

CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Escherichia coli* DOS HOMÓLOGOS EM MILHO DO GENE *OsPSTOL1*

Nataly Figueiredo Ferreira¹

Bárbara França Negri²

Sylvia Moraes de Sousa Tinoco³

RESUMO

A baixa disponibilidade de fósforo (P) é um fator limitante para o aumento da produtividade do milho, uma vez que o P é um dos macronutrientes com menor eficiência de uso pelas plantas. Sendo

assim, modificações na morfologia do sistema radicular são importantes para aumentar a eficiência na aquisição de P nas plantas. O gene *PHOSPHORUS STARVATION TOLERANCE 1*

¹Graduanda em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas. E-mail: natalyfferreira@outlook.com

²Doutoranda em Bioengenharia pela Universidade Federal de São João de Rei. E-mail: barbarafnegri@gmail.com

³ Bióloga, DSc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Professora do Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação do Centro Universitário de Sete Lagoas e da pós-graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG. E-mail: sylvia.sousa@embrapa.br

(*PSTOL1*), codifica uma quinase que ao ser superexpressa em arroz aumenta o crescimento radicular e a aquisição de P e, conseqüentemente, a produtividade de grãos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar funcionalmente os genes de milho, *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02*, homólogos ao *OsPSTOL1*. A clonagem e sequenciamento da região codificante possibilitaram a obtenção das seqüências completas para cada gene e o alinhamento dos aminoácidos mostrou que as proteínas *ZmPSTOL1* são conservadas em comparação ao *OsPSTOL1*. A análise *in silico* mostrou que as três proteínas *ZmPSTOL1* possuem, assim como *OsPSTOL1*, um domínio quinase serina/treonina, um sítio ativo de ATP e um sítio ativo previsto serina/treonina, sendo que apenas *ZmPSTOL1_3.06* não possui um domínio transmembrana. A expressão das proteínas de *ZmPSTOL1* indicou que as proteínas são expressas a

partir de três horas de indução e *ZmPSTOL1_3.06* teve a melhor expressão, provavelmente pela ausência do domínio transmembrana em sua composição. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que as proteínas *ZmPSTOL1* possuem características estruturais típicas de quinases do tipo receptoras citoplasmáticas e podem estar envolvidas em respostas a deficiência de P em milho de forma semelhante ao *OsPSTOL1*.

Palavras-chave: Eficiência de fósforo; Quinase; Raiz; Sequenciamento.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea Mays*) é o principal cereal cultivado no mundo, tendo grande importância para a agricultura devido a sua versatilidade, que vai do consumo animal, seu principal uso,

passando pelo consumo humano, até à produção de combustíveis renováveis. A maior parte da cultura de milho, no Brasil, concentra-se na região centro-sul. Essa região é predominantemente constituída pelo bioma Cerrado cujo tipo de solo que prevalece é o latossolo que é tipicamente pouco fértil e muito ácido (SANTOS *et al.*, 2010).

O cultivo do milho em larga escala no Cerrado só se tornou possível devido ao desenvolvimento de novas tecnologias para o melhoramento dos solos dessa região. A baixa disponibilidade de nutrientes nesse solo afeta toda a produtividade agrícola, inclusive a do milho. A falta do fósforo (P) é um dos fatores mais limitantes ao cultivo agrícola nesse tipo de solo, posto que as plantas possuem baixa eficiência de captação e de uso deste nutriente. As plantas apresentam vários mecanismos para melhorar a

aquisição de P do solo, sendo o principal deles modificações na arquitetura radicular.

Em arroz, foi identificado o gene *Phosphorus-starvation tolerance 1 (PSTOL1)*, que codifica uma proteína quinase responsável por aumentar precocemente o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular das plantas, o que acarreta uma maior aquisição de P do solo e, conseqüentemente, maior produção de grãos. Análises fenotípicas em linhagens semi-isogênicas de arroz na presença e ausência do *OsPSTOL1* mostram que, em condições de baixa disponibilidade de P, as plantas que possuem o gene *OsPSTOL1* apresentam a superfície radicular significativamente maior (GAMUYAO *et al.*, 2012). No genoma do milho, foram identificados seis homólogos ao gene de arroz que codificam proteínas com mais de 55% de sua identidade com o *OsPSTOL1*. Um mapeamento

de QTL foi feito utilizando uma população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) provenientes de duas linhagens contrastantes na eficiência de aquisição de P, sendo a linhagem de milho L3 eficiente e L22 ineficiente. Quatro genes (*ZmPSTOL1_3.06*, *ZmPSTOL1_4.05*, *ZmPSTOL1_8.02* e *ZmPSTOL1_8.05*) que co-localizam com QTLs relacionados à morfologia radicular, peso seco total da planta e eficiência na aquisição de P foram identificados neste mapeamento (AZEVEDO, 2015), indicando que esses genes candidatos estão relacionados com modificações na morfologia radicular do milho e na absorção de P. Dentre esses quatro genes, três têm maior expressão na raiz do que na parte aérea em condições de baixo P. Esses genes são preferencialmente expressos nas raízes da linhagem parental que contribui com alelos positivos para os respectivos QTLs (AZEVEDO,

2015). Análises de expressão gênica detalhadas nas linhagens contrastantes para eficiência na aquisição de P, mostram que o *ZmPSTOL1_8.02* e o *ZmPSTOL1_8.05* possuem maior expressão na linhagem L22, na zona de divisão da raiz primária, enquanto o *ZmPSTOL1_3.06* é mais expresso na linhagem L3 na zona de diferenciação da raiz primária (NEGRI, 2015).

A partir dessas questões apresentadas, o presente estudo teve como objetivo caracterizar funcionalmente as proteínas codificadas pelos três genes *PSTOL1* de milho por meio de caracterização *in silico* da sequência completa de cDNA e expressão heteróloga na bactéria *Escherichia coli*.

2 METODOLOGIA

2.1 Isolamento, clonagem e sequenciamento da região codificadora dos genes

A região codificante dos genes candidatos foi sequenciada a partir do cDNA das linhagens de milho L3 e L22, sendo utilizado o cDNA da L22 para os genes *ZmPSTOL1_8.05* e *ZmPSTOL1_8.02*, o da linhagem L3 para *ZmPSTOL1_3.06* com base nos resultados de expressão (NEGRI, 2015) e mapeamento de QTL (AZEVEDO, 2015) desses genes. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o software Primer3 (UNTERGASSER *et al.*, 2007). Após o sequenciamento completo, a sequência relativa à região codificante de todos os

genes *ZmPSTOL1* foi sintetizada e clonada no vetor pUC57 pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>). O DNA plasmidial resultante dessas construções foi utilizado como base para a amplificação da região codificadora dos genes utilizando oligonucleotídeos com sítios de restrição enzimática (TAB.1) para a clonagem no vetor de expressão pET28a (Novagen).

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos desenhados com sítios de restrição enzimática para clonagem e expressão de proteínas heterólogas.

Gene	Sítio da enzima de restrição	Primers	Tamanho do fragmento (pb)
ZmPS TOL1_8.0 5 L22	<i>NdeI_Nco</i> I	5'- GCATATGGCC ATGGGGATGTGGAA GTTTCTC-3'	1128
	<i>BamHI_X</i> <i>hoI</i>	3'- GGGATCCTCGAGTCAGCTCAAAGAAGCTCTGGG-5'	
ZmPS TOL1_3.0 6 L3	<i>NdeI_Nco</i> I	5'-GCATATGGCC ATGCTGCCATTCAAATCGA -3'	1026
	<i>HindIII_</i> <i>NotI</i>	3'-GAAGCTTGGGCCGCTAATTTATATAACCTT TGATTAGTTGGGG-5'	
ZmPS TOL1_8.0 2 L22	<i>NheI_Nco</i> I	5'-GGCTAGCC ATGGGGATGTGGAAGTT TCTC-3'	1332
	<i>BamHI_X</i> <i>hoI</i>	3'- GGGATCCTCGAGTTACAGAGTTGGCAACCGTTG-5'	

Fonte: NEGRI, 2015.

Foi realizada uma PCR com 5,0 µL do DNA plasmidial, 4,0 µL do tampão 5x Buffer HF, 1,0 µL do primer específico F (0,5 µM), 1,0 µL do primer específico R (0,5 µM), 0,6 µL de DMSO (3%), 0,2 µL de Phusion DNA Polymerase (1 unidade/µL), 1,0 µL de DNTPS (2,5 mM) e 7,2

µL de água. A reação foi levada ao termociclador à 98 °C por 30 segundos, em um ciclo, 98 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto, em 35 ciclos, e 72° C por 10 minutos, em um ciclo. O fragmento gerado de cada gene foi clonado no pGEM®-T Easy Vector

Systems (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA com as construções foi inserido na bactéria *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico e foi realizada a PCR de colônia para a confirmação de colônias positivas. As colônias positivas foram inoculadas em meio líquido CG com antibiótico ampicilina (20 mg/mL) e crescidas sob agitação constante de 150 rpm à 37 °C. O DNA plasmidial foi extraído como kit de extração Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi feito com 1,0 μ M do primer específico F e primer específico R (TAB.1) e dos primers M13F (5GTAAAACGACGGCCAGT-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'), 50 ng/uL de cDNA, 0,5 uL de BigDye® Terminator v3.1

Ready Reaction (1X) e 1,75 μ L *Sequencing Buffer* (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl₂.6H₂O) (Applied Biosystems, Forter City, CA) no equipamento 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Forter City, CA) e as sequências que foram processadas no software BioEdit Sequence Aligment Editor (HALL, 1999).

2.2 Análise dos domínios das proteínas *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02*

As sequências processadas foram analisadas com os softwares Expasy (ARTIMO *et al.*, 2012), TMHMM Sever v. 2.0 (KROGH *et al.*, 2001), InterProScan (JONES *et al.*, 2014) e SignalP (PETERSEN *et al.*, 2011). Para a elaboração da figura com os domínios e sítios ativos preditos da

proteína foi utilizado o software Prosite My Domains (SIGRIST *et al.*, 2012). As sequências de aminoácidos foram analisadas e alinhadas pelo programa BLAST P (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3 Expressão das proteínas *ZmPSTOL1* em *E. coli*

Os fragmentos subclonados no vetor pGEM foram clonados no vetor de expressão bacteriano pET28a (FIG.2) na região C-Terminal e foram inseridos em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) através de choque térmico. Foi feito um pré-inóculo que foi diluído para densidade ótica 0,1 e o inóculo foi crescido a 37 °C até densidade ótica 0,6-0,9. A expressão das proteínas foi induzida por 100 mM de lactose e inicialmente foram coletadas amostras com 3, 6 e

12 horas para definição do melhor tempo de indução. O pellet das bactérias foi ressuspendido em 10 mL de Tampão de Afinidade (50 mM fosfato de sódio pH 7,2, 5% glicerol, 100 mM de NaCl e 1 mg/mL de lisoenzima) para que ocorresse lise celular. As amostras (5 uL) foram colocadas em 5 µL de 2 X tampão de amostra de proteínas (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 8%, SDS 1%, β-mercaptoetanol 1%, EDTA 2 mM, azul de bromofenol) e levadas a 95 °C por cinco minutos para que a proteína sofresse desnaturação e pudesse ser visualizada em eletroforese em gel Mini-PROTEAN® TGX™SDS-PAGE 4-15%.

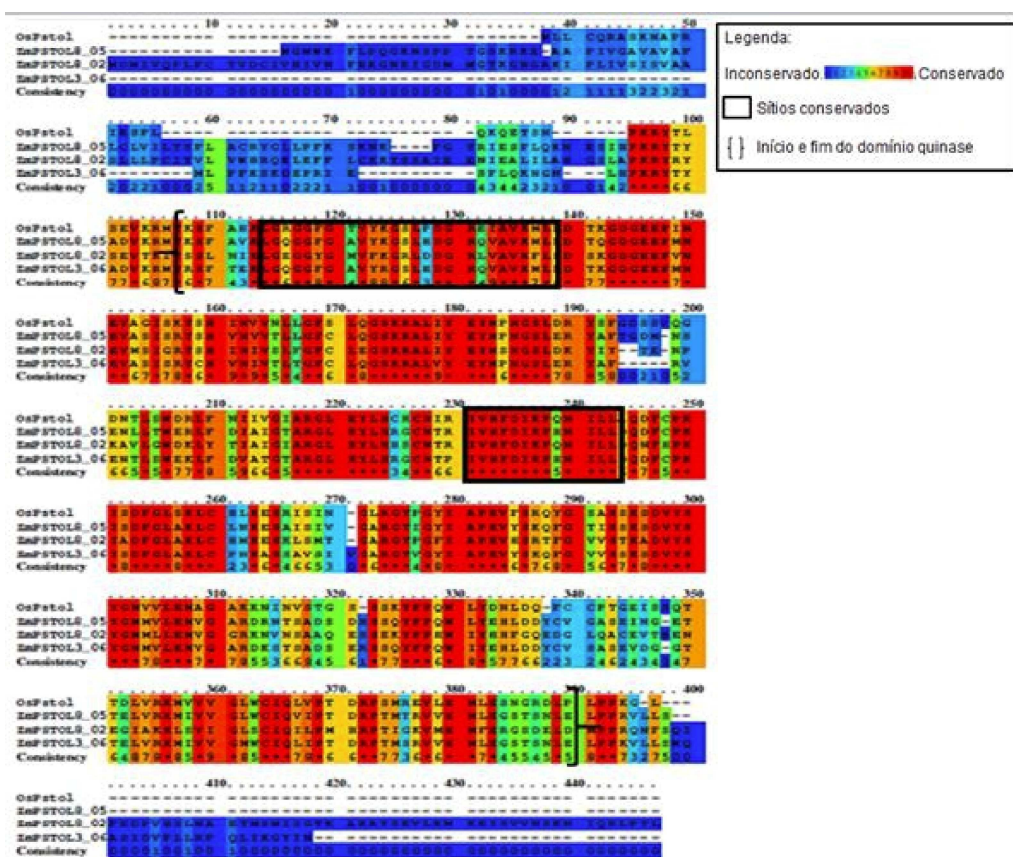
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cDNA sequenciado foi traduzido e o alinhamento dos aminoácidos do *PSTOL1* de arroz em relação aos seus homólogos em milho

(FIG.1), mostrou a identidade entre as sequências *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02* de 70, 66 e 54% respectivamente. O número de aminoácidos e o peso molecular das proteínas *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02* estão apresentados na Tabela 2. Na Figura 1, quanto mais a cor vai se aproximando do vermelho, maior a semelhança entre o gene *OsPSTOL1* e os genes *ZmPSTOL1*. Podemos observar que a sequência de aminoácidos codificados pelo gene *OsPSTOL1* e seus homólogos em milho são bastante conservados, assim como os sítios ativos existentes dentro dessa localização. Sabe-se que *OsPSTOL1* possui similaridade em maior parte de sua sequência de aminoácidos com quinases do tipo receptoras citoplasmáticas (GAMUYAO *et al.*, 2012). As quinases do tipo receptoras citoplasmáticas (RLCKs) são parte de uma

subdivisão do grupo das proteínas quinases do tipo receptoras (RLKs), diferindo das RLKs pela ausência do domínio extracelular e/ou do domínio transmembrana (RAMEGOWDA *et al.*, 2014). Existem estudos que demonstram a caracterização de função de RLCKs envolvidas em respostas a estresses abióticos, como a RLCK em *Arabidopsis thaliana* que regula negativamente a sinalização do ácido abscísico (ABA) (TANAKA *et al.*, 2012); em arroz uma outra RLCK (OsRLCK253) foi sugerida por interagir com proteínas associadas e ativar respostas a esses estresses. Sua superexpressão mostra um aumento da tolerância a estresses de seca e salinidade (GIRI *et al.*, 2011). Considerando a similaridade entre as sequências, é possível inferir que as proteínas *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02* têm função biológica semelhante ao *OsPSTOL1*.

Figura 1 - Alinhamento dos aminoácidos correspondentes ao gene de arroz *OsPSTOL1* e seus homólogos em milho (*ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02*).



Fonte: A própria autora.

Tabela 2 - Número de aminoácidos (aa) e tamanho (kDa) das proteínas *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02*.

Proteína	Número de aa	Tamanho (kDa)
<i>ZmPSTOL1_8.05</i>	375	41,7
<i>ZmPSTOL1_3.06</i>	343	38,4
<i>ZmPSTOL1_8.02</i>	443	49,5

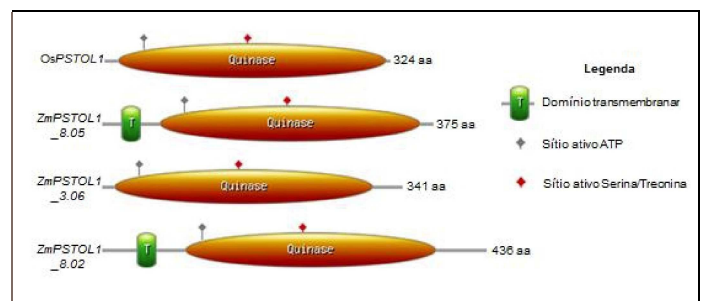
Fonte: A própria autora.

A predição das proteínas com base na sequência do cDNA possibilitou a predição de domínios, sítios ativos e presença de peptídeo sinal (FIG. 2), mostrando que o gene *ZmPSTOL1_8.05* e o gene *ZmPSTOL1_8.02* possuem em sua composição estrutural um domínio transmembrana, um sítio ativo ATP e um sítio ativo Serina/Treonina, ao passo que o gene *ZmPSTOL1_3.06* possui ambos os sítios ativos, porém não foi detectada a presença do domínio

transmembrana. A presença do domínio transmembrana é um importante indicador de que as proteínas que contêm este domínio possuem interação com a membrana plasmática. Essa interação sugere que essas proteínas podem ter um papel como sensor, conectando o ambiente extracelular ao citoplasma fazendo assim com que sinais intracelulares sejam desencadeados (DE OLIVEIRA, 2011). A ausência do domínio extracelular e a similaridade na estrutura desses

genes comparados ao *OsPSTOL1* são indicadores de que estas proteínas são proteínas quinases do tipo receptoras citoplasmáticas (RLCKs), e, uma vez que são consideradas homólogas ao *OsPSTOL1*, há fortes indícios de que estão relacionadas a respostas a condições de estresses abióticos, atuando na cascata de sinalização que antecede a resposta a determinado estresse (GAMUYAO *et al.*, 2012; NEGRI, 2015).

Figura 2 - Domínios e sítios ativos das proteínas codificadas pelo gene *PSTOL1* de arroz e pelos seus homólogos em milho.



Fonte: A própria autor

O vetor pET28a foi escolhido para expressar as proteínas de interesse fusionadas a uma cauda de histidina. Após a correta clonagem dos genes *ZmPSTOL1* com vetor pET28a foi feito um teste de indução da expressão considerando diferentes tempos (0, 3, 6 e 12 horas), que mostrou a expressão

das proteínas (FIG. 3), com o tamanho esperado. Não houve aumento no nível de expressão das proteínas após três horas de indução, indicando que esse tempo é adequado para análise da expressão. A proteína codificada pelo gene *ZmPSTOL1_3.06* foi induzida com maior sucesso (FIG. 3). Essa proteína

não possui o domínio transmembrana, ao contrário das proteínas *ZmPSTOL1_8.05* e *ZmPSTOL1_8.02*. As proteínas do tipo receptoras são caracterizadas estruturalmente por possuírem um domínio extracelular, um transmembranar e um domínio quinase, enquanto as quinases do tipo receptoras citoplasmáticas podem ou não ter a presença do domínio transmembrana e não possuem o domínio extracelular (RAMEGOWDA *et al.*, 2014).

Figura 3 - Teste temporal de indução por lactose das proteínas *ZmPSTOL1*. A) *ZmPSTOL1_8.05* (1 a 4) e *ZmPSTOL1_3.06* (5 a 8), B) *ZmPSTOL1_8.02* (9 a 12). 1, 5 e 9: Não induzida; 3, 6 e 10: 3 horas após indução; 3, 7 e 11: 6 horas após indução e 4, 8 e 12: 12 horas após indução. L: Marcador de peso molecular pré-corado SeeBlue® Plus 2 (Life Technologies).

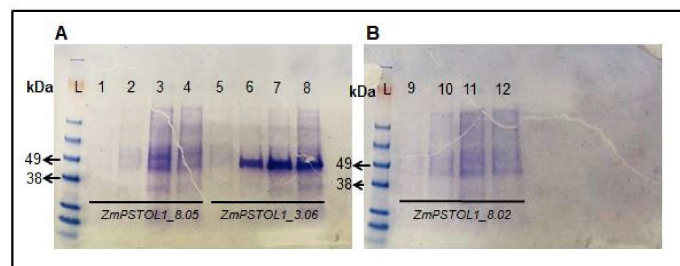


FIG. 3 Fonte: Elaborado pela própria autora

A diferença significativa na indução das proteínas expressas pelos genes *ZmPSTOL1_8.05* e *ZmPSTOL1_8.02* comparados ao gene *ZmPSTOL1_3.06* pode ser explicada pela ausência do domínio transmembrana em *ZmPSTOL1_3.06*. Para que haja a expressão e solubilização das outras duas proteínas é necessária a utilização de outras cepas para expressão e/ou o uso de substâncias que facilitem a solubilização das proteínas com

domínio de membrana plasmática celular (WAGNER; KOHORN, 2001).

Os resultados aqui apresentados contribuíram para um melhor entendimento sobre a estrutura das proteínas expressas pelos genes *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02*, abrindo caminho para um melhor entendimento sobre a sua funcionalidade. Além dos resultados de expressão gênica apresentados por NEGRI 2015, a análise de domínios dessas proteínas e o alinhamento de aminoácidos dos genes candidatos em comparação ao *OsPSTOL1* são fortes indícios de que essas proteínas são classificadas como proteínas quinases do tipo receptoras citoplasmáticas (RLCKs).

Proteínas quinases são consideradas reguladores chave do crescimento e da arquitetura da planta. As proteínas quinases da superfamília

de receptores citoplasmáticos (*Receptor-like cytoplasmic kinase*, RLCK), do qual as proteínas *OsPSTOL1* e *ZmPSTOL1* fazem parte, são moléculas de sinalização que fornecem um sistema de alerta para a presença de estresses bióticos e abióticos que ativam as vias de sinalização protetora nas plantas. Para entender melhor o mecanismo de ação das proteínas quinases, faz-se necessária a realização de ensaios de fosforilação *in vitro*, tanto para avaliar a autofosforilação das proteínas, como o seu papel na transfosforilação de outros elementos para que o sinal seja transmitido e a planta consiga codificar proteínas responsivas aos estresses reconhecidos, podendo ser realizados ensaios com substratos diferentes e a presença de diferentes cátions, como magnésio, cálcio ou manganês, para avaliar se essas proteínas são dependentes de outros fatores para que a sua atividade seja

realizada com êxito (RAMEGOWDA *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos contribuem na elucidação do mecanismo de ação das proteínas *ZmPSTOL1* que leva a alterações na morfologia radicular de milho e o aumento na absorção de P (AZEVEDO, 2015; LOPES, 2016).

4 CONCLUSÃO

Com base nas informações apresentadas conclui-se que as proteínas *ZmPSTOL1_8.05*, *ZmPSTOL1_3.06* e *ZmPSTOL1_8.02*, possuem características estruturais e domínios semelhantes às proteínas quinases do tipo receptoras citoplasmáticas, que possivelmente, possuem um papel essencial no reconhecimento e sinalização a deficiência de P em plantas de milho.

REFERÊNCIAS

ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSADI, G.; DE CASTRO, E.; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E.; GROSDIDIER, E.; HERNANDEZ, C.; LOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTI, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H. (2012). ExPasy: SIB bioinformatics resource portal. *Acids Res.*, 40: 597-603.

AZEVEDO, G. C. (2015). *Identificação de genes associados com a eficiência na aquisição de fósforo em milho com foco nos genes PSTOL1, STR1 e STR2*. 11 de fevereiro de 2015, 128p. Tese – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- DE OLIVEIRA, L. F. V. *Aspectos Funcionais e Evolutivos da Família WAK em Oryza sativa*. 2011. 92p. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P. PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C. LOEDIN, I. S.; MENDOZA, E. M. T.; WISSUWA, M.; HEUER, S. (2012). The protein kinase *Pstoll* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 488: 535–539.
- GIRI, J.; VIJ, S.; DANSANA, P. K.; TYAGI, A. K. (2011). Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *New Phytol*, 191: 721-732.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, nº41, 95-98.
- JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H. Y.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; QUINN, A. F.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; YONG, S. Y.; LOPEZ, R.; HUNDER, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30: 1236-1240.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305: 567-580.

LOPES, S. S. *Análise funcional do gene Pstoll de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco*. Fevereiro de 2016, 70p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade Federal São João Del-Rei, São João Del Rei.

NEGRI, B. F. *Caracterização funcional dos homólogos do gene Pstoll de arroz em milho*. 2015. 79 p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia Molecular, Celular

e Tecidual) - Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8: 785-786.

RAMEGOWDA, V.; BASU, S.; KRISHNAN, A.; PEREIRA, A. (2014). Rice GROWTH UNDER DROUGHT KINASE is required for drought tolerance and grain yield under normal and drought stress conditions. *Plant Physiol.*, 166: 1634-1645.

SANTOS, M. A.; BARBIERI, A. F.; CARVALHO, J. A. M.; MACHADO, C. J.

(2010). O cerrado brasileiro: notas para estudo. Belo Horizonte. UFMG/Cedeplar.

SIGRIST, C. J.; DE CASTRO, E.; CERUTTI, L.; CUCHE, B. A.; HULO, N.; BRIDGE, A.; BOUGUELERET, L.; XENARIOS, I. (2012). New and continuing developments at Prosite. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.*, 41: 344-347.

TANAKA, H.; OSAKABE, Y.; KATSURA, S.; MIZUNO, S.; MARUYAMA, K.; KUSAKABE, K.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2012). Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 70, 599-613.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. (2007). Primer3Plus. an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35: 71-74.

WAGNER, T. A.; KOHORN, B. D. (2001). Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell*, 13:303-318.