SHEN, S. Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. **BMC Plant Biology**, v.15, n.108, 2015.
- RAM, T.; MAJUMDER, N. D.; MISHRA, B.; ANSARI, M. M.; PADMAVATHI, G. Introgression of broad-spectrum blast resistance gene(s) into cultivated rice (*Oryza sativa* ssp *indica*) from wild rice *O. rufipogon*. **Current Science**, v.92, n.2, p. 225-230, 2007.
- SINGH, D., LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response : a tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 1-11, 2015.
- STANKE, M.; STEINKAMP, R.; WAACK, S.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. **Nucleic acids research**, v.32, p. W309-W312, 2004.
- VIANA, E. V.; BUSANELLO, C.; MAIA, L. C.; PEGORARO, C.; OLIVEIRA, A. C. Activation of rice WRKY transcription factors: an army of stress fighting soldiers?. **Current Opinion in Plant Biology**, v.45, p. 268-275, 2018.
- YAN, Y.; LIU, W.; WEI, Y.; SHI, H. MeCIPK23 interacts with Whirly transcription factors to activate abscisic acid biosynthesis and regulate drought resistance in cassava. **Plant Biotechnology Journal**, v.18, p. 1504-1506, 2020.
- ZHAO, C.; WANG, P.; SI, T.; HSU, CC.; WAN, L.; ZAYED, O.; YU, Z.; ZHU, Y.; DONG, J.; TAO, W. A.; ZHU, JK. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability. **Developmental Cell**, v.43, p. 618-629, 2017.
- ZHAO, S. Y.; WANG, G. D.; ZHAO, W. Y.; ZHANG, S.; KONG, F. Y.; DONG, X. C.; MENG, Q. W. Overexpression of tomato WHIRLY protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. **Biologia Plantarum**, v.62, n.1, 2018.
- ZHUANG, K.; GAO, Y.; LIU, Z.; DIAO, P.; SUI, N.; MENG, Q.; MENG, C.; KONG, F. WHIRLY 1 Regulates *HSP21.5A* expression to promote termotolerance in tomato. **Plant and Cell Physiology**, v.61, n.1, p169-177, 2020.

4. CAPÍTULO III

Caracterização funcional de genes *Whirly* em plântulas de arroz sob estresse por baixas temperaturas e salinidade

4.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento fundamental para a alimentação humana. Entretanto a produtividade é diminuída ou completamente prejudicada nos casos em que diferentes estresses abióticos são persistentes, pois as lavouras têm uma capacidade limitada de reagir devido à baixa variabilidade genética (revisado por FOGLIATTO et al., 2020).

No Rio Grande do Sul, a água utilizada para irrigação é proveniente de rios, córregos, lagos e lagoas, como a Laguna dos Patos. Quando a temperatura é elevada e há baixa pluviosidade, ocorre a redução do nível da Laguna, permitindo a entrada de água salgada do Oceano Atlântico, tornando-se um problema para a cultura (DENARDIN et al., 2018). Em arroz, o estresse por salinidade ocasiona a supressão da fotossíntese e crescimento, levando a perda de biomassa, assim como esterilidade parcial, resultando em redução da produtividade (revisado por QIN et al., 2020). A tolerância a salinidade depende do estágio de crescimento, tipo de órgão e genótipo. O estágio de plântula e reprodutivo são mais sensíveis a salinidade que o estágio vegetativo; e raízes são mais sensíveis do que outros órgãos (revisado por QIN et al., 2020).

Ademais, no Rio Grande do Sul é comum a ocorrência de baixas temperaturas, em períodos que coincidem principalmente com a germinação, estabelecimento (plântula) e no período reprodutivo. Com isso gera-se danos irreparáveis para a planta ocasionando uma diminuição do seu potencial produtivo (CRUZ et al., 2013). Em arroz, a incidência de baixas temperaturas durante os estádios iniciais pode reduzir a porcentagem e velocidade de germinação, prejudicar o estabelecimento e estande da lavoura e afetar o crescimento e desenvolvimento, podendo ocasionar maturação desigual. Quando ocorre no estágio reprodutivo, baixas temperaturas podem ocasionar perda de produtividade devido a esterilidade das espiguetas (STRECK et al., 2020).

Visto que esses estresses abióticos afetam a produtividade é necessário encontrar alternativas para mitigar esse problema. A utilização de genótipos

produtivos e tolerantes as intempéries é uma das estratégias mais promissoras. No entanto, o melhoramento para essas características é difícil, visto que a base genética/molecular dos mecanismos de tolerância a baixas temperaturas e salinidade é complexa, pois trata-se de caracteres quantitativos, controlados por muitos genes e que sofrem influência dos fatores ambientais (revisado por COLLINS et al., 2018).

Considerando que estresse por baixas temperaturas e salinidade tem um impacto negativo na produtividade do arroz e que a tolerância é controlada por vários genes, os grupos de pesquisa em melhoramento genético buscam estratégias diferentes para o avanço na descoberta de novas cultivares. O uso da Biotecnologia e suas ferramentas é uma opção para gerar avanços no melhoramento de plantas. Dentre essas ferramentas encontra-se o estudo do perfil transcricional, que proporciona identificar e caracterizar genes alvo que estão associados a caracteres de interesse agrônômico para posterior uso na obtenção de cultivares promissoras.

Para lidar com condições adversas as plantas dispõem de diferentes mecanismos de resposta ao estresse, como a percepção e transdução de sinais, induzindo a expressão de genes específicos que atuam na defesa. Fatores de transcrição (FTs) são reguladores da expressão gênica e desempenham papel crucial no desenvolvimento da planta, ciclo celular, sinalização celular e resposta a estresses. Os FTs modulam a expressão gênica através da ligação com elementos *cis* localizados no promotor ou outras regiões do gene alvo. Os FTs WRKY, MYB, NAC e AP2/ERF são reguladores cruciais de genes envolvidos na resposta a estresses (revisado por JAVED et al., 2020). Além disso, outros FTs, como Whirly que embora menos estudados, apresentam papel crítico na resposta a estresses (ZHAO et al., 2018).

Nos últimos anos foram desenvolvidos vários estudos relacionados com a família de fatores de transcrição Whirly, relacionando-os com a resposta ou tolerância a estresses abióticos e bióticos (DESVEAUX et al., 2005; PENG et al., 2015; DADALTO, 2016; JANACK et al., 2016; ZHAO et al. 2018; AKBUDAK e FILIZ, 2019; ZHUANG et al., 2020; YAN et al., 2020). Dentre as condições e espécies estudadas pode-se citar *Peronospora parasitica* em *Arabidopsis* e batata (DESVEAUX et al., 2005); baixa temperatura em amoreira (PENG et al., 2015); baixa temperatura em soja (DADALTO, 2016); seca em cevada (JANACK

et al., 2016); seca e *Pseudomonas solanacearum* em tabaco (ZHAO et al. 2018); seca e salinidade em tomateiro (AKBUDAK e FILIZ, 2019); tolerância ao calor em tomate (ZHUANG et al., 2020) e seca em mandioca (YAN et al., 2020) No entanto, a relação desses FTs com estresse por baixas temperaturas e salinidade em arroz ainda não foi estudada. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo analisar o perfil transcricional dos FTs Whirly em plântulas de arroz sob condição de baixas temperaturas e salinidade, assim como investigar a regulação transcricional desses genes.

4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Para a realização deste estudo foram utilizadas sementes de dois genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) com resposta contrastante aos estresses por salinidade e baixas temperaturas, sendo o genótipo BRS Pampa (subespécie *indica* – sensível) e o genótipo BRS Bojuru (subespécie *japonica* – tolerante) (VIGHI, 2016).

As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5%, e logo depois enxaguadas com água estéril. Posteriormente foram germinadas em modo rolo com papel *germitest* umedecido (água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel), em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias em câmara de germinação (B.O.D.) com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e umidade relativa de 100%. Passado esse período, as plântulas foram transferidas para recipientes com capacidade de 700 mL, contendo solução nutritiva (YOSHIDA et al., 1976) composta de: $0,031 \text{ g L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $7,7 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $91,4 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $40,3 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $71,4 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$, $88,6 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $324,0 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,074 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,934 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0,035 \text{ g L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, e $11,9 \text{ g L}^{-1}$ de ácido cítrico monoidratado, em pH $5,0 \pm 0,1$. Os recipientes foram reabastecidos sempre que necessário com solução nutritiva para manter o nível máximo (Figura 10A).

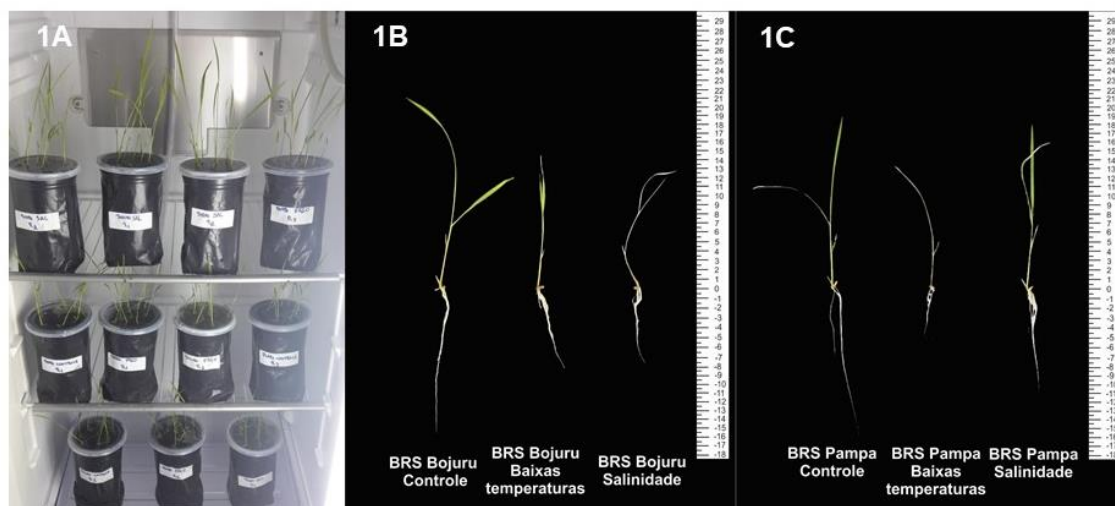


Figura 10. Imagem do experimento. (A) Recipientes de 700 mL contendo solução nutritiva com as plântulas de arroz com volume máximo mantido com solução nutritiva, (B) Plântulas da cultivar BRS Bojuru nas condições controle, baixas temperaturas e salinidade, (C) Plântulas de arroz da cultivar BRS Pampa nas condições de controle, baixas temperaturas e salinidade. CGF/FAEM/UFPel 2021.

Para o estresse salino, a solução nutritiva foi acrescida de 40 mM (2,34 g/L) de NaCl (KHAN et al. 1997). As plântulas foram mantidas nessa condição, em $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) durante 7 dias. Após esse período foram realizadas as análises morfológicas e as coletas de material vegetal das cultivares BRS Pampa e BRS Bojuru (Figura 10B e 10C). Para o estresse por baixas temperaturas, as plântulas das duas cultivares acondicionadas em recipientes contendo solução nutritiva padrão foram submetidas à temperatura de 13°C (CRUZ e MILACH, 1999), com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) durante 7 dias e posteriormente avaliadas e coletadas (Figura 10B e 10C). Para a condição controle, as plântulas acondicionadas em recipientes contendo solução nutritiva padrão foram mantidas à temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) durante 7 dias (Figura 10B e 10C), seguido de análise e coleta. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando três repetições biológicas, sendo cada repetição composta por 5 plântulas.

4.2.1 Caracterização morfológica

Após o período estabelecido para a simulação de estresse salino e por baixas temperaturas, 5 plântulas de cada repetição foram avaliadas quanto ao comprimento de parte aérea (C_PA), comprimento de raiz (C_R), peso seco de

parte aérea (PS_PA) e peso seco de raiz (PS_R). As medidas de comprimento (C_PA e C_R) foram obtidas com régua graduada e os valores estimados em centímetros. Para obter os valores de peso seco (PS_PA e PS_R) foi feita a separação das plantas em sistema radicular e parte aérea, acondicionando os tecidos em sacos de papel devidamente identificados. Em seguida, os sacos foram colocados para secar em estufa de ventilação forçada com temperatura 60°C até atingir peso seco constante. Após, foi realizada a avaliação do peso seco em balança analítica com precisão de três casas decimais, e os valores expressos em miligramas (COLMER et al., 2006).

Levando em consideração que as cultivares estudadas apresentam características intrínsecas de desenvolvimento, para a avaliação do efeito dos estresses por baixas temperaturas e salinidade nas características fenotípicas, foi calculado o desempenho relativo (DR), a partir da equação: $DR = (\text{Valor observado da variável na condição estresse} / \text{Valor observado da variável na condição controle}) * 100$.

Para as análises estatísticas, os dados de desempenho relativo foram submetidos a análise de variância, utilizando o programa Genes (CRUZ, 2001).

4.2.2 Extração de RNA total

Para cada tratamento a raiz e a parte aérea das plântulas foram coletadas separadamente, envolvidas em papel alumínio e, imediatamente foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80 °C até a etapa de extração de RNA.

Inicialmente, para se evitar ação de enzimas que degradem o RNA, foi realizado um tratamento das vidrarias necessárias, tais como cadinhos, pistilos, etc., utilizando temperatura e pressão específicas. A extração do RNA se deu das raízes e da parte aérea, sendo realizado em triplicata biológica para cada genótipo e para cada tratamento. Com a utilização de N₂ líquido as amostras foram maceradas separadamente, transferidas para microtubos de 1,5mL com 1mL de reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). A mistura foi homogeneizada em vortex e permaneceu por 10 minutos em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA). Posteriormente, o sobrenadante foi

realocado em um novo tubo de 1,5 mL acrescido de 200 µL de clorofórmio gelado para que haja a solubilização de lipídeos. Durante 15 segundos os tubos foram invertidos manualmente e posteriormente incubados à temperatura ambiente durante 7 minutos, foi realizada outra centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A precipitação do RNA na fase aquosa foi realizada através da adição, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, de ½ volume de isopropanol e ½ de citrato de Na 0,5M + NaCl 1,2M (estes já armazenados a 4°C), e novamente centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% a 4°C e centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O RNA precipitado ficou em temperatura ambiente até a eliminação do excesso de etanol. Para finalizar, o mesmo foi ressuspensionado em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, GIBCO BRL).

A quantidade, pureza e a integridade do RNA total que foi extraído foram mensuradas através de análises de absorbância (260/280nm; 260/230nm) e eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 2001).

4.2.3 Síntese de cDNA

Inicialmente, 2µg de RNA total (volume de RNA total calculado previamente e separado em tubo livre de RNases) de cada amostra foi tratado com *DNaseI* (Invitrogen™) para remoção de possível contaminação com DNA genômico. Posteriormente, o cDNA foi obtido utilizando o kit *SuperScript™III First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™) e oligo(dT). A qualidade dos cDNAs foi avaliada através de uma reação em RT-qPCR utilizando iniciadores para o gene *18S*.

4.2.4 Desenho de iniciadores para RT-qPCR

As sequências codificadoras dos genes *Whirly* foram obtidas no banco de dados RAP-DB (Rice Annotation Project Database - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). O desenho dos iniciadores correspondentes aos genes *Whirly 2* e *Whirly 6* (Tabela 3) para análise de expressão em RT-qPCR foi realizado através do programa *Primer 3 plus®* (UNTERGASSER et al., 2007). Foi atendido os seguintes parâmetros exigidos pela empresa Applied Biosystems®:

formação de um amplicon de tamanho variando entre 50 e 150 pb, com conteúdo de CG entre 40% e 60% e temperatura de anelamento variando entre 60 e 65°C.

Tabela 3. Informações referentes aos iniciadores utilizados nas análises de expressão dos genes *Whirly* em RT-qPCR. CGF/FAEM/UFPeI, 2021.

Gene	ID	Sequência F 5'→3'	Sequência R 5'→3'	T °C	Eficiência	Score	Referência
<i>Whirly2</i>	Os02g0158400	ACACCGTGTTCAAGGGAAAAG	TTGGCAGTATGGGTTGCATA	60	149	-	-
<i>Whirly6</i>	Os06g0145800	CAGAATGGGAGGGTGTCTC	CAACCTTGTAAGCCCCAGAA	60	112	-	-
<i>18S</i>	AK059783	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	ACACTTCACCGGACCATTCAA	60	120	1.3	Jain et al. 2006
<i>EF1-α</i>	Os03g0177500	TGGTATGGTGGTGACCTTTG	GTACCCACGCTTCAGATCCT	60	110	1.4	Jain et al. 2006
<i>UBQ</i>	At4g05320	CTGTTCACGGAACCCAATTC	GGAAAAAGGTCTGACCGACA	60	107	1.2	-

4.2.5 Validação dos iniciadores

A validação e a eficiência de amplificação para cada par de iniciadores dos genes estudados e para os genes normalizadores foram obtidas a partir de diluições de um mix das amostras de cDNA (1:1; 1:5; 1:25; 1:125). Também foram geradas curvas de dissociação, onde os genes estudados apresentaram apenas um pico na curva de dissociação, sendo então específicos.

A eficiência de cada conjunto de iniciadores para utilizar em reações de RT-qPCR foi dada pelo equipamento ao final do procedimento de validação.

4.2.6 Expressão gênica em tempo real

Para quantificação em tempo real foi utilizado 1,5 µl de MgCl (50 mM), 2,0 µl de Buffer, 3,0 µl de SYBR Green [solução estoque (1:100 em DMSO) diluída na proporção de 1 µl de SYBR em 99µl de água, 0,25µl de Rox, 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µl de cDNA (diluído com base nos resultados das análises de validação – 1:5), 0,05 µl de Taq Platinum e 11,0 µl de água para completar o volume final de 20µl. As amostras foram acondicionadas em placas (96 Well Optic Plates - Applied Biosystems®) e cobertas com adesivo óptico (Optic Adhesives - Applied Biosystems®).

As reações foram realizadas no termociclador *ABI PRISM 7500 Fast* (Applied Biosystems®). Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: Desnaturação inicial (95°C, durante 10 minutos); 40 ciclos (Desnaturação 95°C, durante 15 segundos; Anelamento, 61°C, durante 1 minuto), seguido de curva de dissociação (*melt*).

Os dados de expressão dos genes normalizadores foram submetidos a análise de estabilidade no programa DataAssist™ v3.0 Software (Applied biosystems). Os genes *18S*, *ef1-α* e *UBQ* mostraram valores de *score* abaixo de 1.5 (Tabela 3), sendo utilizados para normalizar os dados de expressão dos genes *Whirly*.

A quantificação relativa de cada gene foi feita utilizando o método do Ct comparativo ($\Delta\Delta C_t$), como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

4.2.7 Regulação da expressão gênica

Para análise da regulação da expressão gênica foi feita amplificação, sequenciamento e análise de ERACs nos promotores dos genes *Whirly2* e *Whirly6*, nos dois genótipos de arroz estudados (BRS Pampa e BRS Bojuru). O perfil de ERACs foi relacionado com a expressão gênica em cada genótipo.

A sequência correspondente a região promotora (2 Kb) foi obtida no banco de dados RAP-DB. Para amplificação de cada promotor (1 Kb), foram utilizados dois pares de iniciadores sobrepostos (Tabela 4), para contemplar a região perdida durante o sequenciamento.

A extração de DNA das plantas de ambos genótipos foi realizada a partir de tecidos foliares, utilizando o protocolo de extração CTAB modificado (DOYLE e DOYLE, 1987). A qualidade, integridade e quantificação do DNA foram verificadas em gel de agarose 1% e análise de absorvância (260/280nm).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 50ng de DNA, 0,2 µL de Platinum SuperFi DNA Polymerase II (2 U/µL) (Invitrogen), 1 µL de cada primer (10µM), 0,5 µL de dNTP (5 mM), 4 µM de 5X SuperFi Buffer e água suficiente para completar o volume final da reação.

O programa da amplificação foi constituído de um ciclo inicial de desnaturação a 98°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 98°C por 10 segundos; 60 °C por 30 segundos (exceto para um dos iniciadores, que foi utilizado 54°C), 72°C por 1 minuto, com um ciclo final a 72°C por 5 minutos. A amplificação e o tamanho dos produtos foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com Gel Red. Os produtos da amplificação, de cada genótipo e iniciadores específicos, foram enviados em triplicatas para purificação, quantificação e posterior sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA.

Tabela 4. Informações referentes aos iniciadores utilizados para amplificação dos promotores dos genes *Whirly*.

Promotor	Sequência F 5'→3'	Sequência R 5'→3'	Tamanho <i>amplicon</i>	Temperatura °C
p(1) <i>Whirly2</i>	CCGCGAAACTGAAAAATTCTTG	CACCGTCGATTGCACAAGGC	1130	60
p(2) <i>Whirly2</i>	ATGTTGGATGTGTGTAGGT	CTCACTATTACTCCCTCTACC	1221	60
p(1) <i>Whirly6</i>	AAAGAAAGGTTTCATCACCTATC	TAGATGCTGTACGTAGAGAA	1164	54
p(2) <i>Whirly6</i>	CGAGTGAAATTTCCGTATTGC	CGGAATTGCCACTTACTTGA	1260	60

As sequências obtidas foram montadas usando um programa para edição e alinhamento das sequências provenientes da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. O programa é de fácil manuseio, onde inicialmente as sequências são anexadas, dá-se o comando para gerar um contig e então deve-se atentar para falhas/erros no alinhamento, deve-se realizar o reparo e seguir para a análise de elementos *cis*.

A análise de ERACs foi feita utilizando o banco *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (PLACE) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (HIGO et al., 1999).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Avaliação morfológica de plântulas de arroz sob condição de estresse por baixas temperaturas e salinidade

Os resultados apresentados pela análise de variância (Tabelas 5 e 6) não evidenciaram diferenças significativas, a 5% de probabilidade de erro pelo teste F, entre os genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru, para todos os caracteres avaliados (C_PA, C_R, PS_PA e PS_R) nos diferentes estresses.

Tabela 5. Resumo da análise de variância para o desempenho relativo (DR) dos caracteres comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco de raiz (PSR), dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos ao estresse por baixas temperaturas.

FV	GL	Quadrado Médio			
		CPA	CR	PSPA	PSR
Genótipos	1	74,7076 ^{ns}	651,3459 ^{ns}	145,9946 ^{ns}	52,9126 ^{ns}
Resíduo	4	57,6162	389,4036	183,5578	293,493
Média geral	-	61,0182	79,7334	63,6839	85,9034
CV (%)	-	12,4397	24,7491	21,2743	19,9429

ns: Valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. FV=Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV (%): Coeficiente de Variação.

Esses resultados podem estar relacionados ao curto período de tempo no qual as plantas foram submetidas ao estresse ou a temperatura/dose pode não ter sido adequada para discriminar fenotipicamente os genótipos sensíveis e tolerantes aos estresses. Pesquisas anteriores indicam que a cultivar BRS Bojuru se mostra tolerante 13 dias após a adição de NaCl na água em diversas

concentrações, e de 42 a 48 dias após a adição de NaCl na água de irrigação em concentração de 0,75% da solução, a cultivar passa ser considerada moderadamente tolerante (LEVANDOSKI et al., 2013). Esse estudo sugere que para as cultivares utilizadas neste estudo se diferenciarem quanto a plantas sensíveis e tolerantes seria necessário um tempo maior de exposição aos estresses.

Diferentemente da resposta fenotípica, a resposta molecular ocorre imediatamente após a percepção do estresse pela planta, sendo os primeiros genes ativados aqueles envolvidos na sinalização, como é o caso de fatores de transcrição. Por isso, neste estudo a análise de expressão dos genes codificadores dos fatores de transcrição *Whirly* foi feita nos primeiros dias de estresse.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para o desempenho relativo (DR) dos caracteres comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco de raiz (PSR), dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos ao estresse por salinidade..

FV	GL	Quadrado Médio			
		CPA	CR	PSPA	PSR
Genótipos	1	7,6328 ^{ns}	39,2495 ^{ns}	44,3621 ^{ns}	13,5204 ^{ns}
Resíduo	4	355,6343	25,2643	401,5117	462,911
Média geral	-	75,7647	68,9033	97,4816	77,1893
CV (%)	-	24,8905	7,2947	20,5554	27,8734

ns: Valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro. FV= Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV (%): Coeficiente de Variação.

4.3.2 Expressão gênica

O estresse por salinidade ocasionou o aumento da expressão do gene *Whirly2* na parte aérea de plântulas de arroz da cultivar tolerante (BRS Bojuru). Já na cultivar sensível à salinidade (BRS Pampa), a expressão de *Whirly2* na parte aérea de plântulas submetidas ao estresse foi similar à condição controle (Figura 11). Quando se considera raízes, verifica-se que a expressão de *Whirly2* foi reprimida na cultivar BRS Pampa, e por outro lado, não foi alterada na cultivar BRS Bojuru. Estudos realizados por Zhao et al., (2018) relacionam o aumento da expressão do gene *SIWHY2* com o ganho de tolerância a estresse por déficit hídrico em tabaco. Considerando que a cascata de sinalização frente aos

estresses por déficit hídrico e salinidade são similares, e a maior e/ou manutenção da expressão do gene *Whirly2* na cultivar BRS Bojuru, acredita-se que esse gene pode estar envolvido no mecanismo de tolerância frente ao estresse por salinidade.

A expressão do gene *Whirly6* foi induzida tanto na parte aérea quanto na raiz de plântulas da cultivar BRS Bojuru sob estresse por salinidade (Figura 11). Entretanto, na cultivar BRS Pampa, a expressão de *Whirly6*, tanto na parte aérea quanto na raiz, foi similar na condição de estresse e na condição controle. O aumento da expressão de genes *Whirly* sob déficit hídrico e associação com tolerância a esse estresse também tem sido verificada em mandioca (YAN et al., 2020). Nesse estudo, os autores sugerem a interação de *Whirly* com *CIPK23* na ativação da síntese de ácido abscísico para regular a tolerância à seca. Dessa forma, o aumento de expressão de *Whirly6* sob condição de salinidade sugere sua participação no mecanismo de tolerância a esse estresse em arroz.

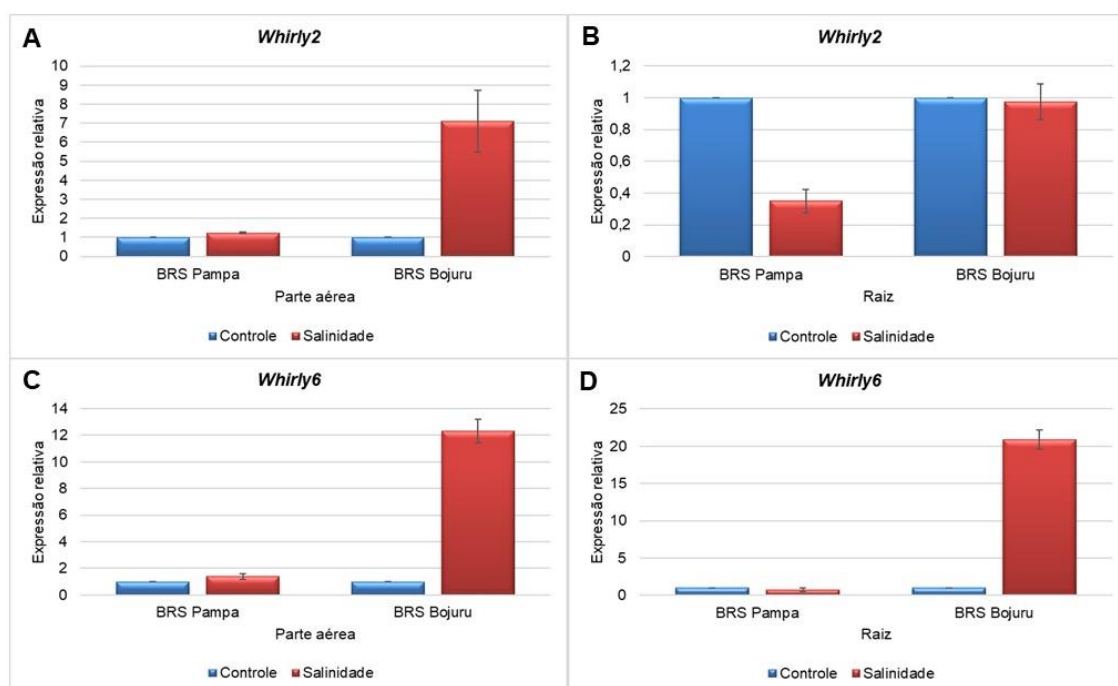


Figura 11. Quantificação da expressão relativa dos genes *Whirly2* e *Whirly6* nos tecidos da parte aérea e da raiz de plântulas dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos a salinidade (NaCl 40 mM) por 7 dias. As barras representam os valores de erro padrão para a média de três replicatas.

O estresse por baixas temperaturas ocasionou o aumento da expressão do gene *Whirly2* na parte aérea de ambas as cultivares, sendo esse aumento mais pronunciado na cultivar BRS Bojuru. No entanto, na raiz, o estresse ocasionou um pequeno aumento de expressão de *Whirly2* na BRS Pampa e uma

redução na cultivar BRS Bojuru (Figura 12). O perfil de expressão observado não demonstra com clareza o envolvimento do gene *Whirly2* na tolerância a baixas temperaturas, mas evidencia sua participação na resposta ao estresse, já que sua expressão é alterada em relação ao controle. Em estudo desenvolvido por Dadalto (2016), o autor verificou que em soja, a expressão do gene *Whirly1a* foi reduzida na condição de baixas temperaturas. Esses resultados reforçam a hipótese de participação dos genes *Whirly* em resposta ao estresse ocasionado por baixas temperaturas.

Um leve aumento de expressão do gene *Whirly6* na parte aérea das duas cultivares analisadas foi verificado na condição de baixas temperaturas. Porém, na raiz, a condição estressante ocasionou o aumento da expressão do gene *Whirly6* apenas na cultivar BRS Bojuru (Figura 12). Esse comportamento sugere o envolvimento de *Whirly6* na sinalização para a tolerância a baixas temperaturas. Em amoreira foi observada a indução de um gene *Whirly* e a repressão de outro gene *Whirly* em condição de baixas temperaturas (PENG et al., 2015), similar ao que foi encontrado no presente estudo. Entretanto, em amendoim sob condição de baixas temperaturas foi verificado que genes *Whirly* não foram diferencialmente expressos quando se compara cultivar sensível e tolerante (JIANG et al., 2020). Esses resultados demonstram que genes *Whirly* não possuem resposta transcricional conservada entre diferentes espécies, e podem atuar de forma diferente na resposta a baixas temperaturas.

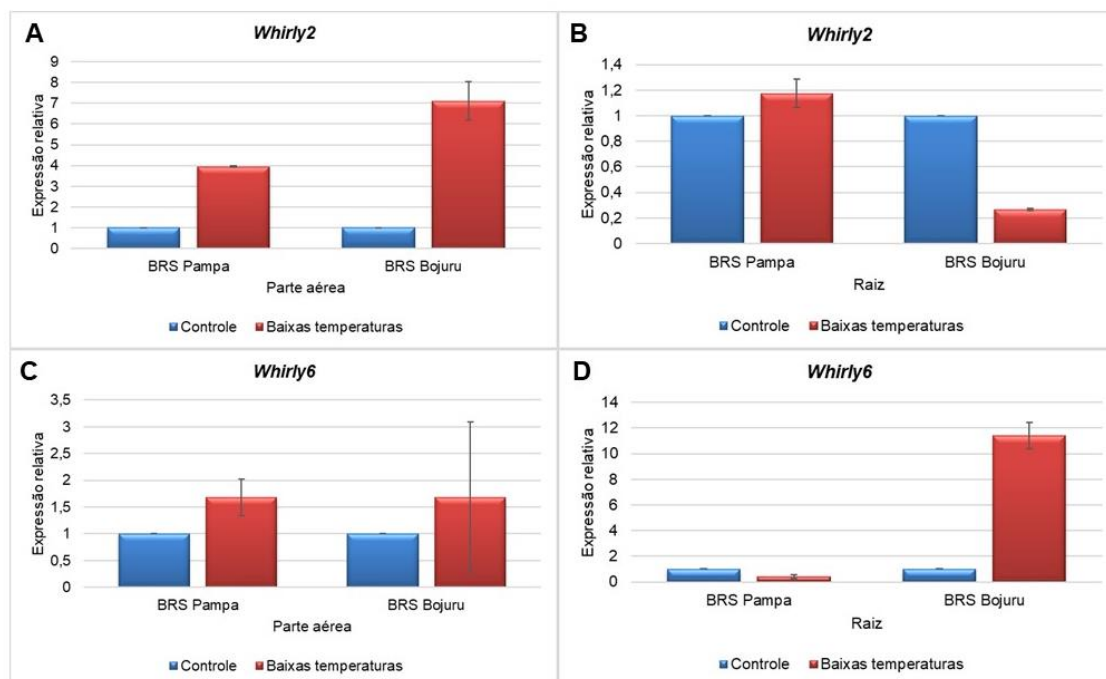


Figura 12. Quantificação da expressão relativa dos genes *Whirly2* e *Whirly6* nos tecidos da parte aérea e da raiz de plântulas de arroz dos genótipos BRS Pampa e BRS Bojuru submetidos a baixas temperaturas (13°C) por 7 dias. As barras representam os valores de erro padrão para a média de três replicatas.

4.3.3 Presença de ERACs na região promotora de genes *Whirly* em genótipos de arroz tolerante e sensível a salinidade e baixas temperaturas

Neste estudo foram encontrados 114 ERACs na região promotora dos genes *Whirly2* e *Whirly6* nas cultivares BRS Pampa (sensível) e BRS Bojuru (tolerante) (Apêndice B). Quando se compara as cultivares sensível e tolerante, verifica-se que os promotores de ambos os genes diferem quanto ao número e especificidade de ERACs (Apêndice B), indicando o reconhecimento/ativação por fatores de transcrição distintos, o que pode explicar a variação no acúmulo de transcritos desses genes (Figuras 11 e 12).

O processo de adaptação a estresses por baixas temperaturas, salinidade, seca e fermentos é controlado principalmente por ácido abscísico (ABA), que atua como um mensageiro endógeno na regulação do estado da água na planta (TUTEJA, 2007). Por isso, foram selecionados os ERACs alvos dos principais FTs que atuam na sinalização dependente de ABA, e ERACs alvos da principal família de FT que atua de modo independente de ABA (Figura 13).

Sinalização	FTs	ERACs	Pampa <i>Whirly2</i>	Bojuru <i>Whirly2</i>	Pampa <i>Whirly6</i>	Bojuru <i>Whirly6</i>
ABA Independente	DREB/CBF	CBFHV	0	0	1	1
		DRECOREZMRAB17	0	1	0	0
		DRECRTCOREAT	0	0	1	1
		LTRECOREATCOR15	1	0	3	3
ABA Dependente	AREB/ABF	ABRERATCAL	0	1	0	0
		DPBFCOREDCDC3	0	0	1	3
	MYB	TATCCAOSAMY	0	0	1	1
		EECCRCAH1	0	1	1	2
		MYB1AT	0	0	1	2
		MYB2CONSENSUSAT	1	1	1	2
		MYBCORE	2	3	1	4
		MYBCOREATCYCB1	3	3	1	2
		MYBST1	0	0	1	3
	MYC	MYCATERD1	0	0	1	1
		MYCATRD22	0	0	1	1
		MYCONSENSUSAT	3	6	1	6
	WRKY	WBOXPCWRKY1	2	4	1	0
		WBOXATNPR1	7	9	1	4
		WBOXHVIS01	3	3	1	4
		WBOXNTCHN48	0	1	1	2
		WBOXNTERF3	5	8	1	6
		WRKY71OS	8	12	1	9
		ELRECOREPCR1	2	4	1	0

Figura 13. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores (1000pb) dos genes *Whirly*, alvos de fatores de transcrição (FTs) sinalizados via dependente e independente de ácido abscísico (ABA) nas cultivares BRS Pampa e BRS Bojuru.

A participação dos FTs DREB/CBF (proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação/fator de ligação à repetição C) é determinante na resposta a baixas temperaturas e salinidade. Sendo que, os genes *DREB1* são fortemente induzidos em baixas temperaturas, enquanto os genes *DREB2* são induzidos por salinidade e seca; e a superexpressão desses genes leva a tolerância ao congelamento, salinidade e seca (LATA e PRASAD, 2011). Os promotores (1000 pb) do gene *Whirly2* apresentam apenas um ERAC alvo de FTs DREB, que é específico para cada cultivar, enquanto que os promotores de *Whirly6* apresentam três ERACs alvos de FTs DREB, que são conservados em número e tipo nas duas cultivares (Figura 13).

Os FTs AREB/ABFs (proteína de ligação a ABRE/fator de ligação a ABRE) e outros FTs bZIP responsivos a estresses são considerados componentes essenciais na sinalização da resposta a estresse e tolerância nas plantas (YOON et al., 2020). Apenas o promotor do gene *Whirly2* da cultivar BRS Bojuru apresentou um ERAC alvo de AREB/ABF, enquanto que os promotores de *Whirly6* apresentaram outro tipo de ERAC alvo de AREB/ABF, com ocorrência em ambas as cultivares, sendo uma cópia a mais na BRS Bojuru (Figura 13).

A adaptação ao estresse pela sinalização dependente de ABA apresenta o envolvimento dos FTs MYB e MYC (ROY, 2016). ERACs alvos de MYB e MYC foram mais comuns nos promotores de *Whirly6*, com número de ocorrências variável entre as cultivares (Figura 13). Essa variação no número de ERACs pode ser responsável pela regulação da expressão dos genes *Whirly*, o que justifica a diferença de expressão entre a cultivar sensível e tolerante.

Estresses abióticos como seca, radiação, salinidade e baixas temperaturas induzem a atividade de vários FTs WRKY, que atuam de forma sincronizada para promover a tolerância a estresses através da reprogramação transcricional e controle das cascatas de sinalização (BANERJEE e ROYCHOUDHURY, 2015). Os promotores dos genes *Whirly* apresentam diferentes ERACs (W-box) alvos de WRKY, que variam quanto ao número entre as cultivares, sendo que, de maneira geral, o maior número de W-Box ocorre na cultivar tolerante (Figura 13). A presença desses ERACs indica que os genes *Whirly* são regulados por WRKY, fazendo parte da sinalização em resposta a estresses por salinidade e baixas temperaturas em arroz.

4.4 Conclusão

Genes *Whirly2* e *Whirly6* apresentam alteração de expressão na parte aérea e raiz de plântulas de arroz sob condições de salinidade e baixas temperaturas, com resposta diferencial entre as cultivares sensível e tolerante. Essa diferença de expressão pode ser explicada pela variação no tipo e número de ocorrências de elementos de ação *cis* na região promotora dos genes *Whirly* entre as cultivares.

Referências Bibliográficas

AKBUDAK, M. A.; FILIZ, E. Whirly (Why) transcription factors in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): genome-wide identification and transcriptional profiling under drought and salt stresses. **Molecular Biology Reports**, 46, n.4, p.4139-4150, 2019.

BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. WRKY proteins: Signal and regulation of expression during abiotic stress responses. **Scientific World Journal**, v.2015, p. 807560, 2015.

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

COLMER, T. D.; COX, M. C. H.; VOESENEK, A. C. J. Root aeration in rice (*Oryza sativa*): evaluation of oxygen, carbon dioxide, and ethylene as possible regulators of root acclimatizations. **New Phytologist**, v.170, p: 767 – 778, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.

CRUZ, R.; SPEROTTO, R. A.; CARGNELUTTI, D.; ADAMSKI, J. M.; TERRA, T. F.; FETT, J. P. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. **Food and Energy Security**, v.2, n.2, p.96-119, 2013.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Avaliação de genótipos de arroz quanto à tolerância ao frio na germinação. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, **Resumos** (...) Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p.42-44, 1999.

DADALTO, S. P. **Estudo da família de fatores de transcrição Whirly em soja**. 2016. 54 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2016.

DENARDIN, L. G. O.; CARMONA, F. C.; TIECHER, T.; MARTINS, A. P.; ALVES, L. A.; WEBER, E. J.; ANGHINONI. Salt-affected soils of the coastal plains in Rio Grande do Sul, Brazil. **Geoderma Regional**. 7f, 2018.

DESVEAUX, D.; MARÉCHAL, A.; BRISSON, N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. **Trends Plant Science**. v.10, p.95-102, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

FOGLIATTO, S.; FERRERO, A.; VIDOTTO, F. How can weedy rice stand against abiotic stresses? A review. **Agronomy**, v.10, n.9, 1284, 2020.

JAVED, T.; SHABBIR, R.; ALI, A.; AFZAL, I.; ZAHEER, U.; GAO, S-J. Transcription factors in plant stress responses: Challenges and potential for sugarcane improvement. **Plants (Basel)**, v.9, n.4, p.491, 2020.

JANACK, B.; SOSOI, P.; KRUPINKA, K.; HUMBERT, K. *Knockdown* of WHIRLY1 affects drought stress-induced leaf senescence and histone modifications of the senescence-associated gene HVS40. **Plants (Basel)**, v.5, n.3, p.37, 2016.

JIANG, C.; ZHANG, H.; REN, J.; DONG, J.; ZHAO, X.; WANG, X.; WANG, J.; ZHONG, C.; ZHAO, S.; LIU, X.; GAO, S.; YU, H.; Comparative transcriptome-based mining and expression profiling of transcription factors related to cold tolerance in Peanut. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v.21, p. 1921, 2020.

KHAN, M. S. A.; HAMID, A.; KARIM, M. A. Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 179, p. 163-169, 1997.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, v.62, n.14, p. 4731-4748, 2011.

LEVANDOSKI, A. P., FARIAS, M. de O., SILVEIRA, A. D., SCIVITTARO, W. B. Caracterização de genótipos de arroz irrigado quanto à tolerância a salinidade na fase vegetativa. **XXI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, 2014.

LIVAK K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. **Methods**, v25, p. 402-408, 2001.

PENG, X. WU, Q.; TENG, J.; TANG, F.; PI, Z.; SHEN, S. Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. **BMC Plant Biology**, v.15, n.108, 2015.

QIN, H.; LI, Y.; HUANG, R. Advances and challenges in the breeding of salt-tolerance rice. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.21, p.8385, 2020.

ROI, S. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. **Plan Signaling Behavior**, v.11, n.1, p. e1117723, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 2001.

STRECK, E. A.; AGUIAR, G. A.; SILVA, P. U.; FRONZA, R. T. L.; JÚNIOR, A. M. de M. Genetic tolerance to low temperatures in irrigated rice. **Revista Ciência Agronômica**, v.51, n.3, e20196938, 2020.

TUTEJA, N.; Absciscic acid and abiotic stress signaling. **Plant Signal Behavior**, v.2, n.3, p. 135-138, 2007.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.2, p.W71-W74, 2007.

VIANA, V. E. **Expressão de genes WRKY e alterações morfológicas em arroz sob estresse por submersão**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2014.

VIGHI, I. L. **Estresses abióticos em arroz: respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

YAN, Y.; LIU, W.; WEI, Y.; SHI, H. MeCIPK23 interacts with Whirly transcription factors to activate abscisic acid biosynthesis and regulate drought resistance in cassava. **Plant Biotechnology Journal**, v.18, p. 1504-1506, 2020.

YOON, Y.; SEO, H. S.; SHIN, H.; KIM, H. J.; KIM, C. M.; JANG, G. The role of stress-responsive transcription factors in modulationg abiotic stress tolerance in plants. **Agronomy**, v.10, n.788, 2020.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. Los Banos: IRRI, 1976.

ZHAO, S. Y.; WANG, G. D.; ZHAO, W. Y.; ZHANG, S.; KONG, F. Y.; DONG, X. C.; MENG, Q. W. Overexpression of tomato WHIRLY protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. **Biologia Plantarum**, v.62, n.1, 2018.

ZHUANG, K.; GAO, Y.; LIU, Z.; DIAO, P.; SUI, N.; MENG, Q.; MENG, C.; KONG, F. WHIRLY 1 Regulates *HSP21.5A* expression to promote termotolerance in tomato. **Plant and Cell Physiology**, v.61, n.1, p169-177, 2020

Apêndices

Apêndice A. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores preditos dos genes *Whirly* nas espécies do gênero *Oryza*.

ERACs	OsJAPWhy2	OsJAPWhy6	OsINDWhy2	OsINDWhy6	OsRUFWhy2	OsRUFWhy6	OsPUNWhy2	OsPUNWhy6	OsNIVWhy2	OsNIVWhy6
-10PEHVPSBD	0	2	0	1	0	2	0	0	1	2
2SSEEDPROTBANAPA	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
-300CORE	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
-300ELEMENT	2	1	3	0	3	1	3	0	1	0
-300MOTIFZMZEIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AACACOREOSGLUB1	0	0	3	0	3	0	2	1	1	0
ABRELATERD1	2	0	2	0	2	0	4	0	2	0
ABREOSRAB21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ABRERATCAL	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0
ACGTABOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACGTABREMOTIFA2OSEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACGTATERD1	12	2	14	2	14	2	12	2	12	2
ACGTCBOX	0	2	0	2	0	2	0	0	0	2
ACGTOSGLUB1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
ACGTTBOX	0	0	2	0	2	0	2	0	2	0
AMMORESIIUDCRNIA1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
AMYBOX1	0	2	1	1	1	1	1	0	0	1
AMYBOX2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
ANAERO1CONSENSUS	0	0	1	0	6	1	2	0	1	0
ANAERO2CONSENSUS	4	0	2	0	0	0	0	0	1	0
ANAERO3CONSENSUS	0	1	2	1	0	1	2	1	2	0
ANAERO4CONSENSUS	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
ARFAT	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
ARR1AT	13	17	14	21	14	17	17	15	14	16
ASF1MOTIFCAMV	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AUXREPSIAA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BIHD1OS	8	4	7	1	8	4	4	2	7	3
BOXIINTPATPB	1	1	0	0	0	0	2	1	1	0
BOXLCOREDCPAL	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

ERACs	OsJAPWhy2	OsJAPWhy6	OsINDWhy2	OsINDWhy6	OsRUFWhy2	OsRUFWhy6	OsPUNWhy2	OsPUNWhy6	OsNIVWhy2	OsNIVWhy6
BP5OSWX	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BS1EGCCR	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
CAATBOX1	14	13	14	13	14	14	14	11	16	11
CACGCAATGMGH3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
CACGTGMOTIF	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
CANBNNAPA	0	2	1	1	1	2	1	2	0	1
CAREOSREP1	4	2	2	1	2	2	1	3	4	1
CARGATCONSENSUS	0	2	2	2	0	2	1	0	0	2
CARGCW8GAT	2	1	4	0	4	1	0	2	2	0
CARGNCAT	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
CBFHV	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1
CCA1ATLHCB1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
CCAATBOX1	4	2	4	4	4	2	2	3	5	2
CEREGLUBOX2PSLEGA	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
CGACGOSAMY3	3	1	3	2	3	1	2	0	3	1
CGCGBOXAT	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
CIACADIANLELHC	1	0	2	1	1	1	1	2	1	0
CMSRE1BSPOA	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CPBCSPOR	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
CRTDREHVCBF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CURECORECR	12	6	12	3	12	4	8	4	8	6
DOFCOREZM	24	12	22	17	20	12	19	14	23	14
DPBFCOREDCDC3	3	2	2	3	2	3	5	2	2	4
DRE2COREZMRAB17	1	0	2	0	2	0	1	0	1	0
DRECRTCOREAT	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1
E2FCONSENSUS	0	3	0	1	0	3	1	1	0	2
EBOXBNNAPA	16	6	14	8	14	7	16	4	16	14
EECCRCAH1	1	3	1	4	1	3	2	4	1	3
ELRECOREPCRP1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
GARE1OSREP1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
GAREAT	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0

ERACs	OsJAPWhy2	OsJAPWhy6	OsINDWhy2	OsINDWhy6	OsRUFWhy2	OsRUFWhy6	OsPUNWhy2	OsPUNWhy6	OsNIVWhy2	OsNIVWhy6
GATABOX	11	14	8	17	8	15	6	13	12	16
GCCORE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GCN4OSGLUB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GT1CONSENSUS	9	10	4	13	4	8	10	6	10	12
GT1CORE	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
GT1GMSCAM4	1	4	0	6	0	2	2	2	1	3
GTGANTG10	17	5	15	8	14	6	15	7	12	5
HEXAMERATH4	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
HEXMOTIFTAH3H4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IBOX	3	0	0	0	0	0	1	0	3	0
IBOXCORE	5	1	1	2	1	1	1	2	6	2
INRNTPSADB	3	0	4	0	4	0	4	4	2	0
INTRONLOWER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L1BOXATPDF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LECPLEACS2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LTRE1HVBTL49	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
LTRECOREATCOR15	1	3	2	3	2	3	1	1	2	3
MARTBOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB1AT	5	2	3	2	3	2	2	2	4	2
MYB1LEPR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB2CONSENSUSAT	4	5	5	2	5	4	5	2	4	6
MYBATRD22	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MYBCORE	8	7	9	4	10	9	10	3	8	8
MYBCOREATCYCB1	0	4	0	2	0	4	0	3	0	9
MYBGAHV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPLANT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPZM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MYBST1	0	5	0	5	0	5	1	5	0	5
MYCATERD1	1	1	0	1	0	2	1	0	1	4
MYCATRD22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYCCONSUSAT	16	6	14	8	14	8	16	4	16	14

ERACs	OsJAPWhy2	OsJAPWhy6	OsINDWhy2	OsINDWhy6	OsRUFWhy2	OsRUFWhy6	OsPUNWhy2	OsPUNWhy6	OsNIVWhy2	OsNIVWhy6
NAPINMOTIFBN	0	1	0	1	0	1	1	1	0	2
NODCON1GM	7	1	4	6	4	1	3	1	6	0
NODCON2GM	7	2	4	1	4	2	1	1	7	1
NONAMERMOTIFTAH3H4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
NTBBF1ARROLB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OSE1ROOTNODULE	14	1	4	6	4	1	3	1	6	0
OSE2ROOTNODULE	0	2	4	1	4	2	1	1	7	1
P1BS	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2
PALBOXAPC	0	2	0	1	0	2	0	1	0	1
PE2FNTRNR1A	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
POLASIG1	4	2	4	1	3	2	4	1	1	2
POLASIG2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
POLASIG3	0	3	1	1	1	3	1	1	4	4
POLLEN1LELAT52	5	12	3	11	3	12	5	5	6	7
PREATPROD	0	1	0	1	0	1	0	2	0	1
PRECONSCRHSP70A	1	2	0	4	1	2	1	3	1	3
PROLAMINBOXOSGLUB1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2
QELEMENTZM13	1	2	1	2	1	2	0	1	1	2
RAV1AAT	9	5	7	3	8	5	6	4	9	3
RAV1BAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RBCSCONSUS	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
REALPHALGLHCB21	3	1	1	1	1	1	2	1	3	1
REBETALGLHCB21	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
RGATAOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RHERPATEXPA7	0	1	1	0	0	1	3	1	0	0
ROOTMOTIFTAPOX1	0	5	0	2	0	5	1	3	1	4
RYREPEATBNNAPA	0	3	2	1	2	3	0	4	1	1
RYREPEATGMGY2	0	2	1	0	1	2	0	0	0	0
RYREPEATLEGUMINBOX	0	2	1	0	1	2	0	1	0	0

ERACs	OsJAPWhy2	OsJAPWhy6	OsINDWhy2	OsINDWhy6	OsRUFWhy2	OsRUFWhy6	OsPUNWhy2	OsPUNWhy6	OsNIVWhy2	OsNIVWhy6
RYREPEATVFLEB4	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0
S1FBOXSORPS1L21	1	2	0	2	0	2	0	1	2	2
S1FSORPL21	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
SEBFCONSSTPR10A	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0
SEF1MOTIF	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
SEF3MOTIFGM	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
SEF4MOTIFGM7S	2	1	1	3	1	1	1	3	3	2
SITEIIATCYTC	1	10	1	11	1	12	0	7	2	11
SORLIP1AT	0	3	0	4	0	2	0	2	0	1
SORLIP2AT	0	8	0	8	0	9	0	6	1	9
SORLIP5AT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SORLREP4AT	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
SREATMSD	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
SURECOREATSULTR11	2	1	2	1	2	1	4	2	2	1
SV40COREENHAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T/GBXATPIN2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
TAAAGSTKST1	1	1	5	2	4	1	2	6	2	1
TATABOX2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TATABOX3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TATABOX4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TATABOX5	3	2	3	1	3	2	0	1	3	4
TATABOXOSPAL	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3
TATAPVTRNALEU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TATCCACHVAL21	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TATCCAOSAMY	0	2	0	1	0	2	0	4	0	2
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
TBOXATGAPB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCA1MOTIF	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TGACGTVMAMY	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
TGTCACACMCUCUMISIN	1	0	2	0	2	1	0	0	0	0
UP1ATMSD	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2

ERACs	OsJAPWhy2	OsJAPWhy6	OsINDWhy2	OsINDWhy6	OsRUFWhy2	OsRUFWhy6	OsPUNWhy2	OsPUNWhy6	OsNIVWhy2	OsNIVWhy6
UPRMOTIFIIAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WBOXPCWRKY1	1	1	1	1	1	1	0	0	2	2
WBOXATNPR1	4	6	3	4	3	5	2	2	4	8
WBOXHVIS01	1	5	2	5	1	5	1	3	1	6
WBOXNTCHN48	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2
WBOXNTERF3	3	7	4	7	4	7	2	4	4	9
WRKY71OS	0	12	12	9	13	0	7	6	12	13
WRKY71OS 12	12	0	0	0	0	12	0	12	0	0
XYLAT	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1

Apêndice A. Continuação. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores preditos dos genes *Whirly* nas espécies do gênero *Oryza*.

ERACs	OsMERWhy2	OsMERWhy6	OsGLUWhy2	OsGLUWhy6	OsGLAWhy2	OsGLAWhy6	OsBRAWWhy2	OsBRAWWhy6	OsBARWhy2	OsBARWhy6
-10PEHVPSBD	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1
2SSEEDPROTBANAPA	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
-300CORE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-300ELEMENT	2	0	3	1	3	1	4	1	3	1
-300MOTIFZMZEIN	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AACACOREOSGLUB1	0	0	3	0	3	0	0	0	3	0
ABRELATERD1	0	2	2	0	16	0	0	3	2	0
ABREOSRAB21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ABRERATCAL	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ACGTABOX	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
ACGTABREMOTIFA2OSEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACGTATERD1	0	8	14	2	14	4	2	10	14	4
ACGTCBOX	0	3	0	2	0	2	0	0	0	2
ACGTOSGLUB1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
ACGTTBOX	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0
AMMORESIIUDCRNIA1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
AMYBOX1	1	2	1	0	1	1	1	0	1	2

ERACs	OsMERWhy2	OSMERWhy6	OsGLUWhy2	OsGLUWhy6	OsGLAWhy2	OsGLAWhy6	OsBRAWWhy2	OsBRAWWhy6	OsBARWhy2	OsBARWhy6
AMYBOX2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
ANAERO1CONSENSUS	1	0	5	1	1	1	0	0	1	0
ANAERO2CONSENSUS	0	1	0	0	2	0	1	2	2	0
ANAERO3CONSENSUS	0	1	0	1	2	1	0	0	2	1
ANAERO4CONSENSUS	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
ARFAT	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
ARR1AT	6	18	16	16	15	18	11	10	12	17
ASF1MOTIFCAMV	0	2	1	1	1	1	1	3	1	1
AUXREPSIAA4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BIHD1OS	0	3	9	4	8	4	4	2	8	4
BOXIINTPATPB	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
BOXLCOREDCPAL	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
BP5OSWX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BS1EGCCR	0	0	0	1	0	2	0	1	0	1
CAATBOX1	6	13	15	15	13	14	14	13	13	11
CACGCAATGMGH3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CACGTGMOTIF	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
CANBNNAPA	1	1	1	21	1	1	0	0	1	2
CAREOSREP1	0	1	2	2	2	1	1	1	2	2
CARGATCONSENSUS	0	2	2	2	2	2	0	0	2	2
CARGCW8GAT	0	0	6	0	4	0	4	0	4	1
CARGNCAT	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
CBFHV	0	1	1	1	1	1	0	3	1	1
CCA1ATLHCB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCAATBOX1	1	2	4	2	4	3	2	1	4	2
CEREGLUBOX2PSLEGA	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
CGACGOSAMY3	0	1	2	1	2	2	0	1	2	1
CGCGBOXAT	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
CIACADIANLELHC	3	1	1	1	1	1	0	0	1	0
CMSRE1IBSPOA	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1
CPBCSPOR	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0

ERACs	OsMERWhy2	OSMERWhy6	OsGLUWhy2	OsGLUWhy6	OsGLAWhy2	OsGLAWhy6	OsBRAWWhy2	OsBRAWWhy6	OsBARWhy2	OsBARWhy6
CRTDREHVCBF2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
CURECORECR	3	8	10	8	12	4	10	9	12	6
DOFCOREZM	10	14	21	12	19	12	21	8	21	13
DPBFCOREDCDC3	0	1	1	3	1	2	3	3	1	2
DRE2COREZMRAB17	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
DRECRTCOREAT	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
E2FCONSENSUS	1	0	0	3	0	3	0	0	0	3
EBOXBNNAPA	6	8	12	12	13	6	16	10	14	4
EECCRCAH1	1	4	1	4	1	3	3	1	1	3
ELRECOREPCR1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
GARE1OSREP1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
GAREAT	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
GATABOX	8	13	9	12	9	15	15	15	7	14
GCCCORE	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
GCN4OSGLUB1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
GT1CONSENSUS	12	14	4	11	3	9	23	5	4	10
GT1CORE	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0
GT1GMSCAM4	4	5	0	3	0	2	4	1	0	4
GTGANTG10	5	7	13	6	14	6	15	12	15	7
HEXAMERATH4	3	1	0	1	0	1	0	1	0	1
HEXMOTIFTAH3H4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IBOX	0	0	1	0	1	0	3	2	0	0
IBOXCORE	4	2	1	1	1	1	3	5	0	1
INRNTPSADB	4	0	4	0	4	0	1	5	4	0
INTRONLOWER	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
L1BOXATPDF1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
LECPLEACS2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LTRE1HVBLT49	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
LTRECOREATCOR15	0	3	1	3	1	3	0	1	1	3
MARTBOX	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MYB1AT	2	3	4	3	4	2	4	2	5	2

ERACs	OsMERWhy2	OSMERWhy6	OsGLUWhy2	OsGLUWhy6	OsGLAWhy2	OsGLAWhy6	OsBRAWWhy2	OsBRAWWhy6	OsBARWhy2	OsBARWhy6
MYB1LEPR	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
MYB2CONSENSUSAT	0	4	4	4	5	4	2	3	5	5
MYBATRD22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBCORE	0	6	8	8	10	7	8	5	10	7
MYBCOREATCYCB1	0	4	0	4	0	4	0	3	0	4
MYBGAHV	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPLANT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPZM	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
MYBST1	1	5	0	4	0	5	3	4	0	5
MYCATERD1	0	0	0	2	0	2	3	1	0	2
MYCATRD22	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
MYCCONSUSAT	6	8	12	12	14	6	16	10	14	4
NAPINMOTIFBN	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1
NODCON1GM	0	1	5	1	4	2	2	0	4	1
NODCON2GM	1	1	3	3	4	0	5	1	3	2
NONAMERMOTIFTAH3H4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NTBBF1ARROLB	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0
OSE1ROOTNODULE	0	1	5	1	4	0	7	0	4	1
OSE2ROOTNODULE	1	1	3	2	4	2	0	1	3	2
P1BS	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
PALBOXAPC	0	3	0	3	0	1	0	0	0	2
PE2FNTRNR1A	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
POLASIG1	5	1	4	1	4	2	6	5	4	2
POLASIG2	2	1	0	1	0	1	0	1	0	1
POLASIG3	4	3	0	3	4	3	2	1	1	3
POLLEN1LELAT52	7	7	3	10	3	10	9	5	3	12
PREATPROD	0	2	0	1	0	1	2	2	0	1
PRECONSCRHSP70A	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2
PROLAMINBOXOSGLUB1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	0	4	0	2	0	1	0	0	0	1
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	0	4	1	2	2	2	1	0	1	2

ERACs	OsMERWhy2	OSMERWhy6	OsGLUWhy2	OsGLUWhy6	OsGLAWhy2	OsGLAWhy6	OsBRAWWhy2	OsBRAWWhy6	OsBARWhy2	OsBARWhy6
QELEMENTZM13	0	1	1	1	1	2	0	0	1	2
RAV1AAT	1	3	8	5	9	5	7	2	9	5
RAV1BAT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RBCSCONSUS	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
REALPHALGLHCB21	3	1	2	1	1	1	2	2	1	1
REBETALGLHCB21	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0
RGATAOS	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RHERPATEXPA7	0	0	0	1	0	1	0	4	1	1
ROOTMOTIFTAPOX1	6	6	0	4	0	5	5	4	0	5
RYREPEATBNNAPA	0	1	2	3	2	3	1	0	2	3
RYREPEATGMGY2	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2
RYREPEATLEGUMINBOX	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2
RYREPEATVFLEB4	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2
S1FBOXSORPS1L21	0	1	1	2	1	2	0	0	1	2
S1FSORPL21	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
SEBFCONSSTPR10A	0	0	1	0	2	0	1	1	2	0
SEF1MOTIF	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEF3MOTIFGM	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SEF4MOTIFGM7S	2	2	2	1	1	2	4	0	2	1
SITEIATCYTC	0	13	1	10	1	11	0	7	1	10
SORLIP1AT	1	2	0	2	0	0	0	3	0	2
SORLIP2AT	0	11	0	9	0	11	3	9	0	8
SORLIP5AT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SORLREP4AT	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
SREATMSD	1	2	0	1	0	1	2	2	0	1
SURECOREATSULTR11	0	1	1	1	2	1	0	3	2	1
SV40COREENHAN	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
T/GBXATPIN2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAAAGSTKST1	4	2	6	1	5	1	6	1	5	1
TATABOX2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TATABOX3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ERACs	OsMERWhy2	OSMERWhy6	OsGLUWhy2	OsGLUWhy6	OsGLAWhy2	OsGLAWhy6	OsBRAWWhy2	OsBRAWWhy6	OsBARWhy2	OsBARWhy6
TATABOX4	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TATABOX5	8	2	3	1	3	2	8	4	3	2
TATABOXSPAL	3	2	0	1	0	1	0	0	0	2
TATAPVTRNALEU	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TATCCACHVAL21	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TATCCAOSAMY	0	1	0	2	0	1	2	1	0	2
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
TBOXATGAPB	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
TCA1MOTIF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TGACGTVMAMY	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1
TGTCACACMCUCUMISIN	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0
UP1ATMSD	0	4	0	2	0	1	0	2	0	0
UPRMOTIFIAT	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
WBOXPCWRKY1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
WBOXATNPR1	0	4	3	6	3	6	3	2	3	6
WBOXHVIS01	1	4	2	5	2	5	5	0	2	5
WBOXNTCHN48	0	1	1	2	1	2	0	0	1	2
WBOXNTERF3	1	6	4	6	4	7	5	2	4	8
WRKY71OS	1	11	14	11	13	12	10	7	13	13
WRKY71OS 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XYLAT	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1

Apêndice B. Ocorrência de elementos de regulação cis (ERACs) nos promotores (1000pb) dos genes *Whirly* nas cultivares BRS Pampa e BRS Bojuru.

ERACs	Pampa <i>Whirly6</i>	Bojuru <i>Whirly2</i>	Pampa <i>Whirly2</i>	Bojuru <i>Whirly6</i>
-10PEHVPSBD	2	0	1	2
-300ELEMENT	0	1	0	0
AACACOREOSGLUB1	0	1	1	0
ABRERATCAL	0	1	0	0
ACGTATERD1	0	2	2	2
ACGTCBOX	0	2	2	2
AMYBOX1	0	0	1	1
ANAERO1CONSENSUS	0	1	0	0
ANAERO3CONSENSUS	1	1	1	1
ARFAT	0	2	0	0
ARR1AT	15	6	3	12
ASF1MOTIFCAMV	0	2	2	1
BIHD1OS	2	2	1	2
BS1EGCCR	0	1	0	0
CAATBOX1	9	7	5	9
CACTFTPPCA1	8	12	9	11
CANBNNAPA	1	0	0	1
CAREOSREP1	1	2	1	1
CARGATCONSENSUS	2	0	0	2
CBFHV	1	0	0	1
CCA1ATLHCB1	2	0	0	0
CCAATBOX1	2	3	1	2
CEREGLUBOX2PSLEGA	0	0	1	0
CGACGOSAMY3	1	2	1	1
CGCGBOXAT	0	6	0	0
CIACADIANLELHC	0	1	1	0
CMSRE1BSPOA	0	0	0	1
CURECORECR	2	2	2	4
DOFCOREZM	11	10	9	7
DPBFCOREDCDC3	2	0	0	3
DRE1COREZMRAB17	0	1	0	0
DRECRTCOREAT	1	0	0	1
E2FCONSENSUS	2	0	0	2
EBOXBNNAPA	6	6	4	6
EECCRCAH1	2	1	0	2
ELRECOREPCRP1	0	4	2	0
GARE1OSREP1	0	0	0	1
GATABOX	11	7	7	11
GCCCORE	2	5	0	2
GT1CONSENSUS	7	4	2	4
GT1CORE	1	0	0	0
GT1GMSCAM4	4	1	0	3
GTGANTG10	4	5	1	3
HEXAMERATH4	1	1	0	2
HEXMOTIFTAH3H4	0	1	1	0

ERACs	Pampa <i>Whirly6</i>	Bojuru <i>Whirly2</i>	Pampa <i>Whirly2</i>	Bojuru <i>Whirly6</i>
IBOXCORE	1	0	0	0
INTRONLOWER	2	0	0	2
LEAFYATAG	0	1	0	0
LECPLEACS2	0	1	1	0
LTRECOREATCOR15	3	0	1	3
MARTBOX	0	3	5	0
MYB1AT	2	0	0	2
MYB2CONSENSUSAT	1	1	1	2
MYBCORE	2	3	2	4
MYBCOREATCYCB1	1	3	3	2
MYBST1	3	0	0	3
MYCATERD1	1	0	0	1
MYCATRD22	1	0	0	1
MYCCONSSENSUSAT	6	6	3	6
NAPINMOTIFBN	1	1	0	1
NODCON1GM	4	1	0	0
NODCON2GM	0	2	1	0
NTBBF1ARROLB	0	1	1	0
OSE1ROOTNODULE	4	1	1	0
OSE2ROOTNODULE	0	2	0	0
P1BS	2	0	0	2
PALBOXAPC	0	1	0	1
PE2FNTRNR1A	1	0	0	1
POLASIG1	1	5	4	1
POLASIG2	1	1	0	1
POLASIG3	3	3	3	3
POLLEN1LELAT52	7	0	0	7
PRECONSCRHSP70A	3	1	2	2
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	1	1	0	1
PYRIMIDINEBOXSRAMY1A	0	0	0	1
QELEMENTZM13	2	1	0	2
RAV1AAT	2	1	0	3
RAV1BAT	0	1	0	0
REALPHALGLHCB21	1	0	0	1
ROOTMOTIFTAPOX1	3	12	11	3
RYREPEATBNNAPA	1	0	0	1
S1FBOXSORPS1L21	1	0	0	1
S1FSORPL21	1	0	0	1
SEBFCONSSTPR10A	0	2	0	0
SEF1MOTIF	0	1	1	0
SEF4MOTIFGM7S	2	4	4	0
SITEIIATCYTC	6	5	0	11
SORLIP1AT	4	1	0	4
SORLIP2AT	3	5	0	8
SP8BFIBSP8BIB	0	2	0	0
SREATMSD	1	0	0	0
SURECOREATSULTR11	1	3	0	1
SV40COREENHAN	0	1	1	0
TAAAGSTKST1	2	1	1	0
TATABOX4	0	1	1	0
TATABOX5	1	2	2	1

ERACs	Pampa <i>Whirly6</i>	Bojuru <i>Whirly2</i>	Pampa <i>Whirly2</i>	Bojuru <i>Whirly6</i>
TATABOXOSPAL	1	3	3	1
TATAPVTRNALEU	0	1	0	0
TATCCAOSAMY	1	0	0	1
TBOXATGAPB	0	0	1	0
TELOBOXATEEF1AA1	0	1	0	0
TGACGTVMAMY	0	1	1	0
UP1ATMSD	1	0	0	2
UP2ATMSD	0	3	0	0
WBOXPCWRKY1	0	4	2	0
WBOXATNPR1	3	9	7	4
WBOXHVIS01	4	3	3	4
WBOXNTCHN48	2	1	0	2
WBOXNTERF3	6	8	5	6
WRKY71OS	8	12	8	9
WUSATAg	0	2	1	0
XYLAT	1	0	0	1