

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM
Laboratório de Fisiologia Vegetal

**Análise da expressão gênica diferencial em arroz (*Oryza sativa*
L. ssp. indica) em resposta ao excesso de ferro**

Aluno: Felipe Klein Ricachenevsky

Orientadora: Prof^a Dr^a Janette Palma Fett

Banca examinadora:

Dr. Marco Aurelio Krieger – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – Curitiba,
PR

Dr. Andrés Delgado Cañedo – Instituto de Cardiologia do RS – Porto Alegre,
RS

Dr. Rogério Margis – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular – PPGBCM – UFRGS – Porto Alegre, RS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Molecular – PPGBCM da UFRGS como
um dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre

Porto Alegre
Março de 2007

“Não existe meio de verificar qual é a boa decisão, pois não existe termo de comparação. Tudo é vivido pela primeira vez e sem preparação. Como se um ator entrasse em cena sem nunca ter ensaiado. Mas o que pode valer a vida, se o primeiro ensaio da vida já é a própria vida? É isso que faz com que a vida pareça sempre um esboço. No entanto, mesmo 'esboço' não é a palavra certa porque um esboço é sempre um projeto de alguma coisa, a preparação de um quadro, ao passo que o esboço que é a nossa vida não é o esboço de nada, é um esboço sem quadro.”

Milan Kundera em *A Insustentável Leveza do Ser*

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço à minha orientadora, Dra. Janette Palma Fett pela orientação, pela confiança depositada no meu trabalho e pela oportunidade de realizá-lo em seu laboratório. Pela paciência com o meu jeito um tanto quanto desorganizado e com o costume brasileiro de fazer tudo na última hora. Mais ainda, por ela ser uma excelente pessoa, saber tratar com igualdade e respeito seus orientados e, principalmente, saber que a vida acadêmica nem sempre é a mais importante. Espero poder levar a amizade construída nesses dois anos por muito tempo ainda. Muito obrigado mesmo!

Aos orientadores do PPGBCM e membros da comissão de acompanhamento, Dr. Arthur Germano Fett-Neto, pela amizade e espírito crítico, provavelmente o melhor com quem tive contato; Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelas discussões e críticas e, principalmente, por se mostrar sempre disponível para ajudar. Agradeço também aos professores Dr. Giancarlo Pasquali, Dr. Arnaldo Zaha e aos alunos de ambos, que em conjunto permitiram que utilizássemos não somente a infra-estrutura de seus laboratórios, mas também seus materiais e sua “mão-de-obra”. Ao Dr. Giancarlo, também por ter feito a revisão da dissertação.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, pelos excelentes momentos de conversa no “mesão”, pelas dicas, brigas e risadas, festas e churrascos. Esses dois anos foram muito melhores por causa de vocês! Em especial, Raul (co-autor de todo esse trabalho, o cara mais organizado – leia-se obsessivo-compulsivo – que eu conheço), Diogo (nosso Professor Pardal, mestre da gambiarra), Cabeludo (grán jugador de fútbol, el argentino Sorín), Paim (gravataiense chinelo), Carol (dá-lhe Cruz Alta), Palomita

(desculpa, desculpa, mas, né, tu és muito legal), Ná (pequena, mas vale no mínimo o dobro), Vare Juana (na realidade, uma joaninha recalcitrante, sempre), Joséli (a estrangeira, la generala do lab, fazendo falta demais), Marcelo (que ajudou nesse trabalho como IC e desaprendeu muito comigo), Júlio (nosso locutor de rádio, um gentleman), Denílson (nosso Morpheus chorão), Camilo (ainda fazemos aquele PCR, juro!), Kelly (a mãe do ano) e Denise (as melhores histórias, ainda te publico!). Valeu mesmo!

Aos alunos do PPGBCM e estudantes do Centro de Biotecnologia, que em sua maioria ajudam sempre que preciso e se mostram totalmente dispostos a colaborar. Não vou citar nomes porque seriam muitos! À Silvia e ao Luciano, sempre prestativos e, melhor ainda, engraçados!

Aos amigos, a família que nós escolhemos e estão juntos nos bons e maus momentos, vocês são tudo na minha vida! Rafa, Mathias, Tiagão, Luis, Paula Cabeção, Luiza, Gustavo “El Chavo Del Ocho” e, claro, meu grande irmão e colega de apê, Daniel: só me sustento se tiver vocês por perto! Muito obrigado por tudo!

À Déia, Wendy, Deda, Alema...quem diria? As surpresas são sempre melhores que as obviedades! Só posso dizer que tu sempre foste, e sempre vais ser, uma das pessoas mais importantes na minha vida, agora ainda mais! Muito obrigado por me fazer desligar do mundo e viajar contigo...te amo demais!!!

Ao meu pai, por tudo que ele é. Por ser um exemplo de respeito, ética, calma e amor. Por amar a família acima de tudo e por ser pai, amigo, irmão, parceiro, crítico e estimulador, ao mesmo tempo, sempre dando o exemplo, mas deixando a liberdade para aprender com os próprios erros. Sempre vou estar do teu lado, afinal já passamos por

tantas coisas juntos e, pode ter certeza, só estou aqui hoje por tua causa. Tu és o meu ídolo! Te amo muito!

À minha mãe, a pequena notável, que nunca se entregava e sempre queria crescer. Que nos deu todo o amor do mundo, sofreu, chorou e cantou todas as derrotas e vitórias que tivemos! Sei que, em algum lugar, tu estás olhando pra cá com um sorriso, AQUELE sorriso, e feliz. Penso em ti todos os dias, mãe. Te amo muito!

Ao meu irmão, Rafa, o grande presente do início desse ano. Um dia tu vais ler isso e saber o quanto eu sou feliz por tu existires. Só uma dica: aproveita que essa é a melhor fase!!! Te amo, maninho!

A toda e qualquer pessoa que, em algum momento, ajudou na realização desse trabalho, ou nesses dois anos. Sei lá, vai que eu tenha esquecido alguém!

Às agências financiadoras, que permitiram a realização desse trabalho e concederam a minha bolsa.

Obrigado!

Abreviaturas

ABA – Ácido abscísico (abscisic acid)

At – *Arabidopsis thaliana*

CAB – Proteína ligadora de clorofila a/b (*chlorophyll a/b binding protein*)

DP1 – Produto diferencial 1 (*differential product 1*)

DP2 – Produto diferencial 2 (*differential product 2*)

ER – Retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)

Fe⁺² – Íon férrico (*ferric ion*)

Fe⁺³ – Íon ferroso (*ferrous ion*)

Fer - Ferritina

FRO – Oxidase-redutase férrica (*ferric reductase-oxidase*)

GLC – β -glicosidase (*β -glucosidase*)

IDRS – Seqüência de resposta dependente de ferro (*iron dependent responsive sequence*)

IRT – Transportador regulado por ferro (*iron-regulated transporter*)

ITP – Proteína transportadora de ferro (*iron transport protein*)

LHC – Complexo de captação de luz (*light harvesting complex*)

LRR – Receptor rico em repetições de leucina (*leucine-rich repeat receptor*)

MT –Metalotioneína (*metallothionein*)

NA – Nicotianamina

NADH – Nicotinamida-adenina dinucleotídeo

NRAMP – Proteína de macrófago associada à resistência natural (*natural resistance associated macrophage protein*)

Os – *Oryza sativa*

PC – Fitoquelatina (*phytochelatin*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PIK – Fosfatidil-inositol quinase (*phosphatidil-inositol kinase*)

PSII – Fotossistema II (*photosystem II*)

RDA – Análise de diferença representacional (*representational difference analysis*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

RuBisCO – Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase / oxidase

SAG – Gene associado à senescência (*senescence associated gene*)

TRAPP – Partícula de proteína de transporte (*transport protein particle*)

UTR – Região não-traduzida (*untranslated region*)

OMS – Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*)

YSL – Proteína semelhante à yellow stripe (*yellow stripe-like protein*)

ZIP – Proteína ZRT / IRT (*ZRT / IRT protein*)

ZRT – Transportador regulado por zinco (*zinc-regulated transporter*)

Índice

Resumo.....	10
Introdução.....	11
Capítulo 1.....	25
Representational Difference Analysis of up-regulated genes by iron-excess in rice (<i>Oryza sativa</i>) shoots shows overlap between stress response and senescence gene expression	26
Introduction.....	28
Material and Methods.....	30
Plant Growth.....	30
RNA extraction and cDNA synthesis.....	31
Representational Difference Analysis.....	31
Cloning and sequence analysis.....	32
Semi-quantitative RT-PCR analysis.....	33
Results.....	34
Discussion.....	35
Concluding Remarks.....	41
References.....	43
Capítulo 2.....	62
Utilização da técnica de Representational Difference Analysis (RDA) para isolamento de genes inibidos pelo excesso de ferro em partes aéreas de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	63
Introdução.....	63

Material e Métodos.....	63
Resultados.....	67
Discussão.....	69
Conclusões gerais.....	76
Referências.....	77

Lista de Tabelas e Figuras

Tabelas

Table 1.....	58
Table 2.....	59
Tabela 1.....	72
Tabela 2.....	73

Figuras

Figure 1.....	60
Figure 2.....	61
Figura 1.....	74
Figura 2.....	75

Resumo. O ferro é elemento essencial para quase todos os organismos, participando de reações importantes no metabolismo das plantas, incluindo a fotossíntese. A homeostase desse metal não é completamente entendida em organismos vegetais, sendo que tanto o excesso quanto a deficiência são deletérios. O arroz (*Oryza sativa* L. ssp. indica) é normalmente cultivado em terrenos irrigados, o que pode levar ao excesso de ferro. Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de Análise Diferencial de Representações (RDA) para isolar seqüências cuja expressão é aumentada ou diminuída pelo excesso de ferro. Foram isoladas 24 seqüências aumentadas e 15 inibidas. Onze seqüências tiveram seu padrão de expressão confirmado como sendo ativadas pelo excesso de ferro, de 14 testadas. Nenhuma seqüência teve seu padrão confirmado como sendo inibido pelo excesso de ferro. Dentre as seqüências confirmadas como diferencialmente expressas, foram encontrados genes relacionados à fotossíntese, resposta a estresse, degradação de proteínas, metabolismo de açúcares e aminoácidos e fatores de transcrição. Vários desses genes estão associados a senescência em outros trabalhos, indicando que a planta sob excesso de ferro pode estar entrando na rota que leva à senescência. Também foi encontrado um fator de transcrição da família WRKY cuja expressão é mais acentuada no 3º dia de tratamento, com diminuição gradual até o 9º dia. Esse dado pode indicar que essa proteína pode estar envolvida na resposta inicial ao estresse, sendo um candidato a regulador da resposta.

Introdução

A cultura mundial do arroz é a segunda maior entre os cereais em extensão de área plantada, ficando atrás apenas do cultivo de trigo. Estima-se que metade da população mundial baseie sua dieta em arroz, sendo que 20% das calorias disponíveis para o consumo humano provêm da produção de arroz (Christou 1994; FAO 2007). Principalmente na Ásia, onde estão os maiores produtores, o arroz é fundamental na agricultura de subsistência, tendo por isso importância cultural e social (Christou 1994). Com cerca de 13 milhões de toneladas produzidas ao ano, o Brasil é o décimo maior produtor mundial, sendo o primeiro entre os não-asiáticos. O Rio Grande do Sul apresenta posição destacada entre os Estados brasileiros na produção de grãos. Os dados do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) referentes à safra de 2004/2005 mostram que o Estado responde por cerca de 46% da produção nacional de arroz, com uma área cultivada de 1.028.886 ha e cerca de 6.000.000 milhões de toneladas ao ano (IRGA 2005).

Existem dois sistemas principais de manejo da lavoura de arroz. O plantio no seco, similar ao trigo, milho e outros cereais, e o plantio em terrenos alagados ou irrigados. No plantio no seco, ou sequeiro, o ambiente é bastante aeróbico e o pH é neutro ou básico. O ferro, embora seja o quarto elemento de maior abundância na crosta terrestre, encontra-se normalmente como íon ferroso (Fe^{+2}), que forma polímeros altamente insolúveis de óxido-hidróxidos com a matéria orgânica do solo e, por isso, é de difícil absorção pelas raízes (Christou 1994). A deficiência de ferro pode ser um problema nesse tipo de plantio, onde a concentração de ferro disponível é de aproximadamente 10^{-14} a 10^{-17} M, sendo que o ideal para que as plantas desenvolvam-se adequadamente é de

10^{-4} a 10^{-9} M (Guerinot e Yi 1994). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS, *World Health Organization* – WHO – <http://www.who.int/>), metade da população mundial sofre de deficiência de ferro em algum grau. Assim, a baixa quantidade do metal em um dos alimentos-base da população é um argumento para a elaboração de projetos para, por meio de esforços conjuntos, melhorar o valor nutritivo do arroz (e de outros cereais; ver *Harvest Plus* – <http://www.harvest-plus.org/>).

No plantio do tipo irrigado, plântulas de duas a três semanas são transferidas para terrenos alagados com uma lâmina de água de cerca de 5 cm, normalmente utilizando água proveniente de rios. Esse sistema, devido à independência em relação à pluviosidade e ao uso de uma maior quantidade de fertilizante, é o que gera maiores rendimentos (Christou 1994). Porém, o alagamento causa a acidificação do solo bem como diminui drasticamente o contato com o oxigênio, tornando o ambiente anóxico e bastante redutor. O ferro, que em ambiente aeróbico e de pH neutro encontra-se quelado na matéria orgânica do solo na forma Fe^{+3} , é reduzido à forma íon férrico (Fe^{+2}), a qual é mais solúvel e, portanto, mais facilmente absorvida pelas raízes das plantas (Ponnanperuma 1972). O aumento da concentração de Fe^{+2} pode levar a uma absorção excessiva e à toxidez por ferro, que rapidamente é acumulado nas folhas (Sahrawat 2004). O pH crítico varia de 3 a 7, e a concentração de Fe^{+2} em locais com problemas de toxidez é de 300-500 mg/L na solução do solo (Ottow et al. 1982), chegando a acumular de 300 a 600 mg/Kg nas folhas mais jovens (Tanaka et al. 1966). No Rio Grande do Sul, a maior parte das cultivares utilizadas é sensível ao excesso de ferro.

O grau de dano causado pela toxidez por ferro varia de acordo com a cultivar, bem como a época do plantio, o manejo da água e a época de submergência (Saharawat 2004). No Rio Grande do Sul, estima-se que em locais onde a toxidez por ferro é

acentuada, a perda na produção pode chegar a 20% (IRGA 2004), enquanto que em localidades da África, a perda pode variar entre 12% e 100% (Sahrawat 2004). Os principais sintomas observados são o bronzeamento das folhas, que adquire coloração amarelada ou alaranjada, principalmente as mais velhas; inclusões marrons nas folhas mais jovens, causadas pela deposição de ferro, as quais se espalham para as nervuras durante a progressão da toxidez; raízes se tornam de coloração marrom, (Sahrawat 2004); baixa taxa de crescimento e esterilidade das espiguetas, causando diminuição da produtividade e, em casos mais severos, morte da planta (Ponnamperuma et al. 1955).

A resposta fisiológica contra o excesso de ferro é dada, em um primeiro momento, pelas raízes. São descritos três fatores que contribuem para a diminuição da toxidez: (1) oxidação do Fe^{+2} para Fe^{+3} ainda na rizosfera, pelo oxigênio mantido em aerênquimas nas folhas, nódulos e nas próprias raízes; (2) capacidade de exclusão, o que impede a entrada de ferro, o qual é acumulado na superfície do tecido; (3) capacidade de retenção, impedindo a translocação do ferro para a parte aérea (Tadano 1975). A capacidade de oxidação do ferro por parte das raízes é maior em regiões de crescimento no que nas partes basais (Yoshida 1981). O suprimento de potássio (K) aumenta o potencial redox das raízes, sendo portanto um modulador do potencial de oxidação do ferro da forma Fe^{+2} para Fe^{+3} nas raízes, podendo contribuir para a tolerância ao excesso de ferro (Sahrawat et al. 2004). Ele também está envolvido tanto na exclusão de ferro quanto na translocação para as folhas (Howeler 1973; Tadano 1975). Tadano et al. (1975) demonstrou que o poder de exclusão de uma planta de arroz saudável é de 87% da quantidade de ferro que chega até as raízes, indicando a importância da exclusão para a toxidez por ferro. Jaywardena et al. (1977) sugerem, por intermédio de um estudo com 17 variedades de arroz com diferentes graus de susceptibilidade ao excesso de ferro, que

exista um mecanismo baseado mais em tolerância dos tecidos a altas concentrações de ferro do que em resistência à entrada do metal através das raízes. Nesse trabalho, é demonstrado que as cultivares menos suscetíveis apresentam maior conteúdo de ferro em seus tecidos, indicando que existem maneiras de imobilizar o metal dentro da planta, impedindo seus efeitos tóxicos. Em um trabalho do nosso grupo, foram comparadas uma cultivar resistente (EPAGRI 108) e outra sensível (BR-IRGA 409) em relação ao excesso de ferro, sendo possível notar um comportamento distinto na resposta ao estresse. EPAGRI-108 acumula menos ferro tanto em raízes quanto em parte aérea do que BR-IRGA-409 (Stein et al., comunicação pessoal), indicando um possível mecanismo de exclusão. Assim, percebe-se que os mecanismos de resposta a esse estresse abiótico não estão totalmente elucidados, principalmente se estes mecanismos baseiam-se na tolerância ao ferro presente nos tecidos ou em resistência à sua absorção. Também não se sabe se diferentes cultivares respondem por meio de vias diferentes ou se apenas possuem intensidade de resposta diferentes ao excesso de ferro.

Em condições anaeróbicas, as raízes de arroz liberam oxigênio, em uma tentativa de reoxidar o Fe^{+2} , diminuindo, assim, a absorção. Isso leva à deposição de ferro e manganês (Mn), que precipitam e formam a chamada capa férica, que recobre a superfície da raiz. A capa férica, segundo Zhang et al. (1999), impede a absorção excessiva de Fe^{+2} , além de Mn na forma Mn^{+2} e outros compostos tóxicos de terrenos alagados, podendo também servir como um reservatório de fósforo (P). Outros autores sugerem, no entanto, que a capa férica pode resultar em diminuição da captação de outros nutrientes essenciais, tanto pela barreira criada pelo ferro quanto por interações com o próprio solo (Howeler 1973; Neue et al. 1998). Olaleye et al. (2001), utilizando duas cultivares africanas, mostrou que as plantas apresentavam menor quantidade de P,

K e Mn e maior quantidade de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e do próprio ferro quando eram submetidas a quantidades crescentes de ferro. Sahrawat (2004), em sua revisão, indica a existência de dois tipos de toxidez por ferro em arroz. A pseudo-toxidez ocorre quando os sintomas observados são causados por deficiência de outros nutrientes como P, K, Ca, Mg e zinco (Zn), podendo a planta acumular concentrações tóxicas de ferro nos tecidos ou não. O alaranjamento das folhas é o sintoma característico dessas plantas. Já a toxidez verdadeira ocorre quando os sintomas observados são causados somente pelos níveis tóxicos de ferro dos tecidos, não sendo observada qualquer deficiência aparente de outros nutrientes. Nesse tipo de toxidez, o sintoma característico é o bronzeamento das folhas. A pseudo-toxidez pode ocorrer em níveis mais baixos de ferro na solução do solo do que a toxidez verdadeira (Sahrawat 2004)

A toxidez por ferro pode ainda ser influenciada por outros fatores. Tanaka et al. (1966) mostrou que plantas em estágio de crescimento vegetativo são menos tolerantes ao excesso de ferro do que plantas em estádios posteriores, indicando que a capacidade de responder a esse estresse varia ao longo do desenvolvimento. Também, o acúmulo de inibidores da respiração, como sulfeto de hidrogênio, ácidos orgânicos e outros produtos resultantes do alto poder redutor da solução líquida do solo podem tornar o arroz mais suscetível à toxidez por ferro (Tadano & Yoshida 1978). A textura e a quantidade de matéria orgânica presente no solo, bem como a capacidade de troca de cátions, são fatores que podem modular a toxidez por ferro (Sahrawat 2004). A deficiência ou mesmo a indisponibilidade de outros nutrientes pode afetar a capacidade da planta de impedir a ascensão do ferro até a parte aérea, impedindo a oxidação, a exclusão e a retenção feita pelas raízes (Sahrawat 2004 e referências citadas).

Intracelularmente, o ferro apresenta diversas funções, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Participa de centros de oxirredução, na forma do agrupamento ferro-enxofre (Fe-S), da respiração mitocondrial e da fotossíntese (Rouault & Tong 2005). Está também envolvido na síntese de citocromos e clorofila, sendo também cofator de diversas enzimas (Taiz & Zeiger 1998). Assim, sua aquisição é de extrema importância, sendo a deficiência de ferro umas das três mais prejudiciais do ponto de vista agrônomo (deficiência de fósforo e de nitrogênio incluem-se entre elas) (Marschner 1995). Existem dois mecanismos de resposta à deficiência de ferro claramente descritos. A estratégia 1, utilizada por dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas, consiste na: (i) protonação da rizosfera para solubilização de Fe^{+3} ; (ii) redução do ferro na forma Fe^{+3} para Fe^{+2} por uma redutase; (iii) absorção da forma Fe^{+2} através de um transportador de especificidade seletiva da família dos transportadores regulados por ferro (IRT) (Guerinot & Yi 1994; Eide et al. 1996; Connolly & Guerinot 2002). A estratégia 2, utilizada pelas gramíneas, grupo que inclui o arroz, consiste na: (i) liberação, pelas raízes, de fitossideróforos, aminoácidos não-protéicos derivados do ácido muginéico, os quais possuem a capacidade de formar complexos com Fe^{+3} e solubilizá-lo; (ii) absorção por meio de transportadores específicos da família *Yellow Stripe-Like* (YSL), que reconhecem o complexo formado pelo ferro ligado a fitossideróforos (Guerinot & Yi 1994; Connolly & Guerinot 2002; Curie et al. 2001; Schaaf et al. 2004). Em um trabalho do nosso grupo, foi demonstrada com a utilização de ferramentas de bioinformática a existência de genes tanto de estratégia I quanto de estratégia II no genoma de arroz, indicando que, possivelmente, o uso de cada uma das estratégias não seja exclusivo (Gross et al. 2003). Ishimaru et al. (2006) comprovaram que, além da absorção de ferro na forma Fe^{+3} ligado a fitossideróforo, plantas de arroz

também absorvem a forma Fe^{+2} , por meio do transportador IRT1, classicamente descrito como sendo de estratégia 1 (Eide et al. 1996; Connolly et al. 2002). Essa capacidade poderia ser uma adaptação a terrenos alagados ou irrigados, nos quais o ferro na forma Fe^{+2} apresenta-se em maior quantidade (Ishimaru et al. 2006).

O ferro, quando em excesso na sua forma livre dentro da célula, aumenta a produção de radicais livres. O radical hidroxila, o mais danoso deles, é produzido pela reação de Fenton, na qual o íon Fe^{+2} é oxidado a Fe^{+3} (Becana et al. 1998). Essa reação, acoplada à reação de Haber-Weiss, na qual Fe^{+3} é reduzido a Fe^{+2} juntamente com um íon superóxido, torna o processo cíclico, pois o Fe^{+2} estará novamente disponível para a produção de hidroxilas (Floyd 1983). Como consequência, ocorre lipoperoxidação e danos a proteínas e ácidos nucleicos, podendo levar a célula à morte (Halliwell & Gutteridge 1984). Em arroz, Fang et al. (2001) mostraram que folhas tratadas com níveis tóxicos de ferro aumentam a lipoperoxidação. Também foi demonstrado que a atividade de peroxidases, envolvidas na detoxificação de peróxido de hidrogênio, é aumentada após tratamento com ferro (Fang & Kao 2000). Kampfenkel et al. (1995) mostraram, em plantas de *Nicotiana plumaginifolia*, que o excesso de ferro induz estresse oxidativo, diminuição do transporte de elétrons, aumento da energização das tilacóides e alta redução do fotossistema II (PSII), causando diminuição da taxa fotossintética e levando à fotoinibição. Esses dados levam à sugestão de que a redução na fotossíntese está provavelmente relacionada a danos no transporte de elétrons através das tilacóides. Suh et al. (2002) demonstraram, em ervilha, que o excesso de ferro leva à produção de oxigênio singleto do Cyt B6/f, difundindo para o PSII, causando danos e levando à fotoinibição. A fina regulação da homeostase do ferro é, então, de extrema importância,

tendo em vista seu potencial de causar danos a macromoléculas quando em excesso, bem como sua necessidade para os principais processos celulares em plantas.

Após a absorção nas raízes, o ferro é transportado em direção à parte aérea via xilema, seguindo o fluxo transpiratório, normalmente ligado a quelantes como o ácido cítrico (Cataldo et al. 1988), formando o complexo Fe^{+3} -citrato. Isso indica que plantas que absorvem ferro na forma Fe^{+2} devem oxidá-lo para realizar um transporte adequado. Nas folhas, então, o complexo Fe^{+3} -citrato é reduzido, sendo posteriormente transportado por proteínas carreadoras de cátions bivalentes, através da membrana plasmática. De acordo com Marschner (1995), o ferro chega aos diferentes órgãos da planta na forma de Fe^{+2} -livre por meio do apoplasto. Provavelmente, a redução do Fe^{+3} ligado a citrato é feita por redutases de membrana plasmática. A presença de redutases do tipo redutase-oxidase de ferro (FRO) no mesófilo de folhas foi demonstrada para ervilha (Waters et al. 2002) e em folhas de *Arabidopsis* (Robinson et al. 1997; Wintz et al. 2003). Após a redução, o Fe^{+2} é possivelmente transportado através da membrana plasmática, complexado com nicotianamina (NA). Um gene do tipo YSL de *Arabidopsis* (YSL2) é expresso na membrana e também da vasculatura das folhas, podendo ser um candidato ao transporte do ferro para dentro do simplasto (DiDonato et al. 2004).

Pouco se sabe sobre a distribuição intracelular do ferro, bem como sobre o transporte e a regulação da concentração nas diferentes organelas. Fitoquelatinas (PC) e metalotioneínas (MT) são polipeptídeos comumente envolvidos na tolerância intracelular a metais pesados. Sua função consiste em seqüestrar e formar complexos com metais potencialmente tóxicos quando livres, tornando-os inertes (Rauser 1990; Robinson et al. 1993; Briat e Lebrun 1999). Em relação ao ferro, no entanto, ainda não foi demonstrada qualquer ação protetora dessas moléculas. Becker et al. (1998) não

encontraram evidências do aumento da síntese de PCs e MTs em resposta ao aumento da concentração de ferro em plantas de ervilha.

Existem alguns trabalhos relacionados a genes envolvidos no transporte intracelular de ferro. Em *Arabidopsis*, foi identificado um transportador do tipo proteína de macrófago associada à resistência natural (do inglês *Natural Resistance Associated Macrophage Protein*, NRAMP), que é expresso em parte aérea (Thomine et al. 2003). Esse mesmo trabalho mostra que o AtNRAMP3 é um transportador de Fe^{+2} localizado no tonoplasto, estando possivelmente envolvido na remobilização do ferro que encontra-se no vacúolo (Thomine et al. 2003). Lanquar et al. (2005) mostraram que AtNRAMP3 e também AtNRAMP4 realizam a mobilização do estoque de ferro do vacúolo, o que, sob baixa concentração de ferro, passa a ser essencial para a germinação das sementes. Belouchi et al. (1997) clonaram e caracterizaram três genes NRAMP em arroz (OsNRAMP1, OsNRAMP2 e OsNRAMP3). Experimentos de expressão mostraram que, enquanto OsNRAMP1 é expresso principalmente nas raízes e OsNRAMP2 em folhas, OsNRAMP3 é expresso em níveis semelhantes em raízes e folhas. Também foi mostrado que OsNRAMP1 é capaz de complementar funcionalmente o mutante de levedura *fet3fet4* (Curie et al. 2000), deficiente no transporte de ferro.

Uma das maneiras de estocar ferro intracelularmente é por meio da ferritina. A proteína é composta de 24 subunidades, sendo capaz de estocar até 4500 átomos de ferro em seu interior (Connolly & Guerinot 2002). O *pool* de ferro ligado a ferritina é equilibrado pelo *pool* de ferro livre, funcionando como um tampão de quantidade de ferro (Pich et al. 2001). Os genes de ferritina de plantas normalmente apresentam peptídeos de trânsito para plastídeos (Proudhon et al. 1996), o que é justificável pelo fato de a maior parte do ferro intracelular ser localizado nos cloroplastos (Hendry &

Brocklebnak 1985). O ferro complexado à ferritina representa mais de 90% de todo ferro encontrado no embrião da semente de ervilha, atuando como uma fonte de reserva de ferro para o desenvolvimento do aparato fotossintético da plântula após a germinação (Marentes & Grusak 1998). Foram identificados, em *Arabidopsis*, quatro genes correspondentes a ferritina, sendo que duas cópias (AtFer1 e AtFer3) são induzidas em condições de excesso de ferro (Petit et al. 2001a). Na região promotora do gene AtFer1 foi identificada uma seqüência de resposta dependente de ferro (do inglês *Iron Dependent Responsive Sequence*, IDRS), a qual é responsável pela indução da transcrição desse gene quando a planta é exposta a condições de excesso de ferro, e pela repressão em níveis normais de ferro ou em deficiência (Petit et al. 2001b). Um trabalho (Petit et al. 2001a) em *Arabidopsis* mostra que, além do excesso de ferro, também o tratamento com peróxido de hidrogênio aumenta a expressão de AtFer1 e AtFer3, sugerindo a ligação entre a produção de radicais livres e a presença de ferro. Em *Nicotiana tabacum*, a superexpressão de ferritina tornou a planta resistente a estresse oxidativo, reforçando a idéia de que o excesso de ferro é tóxico por meio de radicais livres (Deak et al. 1999). Em outro trabalho, a superexpressão de ferritina em *N. tabacum* causou o seqüestro do ferro e um aumento na atividade de redutase das raízes, resposta tipicamente dada à deficiência de ferro, indicando que o ferro foi alocado para o interior das ferritinas e passou a ser indisponível (Van Wuytswinkel et al. 1998). Também se sabe que a síntese de ferritina é induzida pelo excesso de ferro (Lobreaux et al. 1995; Gaymard et al. 1996). A maior parte do ferro ligado à ferritina, no entanto, está localizada no cloroplasto, indicando sua função na prevenção de danos ao aparato fotossintético (Lobreaux et al. 1995; Becker et al. 1998). A presença de ferritina já foi

também detectada em mitocôndrias de *Arabidopsis* e ervilha, onde ela pode ter função semelhante (Zancani et al. 2004).

O aminoácido não-proteinogênico NA, um dos intermediários na síntese de fitossideróforos nas plantas de estratégia 1, é ubíquo nas plantas superiores (Scholz et al. 1992), forma complexos estáveis tanto com Fe^{+3} quanto com Fe^{+2} (Stephan et al. 1996), e o ferro, quando ligado a NA, é menos reativo do que quando livre (Von Wirén et al. 1999). Isso o torna um dos principais candidatos a quelante de ferro tanto no transporte intracelular quanto no transporte através da planta. O mutante de tomate *chloronerva*, auxotrófico para NA, apresenta um fenótipo de deficiência de ferro constante, mesmo em suficiência de ferro, ativando constitutivamente a redutase de raiz responsável pela redução de Fe^{+3} em Fe^{+2} . Apresenta também precipitações de compostos de ferro nas células foliares, indicando que sem NA o metal não se mantém solúvel e disponível dentro das células e, por isso, o fenótipo de deficiência de ferro independe da concentração do metal (Becker et al. 1995). Pich et al. (2001) mostraram, por meio de marcação com anticorpo específico em ervilha e tomate, que a maior parte da NA se encontra no citoplasma em condições normais, enquanto que, em condições de excesso de ferro, são observadas inclusões nos vacúolos, indicando a função da organela na armazenagem do metal. Essa função já é bastante conhecida para levedura, onde o vacúolo é o principal compartimentador de ferro (Raguzzi et al. 1988; Bode et al. 1995). Parece, então, que as plantas possuem mais de um compartimento para armazenagem de ferro, tendo a ferritina papel principal no cloroplasto e a NA no vacúolo, tanto protegendo a célula contra danos oxidativos causados pelo ferro livre quanto fornecendo o metal em concentrações não tóxicas (Pich et al. 2001).

A NA ligada a Fe^{+2} é transportada por genes YSL em *Arabidopsis* (Waters et al. 2006) e em arroz (Koike et al. 2004), espécie na qual a família gênica apresenta 18 membros (Gross et al. 2003, Koike et al. 2004). Koike et al. (2004) mostraram que OsYL2 é expresso principalmente no floema, sugerindo um possível papel do gene no carregamento e descarregamento do floema. Além do transporte realizado por meio da complexação com NA, o ferro é descrito como sendo transportado através do floema por peptídeos e proteínas. Em *Ricinus communis*, foi identificada uma proteína de 2,4 kDa que se liga especificamente a Fe^{+3} e não a Fe^{+2} , denominada proteína transportadora de ferro (do inglês *iron transport protein*, ITP), que é capaz de se ligar também a outros metais como Cu^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} (Krüger et al. 2002). Assim, percebe-se que o excesso de ferro e seus efeitos tóxicos em plantas, embora tenham alguns aspectos bem estudados, ainda permanece sem um modelo que acople todos os eventos que parecem estar envolvidos tanto na toxidez *per se* como na defesa da planta contra esse estresse.

O arroz, além de ser uma das culturas mais importantes do mundo, é também a planta-modelo para estudos de fisiologia e genética em monocotiledôneas (Shimamoto & Kyojuka 2001). Portanto, estudos sobre a homeostase de ferro nesse modelo são de extrema importância para a elucidação dos mecanismos que controlam a entrada, o fluxo e a exclusão de ferro, bem como a identificação de genes ativados ou reprimidos em resposta ao excesso e à deficiência desse metal. As duas principais variedades de *Oryza sativa* já tiveram as seqüências de seus genomas completamente determinadas: variedade *indica* (Yu et al. 2002) e variedade *japonica* (Goff et al. 2002). Nosso grupo, conforme brevemente citado acima, realizou buscas nos bancos nos quais esses dados encontravam-se disponíveis, procurando por genes sabidamente relacionados com a homeostase de ferro em *Arabidopsis* e em outras espécies. Foram identificados 18 genes

relacionados à família gênica YSL, dois relacionados com a família gênica FRO, onze genes relacionados com a família gênica IRT/ZIP, oito genes relacionados com a família gênica NRAMP e dois genes relacionados com a família gênica das ferritinas (Gross et al. 2003). Já estão sendo conduzidos experimentos em nosso laboratório com o intuito de avaliar as mudanças na expressão desses genes, não somente em excesso como em deficiência de ferro. Essa abordagem nos permitirá fazer inferências sobre quais genes possuem papel relevante nas repostas ao estresse por este metal. No entanto, somente são avaliados genes que já conhecemos, impossibilitando a identificação de novos genes envolvidos. Além disso, a maior parte dos trabalhos relacionados aos efeitos do excesso de ferro em plantas trata da resposta fisiológica ao estresse. Nosso trabalho é a primeira tentativa de analisar de maneira mais geral os mecanismos moleculares envolvidos nesta resposta.

A técnica de Análise de Diferença Representacional (do inglês *Representational Difference Analysis* RDA) foi inicialmente desenvolvida por Lisitsyn et al. (1993) para identificar diferenças entre populações de DNA genômico, sendo posteriormente modificada por Hubank & Schatz (1994) para permitir a análise de diferenças entre populações de mRNAs. Baseada em ciclos sucessivos de hibridização subtrativa seguida de PCR, esta técnica enriquece a amostra e permite o isolamento de seqüências relativas a mRNAs expressos diferencialmente. Também reduz a representação de seqüências não-diferencialmente expressas. É um método bastante sensível e permite o isolamento de genes cuja expressão é aumentada ou diminuída entre duas populações diferentes de cDNA relativas a duas situações contrastantes (Pastorian et al. 2000). Um de seus poucos pontos negativos é a não-normalização das seqüências encontradas, muitas vezes resultando em redundâncias bastante altas para uma mesma seqüência. Porém,

considerando sua fácil execução e eficiência, é uma técnica recomendada para a análise diferencial de expressão gênica em laboratórios de pequeno porte (Kozian & Kirschbaum, 1999). Tendo em vista que a técnica já foi usada com sucesso em nosso laboratório para a análise da expressão diferencial em arroz em resposta à deficiência de ferro (Sperotto et al. *in press*), A RDA foi a técnica de escolha para a identificação de novas seqüências envolvidas na resposta ao excesso de ferro.

Capítulo 1

**Manuscrito redigido em acordo com o
recomendado para submissão ao periódico
“Plant Cell Reports”**

Representational Difference Analysis of up-regulated genes by iron-excess in rice (*Oryza sativa*) shoots shows overlap between stress response and senescence gene expression

Felipe Klein Ricachenevsky¹, Raul Antonio Sperotto¹, Marcelo Sartori Grunwald¹,
Janette Palma Fett^{1,2}

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia¹ and
Departamento de Botânica², P.O. Box 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

e-mail address: jpfett@cbiot.ufrgs.br

Tel: 55-51-3316-7643

Fax: 55-51-3316-7309

Abbreviations:

ABA: Abscisic Acid – CAB: Chlorophyll a/b Binding Protein – DP: Differential Product
–IRT: Iron Regulated Transporter – LHC: Light Harvest Complex – LRR: Leucine-rich
Repeat Receptor – PSII: Photosystem II – RDA: Representational Difference Analysis –
ROS: Reactive Oxygen Species – RuBisCO: Ribulose 1,5_biphosphate Carboxylase /
Oxydase – SAG: Senescence Associated Gene – YSL - Yellow Stripe Like.

Abstract

Iron is essential for virtually all living forms, and participates in many important reactions in plant metabolism, including photosynthesis. Iron homeostasis in plants is not completely understood, and both iron deficiency and overload are deleterious to plants. Rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) is largely cultivated in submerged conditions, what can lead to severe iron overload. In this work, we used the Representational Difference Analysis (RDA) to isolate sequences up-regulated in response to iron-excess treatment in rice shoots. We isolated 24 sequences, being able to attribute putative functions to 20 of them. Photosynthesis, protein degradation and stress response are the most representative categories. Several genes found are already described as responsive to other stresses, but this is the first report of their up-regulation by iron-excess. We also observed that some genes are related to the senescence process, which has overlapping gene expression with stress-response. We suggest that iron excess-treated rice shoots are entering a senescence program after nine days of treatment, and that some of the genes found are preparing the nutrient salvage pathway that is characteristic of senescing tissues. We also found a WRKY transcription factor up-regulated mostly in the third day of treatment, suggesting that it could be a regulator of the iron excess/senescence response in rice plants.

Keywords. Rice – Iron excess – Representational Difference Analysis – Photosynthesis – Stress Response – Senescence

Introduction

Iron is a transition metal that is essential for virtually all living organisms. Because of a singular capability to gain or lose electrons, it has a crucial participation in metabolic processes like oxi-reductive reactions of photosynthesis, electron transport in respiratory chain and nitrogen assimilation. Although iron metabolism and homeostasis in plants has received more attention in the last years, especially iron uptake by roots, the molecular and physiological aspects of iron homeostasis remain largely unknown.

Iron is very abundant in the soil, but is normally chelated to organic matter in its oxidized and insoluble form, Fe^{+3} , which is not readily available to absorption (Guerinot and Yi 1994). Under iron deficiency, some iron-uptake strategies have been developed. Strategy I, used by all plants except graminaceous species, involves (i) the release of protons into the rhizosphere to lower the soil pH, (ii) the induction of Fe^{+3} -chelate reductase expression to reduce Fe^{+3} to the more soluble Fe^{+2} form, and (iii) the uptake of the resulting Fe^{+2} via an Fe^{+2} transporter. Strategy II, used by graminaceous plants, involves the release of mugineic acid family phytosiderophores from roots, which solubilize the Fe^{+3} chelated in the organic matter, and the absorption of Fe^{+3} -phytosiderophore by a specific transporter (Guerinot and Yi 1994). Rice, although a graminaceous plant, has genes for both strategies (Gross et al. 2003), and takes up iron in both forms: as Fe^{+3} -phytosiderophore, probably mediated by Yellow Stripe Like (YSLs) transportes, typical of the strategy II; and as Fe^{+2} by the Iron Regulated Transporter 1 (IRT1), a strategy I transporter (Ishimaru et al. 2006). Iron defficiency

leads to chlorosis, reduction of photosynthetic machinery and reductions in crop yield (Spiller and Terry 1980).

On the other hand, iron can be very dangerous when in excess into the cell. Free iron can act as a potent generator of reactive oxygen species (ROS), especially the hydroxyl radical, through the Fenton reaction (Becana et al. 1998). This radical is extremely toxic to cell metabolism, leading to oxidation of biological macromolecules like lipids, proteins and nucleic acids, causing membrane leaking and even cell death (Cadenas 1989; Halliwell and Gutteridge 1992). Oxidative stress caused by iron excess in plants was demonstrated in *Nicotiana plumbaginifolia* (Kampfenkel et al. 1995) and in rice (Fang et al. 2001; Yamauchi and Peng 1995). Most plant iron is localized in chloroplasts (Mengel and Kirkby 1982), and therefore it is the first organelle to be damaged by iron excess. Increased cytochrome b6/f content, leading to higher susceptibility of the photosystem II (PSII) to photoinhibition and consequent photosynthesis decrease, was described in pea plants (Suh et al. 2002).

Rice, when cultivated in submerged conditions, is more prone to iron toxicity. This is due to the anaerobic environment imposed by submersion, which lowers the pH and changes the insoluble Fe^{+3} form to the more soluble Fe^{+2} form (Ponnanperuma 1972). This leads to excessive iron absorption and toxicity. In rice, the observed symptoms of iron toxicity are bronzing or yellowing of older leaflets, iron deposition in spots on young leaflets, iron plaque formation in roots, slower of growth rate, decreased grain production and even death (Sahrawat et al. 2004; Ponnamperuma et al. 1955). Two distinct types of toxicity have been described in the literature: a true (or real) iron toxicity – characterized by the accumulation of toxic levels of iron in the plant body (Sahrawat 2000; Olaleye et al. 2001) and a indirect toxicity – a multiple nutritional disorder, caused by deficiency of

other nutrients like Ca, Mg and Zn (Benckiser et al. 1984). This second type is caused by the rice characteristic iron plaque on its root surfaces, which is formed due to oxidation of ferrous to ferric iron and the precipitation of iron oxide/hydroxides on the root surface, blocking or decreasing the absorption of other nutrients (Chen et al. 2006). The experimental conditions used in this work simulate the true iron toxicity.

In this work, we use the cDNA-RDA to isolate sequences up-regulated by iron excess in shoots of rice plants. We found genes related to various cellular functions, including photosynthesis, protein degradation, stress response, sugar and amino acid metabolism, and transcriptional regulation. Some genes are already described to be responsive to other stresses, and some are related to senescence, a process that has common gene expression profiles with stress response. We also found a transcription factor up-regulated at the early phase of stress induction, suggesting a possible regulatory role over other genes.

Material and Methods

Plant growth

Rice seeds (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) from BR-IRGA 409 cultivar were provided by Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA). Seeds were germinated for 4 days in an incubator (28°C, first 2 days in the dark and last 2 days in the light) on petri dishes lined with filter paper soaked in distilled water. After germination and growth in vermiculite and nutrient solution (Yoshida et al. 1976) for 14 days (28°C, with 16 hours of light), plants were transferred to glass pots involved in aluminum foil and containing

500 ml of nutrient solution. Plants (four plants per pot) were kept for 10 days in adaptation solution (modified from Yoshida et al. 1976) containing 3.2 ppm Fe as $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 5.0 ± 0.1 . Plants were then transferred to the control treatment (6.5 ppm Fe as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.0 ± 0.1) or to the iron-excess treatment (500 ppm Fe as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.0 ± 0.1) for additional 3, 6 and 9 days. All solutions were replaced every 3 days. Plants were cultivated in a growth room at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ under white light with a photoperiod of 16 / 8 h light / dark cycle (irradiance of approximately $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

RNA extraction and cDNA synthesis

Rice shoot tissues were harvested from plants grown under control treatment or Fe-excess treatment for 3, 6 and 9 days ($n = 4$ per group). Total RNA was extracted using Trizol (Gibco[®] BRL). RNA quality was assessed by denaturing-condition agarose gel electrophoresis and spectrophotometer analysis. First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen[®] Life Technologies) using 1 μg of RNA (approximately 300 ng from each sampling time: 3, 6 and 9 days, from each treatment). cDNA was then prepared using the SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech[®] Laboratories), according to the manufacturer's instructions, in the presence of RNase OUT (Invitrogen[®] Life Technologies).

Representational Difference Analysis

The cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA) was performed essentially as described by Pastorian et al. (2000) and optimized by Dutra et al. (2004).

Double-stranded cDNA pools were digested with the restriction enzyme Sau3AI (Amershan Pharmacia[®] Biotech). The resulting products were purified using the GFX kit (Amershan Pharmacia[®] Biotech) and ligated to adaptors (RBam12: GATCCTCGGTGA and RBam24: AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG). To provide sufficient amounts of starting material for RDA, the cDNAs were diluted and amplified using RBam24 as a primer (25 cycles of denaturing at 95°C for 45 sec and annealing and extension at 70°C for 3 min). The final PCR products were purified using the GFX kit, resulting in driver cDNA populations from shoots submitted to control treatment and Fe-excess treatment. To generate the tester populations, a small aliquot of each driver was completely digested with Sau3AI to remove RBam adaptors, purified with the GFX Kit and ligated to JBam adaptors (JBam12: GATCCGTTTCATG and JBam24: ACCGACGTCGACTATCCATGAACG).

In order to isolate iron excess-induced sequences, the first differential product (DP1) was obtained by **mixing pre-denaturated control** driver and Fe-excess tester in a 50:1 ratio, in a final volume of 5 µl, followed by hybridization at 67°C for 24 hours and amplification by PCR with JBam24 primer. To minimize single-stranded cDNA linearly amplified, the product of the first seven cycles of amplification was used as template in a new reaction, diluting the unwanted sequences. After purification, DP1 products were digested with Sau3AI to remove JBam adaptors before ligation to NBam adaptors (NBam12: GATCCTCCCTCG and NBam24: AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG). The second hybridization was performed at a ratio of 500:1 (5 µg driver: 10 ng DP1). The second differential product (DP2) was obtained using the same procedure as for DP1, using NBam24 as primer, instead of JBam24.

Cloning and sequence analysis

The DP2 product was purified and cloned into pCR2.1-TOPO Vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) and transformed in *Escherichia coli* XL1 Blue competent cells by electroporation. Individual bacterial clones were grown in 96-well plates. Plasmid DNA was prepared from 192 selected clones and samples were sequenced in the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). The vector sequence was removed manually and the resulting sequences were then matched to rice full-length cDNA clones using the Rice Pipeline (<http://cdna.01.dna.affrc.go.jp/PIPE/>), a unification tool that dynamically integrates data from various rice databases (Yazaki et al. 2004).

Semi-quantitative RT-PCR analysis

For the synthesis of first strand cDNA, 1 µg of total RNA from each time of exposure to the treatment (3, 6 and 9 days of Fe-excess and of control treatment) was reverse transcribed using an oligo-dT primer and Superscript II (Invitrogen® Life Technologies) in 20 µl total volume. The synthesized first strand cDNA was diluted five times and 2 µl were used for PCR analysis with different sets of gene-specific primers. All primers were designed to amplify 150-200 bp of the 3'-UTR of the genes and to have similar T_m values (60 ± 2°C). Table 1 shows all gene-specific primers used in this work. PCR conditions used were 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s in a 50

µl volume. The optimal numbers of PCR cycles were determined for each gene to ensure that amplification occurred in the exponential phase. Obtained PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide to compare the intensity of the bands.

Results

We used the cDNA-RDA technique to find sequences that were up-regulated in shoots of rice plants by iron excess treatment. The control treatment driver and the iron-excess treatment tester were hybridized in a 50:1 proportion to generate the DP1, and a fresh aliquot of control treatment driver was used to be hybridized with DP1 in a 500:1 proportion and generated the DP2. Figure 1 shows all populations and differential products obtained during the procedure. Differences between populations are clear when comparing smears. After the second hybridization, bands are well defined in DP2, indicating enrichment of the differential expressed sequences.

Approximately 200 colonies were isolated and two 96-well plates were grown. Plasmid DNA was extracted and sequenced. Since the overhang sequence resulting from cleavage with *Sau3AI* is the same for all sequences, it is possible that some amplification products ligate each other instead of ligating adaptors, forming chimaeric clones. Nineteen chimaeras were found in 192 sequenced clones, all having two different fragments flanked by adaptors. We included the “chimerical sequences” group in our analysis, because the most frequent sequences were the same as found in the “only-one sequence” group. Table 2 shows the 24 different sequences which are homolog to at least one clone in Rice Pipeline Database. Functional categorization followed the Gene

Ontology Database (www.godatabase.org/) classification. We only show the best E-value found for each different sequence, representing the quality of the similarity (the nearest to zero, the most probable the similarity is not aleatory). Clone numbers are from the best matches found in the Rice Pipeline Database. Redundancy, shown in percentage and in absolute numbers, describe how representative a sequence is in the DP2 subtracted population. The most redundant sequence found is a putative N-terminal acetyltransferase, with 66,83% of sequenced clones.

To confirm the differential expression pattern of sequences, we performed semi-quantitative RT-PCR experiments. For each tested gene, we designed primers based on the best match clone found in the Rice Pipeline Database, choosing portions from the 3' UTR or near to avoid cross-amplification. We show the analysis of expression by RT-PCR of 3, 6 and 9 days of each treatment in separate (T3, T6 and T9), while the cDNA-RDA was performed pooling samples from the three times of exposure in equal amounts. For each gene, we analyzed gene amplification after 20, 25, 30 and 35 cycles for each time of treatment, for both treatments, to compare band intensity only in the exponential phase of amplification. Some sequences were tested after different cycle numbers, to refine the analysis. Actin and ubiquitin were used as internal controls. Figure 2 summarizes the results of semi-quantitative RT-PCR experiments. Eleven sequences were found to be up-regulated by iron-excess from 14 tested.

Discussion

The cDNA-RDA approach was used to find sequences that are directly or indirectly involved in the response to iron-excess treatment after exposure for three

different periods. Obviously, we were more interested in sequences that indicate a direct involvement in the response, like transporters that could allocate the excess metal to subcellular compartments to be stored, proteins or enzymes that could chelate iron, oxidative stress or other stress response genes, transcription factors that could be master regulators of the response, and others. Although there is some information about iron excess stress in plants (Kampfenkel et al. 2005; Suh et al. 2002; Stein et al. personal communication) most of them are focused on physiological data. Other reports point out candidate molecules to perform iron-buffering functions (for ferritin, see Briat and Lobreaux 1998; for nicotianamine, see Pich et al. 2001). Our work is the first attempt to uncover the genes and molecular mechanisms involved in iron stress response in rice plants.

The differential expression pattern of the sequences isolated in our work has been tested by semi-quantitative RT-PCR. Although RT-PCR quantification may be problematic because of the exponential nature of the PCR reaction, it is much more sensitive to detect low amounts of RNA than methods like Northern Blot, RNA Dot Blot or Ribonuclease Protection Assay. With the use of low-variation or so-called “housekeeping” genes as normalization standards, it is possible to demonstrate the differences between cDNA populations (Shin et al. 2004; Zervos et al. 2006).

The most redundant sequence found in our work is a putative N-terminal acetyltransferase. Protein modification is usual in plants under stress. In rice, histone acetylation is described to be involved in alterations in gene expression of other genes after submersion (Tsuji et al. 2006). Protein deacetylation is also involved in response to abiotic stress like drought and high salinity in *Arabidopsis*, and is regulated by abscisic

acid, a common regulator of stress response (Sridha and Wu 2006). However, we could not associate this gene with a more specific function related to iron-excess.

We found three genes up-regulated by iron-excess that are related to photosynthesis, RuBisCO activase, chlorophyll a/b binding protein (CAB) and 10 kDa PSII polypeptide psbR. RuBisCO activase and CAB have been confirmed as differentially expressed. Up-regulation of RuBisCO activase has been previously described for various stresses, like salt stress (Parker et al. 2006), pathogen infection (Xiong et al. 2001), and water stress (Cramer et al. 2006). RuBisCO Activase is a key regulator of photosynthesis, activating RuBisCO by removing sugar phosphates from its active site in an ATP-dependent manner (Portis 1990, Portis 1992). In rice plants under iron excess, our group has observed that the maximum carboxylation rate, electron transport rate and maximum apparent quantum yield are affected (Stein et al. personal communication), decreasing photosynthetic activity. In addition, RuBisCO is known to be degraded (Salekdeh et al. 2002; Mehta 1992) and to decrease its activity in response to stress (Flexas et al. 2006; Parry 2002). Up-regulation of RuBisCO activase could improve photosynthesis efficiency by increasing the amount of RuBisCO that is activated for CO₂ fixation, compensating the reduced photosynthetic rate.

Kampfenkel et al. (1995) described iron-excess effects in *N. plumbaginifolia*, reporting high thylakoid energization, increased PSII reduction and photoinhibition. This is caused by generation of reactive oxygen species (ROS) and photodamage on PSII, impairing the energy flow from light-harvest to the electron transport through photosystems and ATP synthesis. Thus, light irradiance over impaired PSII leads to photodamage and degradation of components of the photosynthetic apparatus (Kampfenkel et al. 1995; Garcia-Lorenzo 2005). The up-regulation of Chlorophyll a/b

Binding Protein (CAB) and 10 kDa PSII polypeptide psbR at the mRNA level, seen in our work, could be a mechanism to compensate protein degradation of the photosynthetic apparatus. Gorantla et al. (2006) found these two mRNAs to be up-regulated in rice in response to drought stress. Increasing CAB could also be increasing chloroplast photoprotection, since CAB is part of the LHCII system, and LHC proteins are described to ligate xanthophylls and participate in chloroplast protection under excess light (Bassi and Caffarri 2000), a stress that causes photoinhibition. On the other hand, Teramoto et al (2002) reported down-regulation of LHCII mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to high light and CO₂ concentration. We believe that CAB is up-regulated in a first attempt to restore the protein degraded due to photoinhibition.

We found three genes (Oryzain Alpha, Rhomboid and E2 Ubiquitin-conjugating enzyme) up-regulated by iron-excess involved in protein degradation. Oryzain and Rhomboid were confirmed by RT-PCR. Oryzain Alpha is a cysteine-protease expressed 5 to 8 days after the start of germination and is regulated by gibberellic acid (GA) (Watanabe et al. 1991). Rhomboid is a serine-protease first described in *Drosophila* (Urban et al. 2001), and is involved in regulated intramembrane proteolysis in *Arabidopsis* (Kanaoka et al. 2005) and in *Drosophila*. It is well documented that protein degradation occurs in senescing plants (Krupinska and Humbeck 2004). Around 7% of the 2500 genes expressed in senescing leaves of *Arabidopsis* plants are proteases (Gepstein et al. 2004), and serine- and cysteine- are two of the representative classes (Guo et al. 2004). Senescence, although occurring in a developmentally programmed manner along a plant's life span, could be triggered by various stresses, such as nutritional and water deficiencies, light deprivation, drought and oxidative stress (Buchanan-Wollaston et al. 2003), as well as by the hormone ethylene (Martínez et al.

2006). The up-regulation of two proteases and of an E2 ubiquitin-conjugating enzyme, observed in our work, agrees with a supposed protein degradation pathway induced by iron excess stress. Furthermore, we found a hydroxymethylglutaril-CoA lyase up-regulated by iron excess. The enzyme catalyses the final steps of leucine degradation, and could be involved in the same pathway as the other three genes. Hydroxymethylglutaril-CoA lyase was not confirmed by RT-PCR.

Three genes related to stress response were isolated. DEAD/DEAH box RNA Helicase and a C2 domain-containing protein (C2 protein) were confirmed as up-regulated by iron-excess stress, while lipoxygenase could not be confirmed. DEAD box RNA helicases are the largest family of RNA helicases (Gong et al. 2005) and are described as responsive to cold stress in *Arabidopsis* (Seki et al. 2001; Gong et al. 2005) and salt stress in *Hordeum vulgare* (Nakamura 2004). One possible role for RNA helicases in stress-response is to stabilize or enhance protein synthesis, which is very sensitive to stress (Vashisht et al. 2006). They could act as RNA chaperones, unwinding RNA secondary structures and protecting mRNA from degradation, which occurs when translation initiation is inefficient (Jones et al. 1996; Sanan-Mishra et al. 2005). A C2 protein has been described as responsive to cadmium and copper toxicity and to be a gene associated with leaf senescence in *H. vulgare* (Ouelhadj et al. 2006). In rice, two small C2 proteins were isolated as cDNAs up-regulated by fungal elicitors, both derived from the same gene by alternative splicing. Evidence suggests that the C2 protein migrates to plasma membrane, recruiting proteins involved in stress response mechanisms (Kim et al. 2003). Lipoxygenase is a lipid-degradation enzyme. This process is common to senescence and some stress responses. The involvement of lipoxygenase has been described in response to oxidative stress in *Phalaenopsis* (Ali et

al. 2005), to cold stress, wounding and pathogen infection in maize (Nemchenko et al. 2006) and related to senescence in leaves (Buchanan-Wollaston et al. 2003). Lipoxygenase was not confirmed as differentially expressed, possibly because the sensibility of the RT-PCR technique was not high enough.

β -D-Glucan exo-hydrolase and β -glucosidase are different enzymes with the same β -glucosides-degradating activity. β -Glucosidase is associated with several stresses, like water deficit in maize (Riccardi et al. 1998), cold, salt and drought in *Arabidopsis* (Kawasaki et al. 2001; Kreps et al. 2002; Seki et al. 2002), blast fungus infection in rice cell suspension-cultures (Kim et al. 2003), brown planthopper infestation in rice leaves (Wang et al. 2005). Matsushima et al. (2003) showed that β -glucosidase is the main compound of endoplasmatic reticulum (ER)-bodies induced by wound stress. The reaction that cleaves β -glucosides is involved in activation of abscisic acid (ABA), a phytohormone critical for plant adaptation to environmental stress (Lee et al. 2006). Also, β -glucosidase is described as a potential senescence-marker gene in *Arabidopsis* (Yoshida et al. 2001).

Two ribosomal proteins were found to be up-regulated by iron excess in our sequencing, although they were not confirmed by RT-PCR. L11 and L27 are part of the 60S ribosome (Pesaresi et al. 2001; Taylor et al. 1994), and could be involved in switching the protein synthesis to produce stress-specific genes.

Protein Bet3 is a component of the transport protein particle (TRAPP) complex, which is involved in vesicular transport through the cytoplasm (Loh et al. 2005). Although it was confirmed as been up-regulated, there was no clear inference of its possible function in iron-excess stress. The same is true for NADH ubiquinone

oxyreductase, involved in the first steps of the mitochondrial respiratory chain (Downs et al. 1998).

The leucine-rich repeat receptor (LRR) is part of the major family of receptor-like kinases in plants, the LRR-RKL family (Shiu and Bleecker 2001). In *Arabidopsis*, a LRR was described as been involved in ABA signaling and possibly in stress response (Osakabe et al. 2005).

We found two transcription factors up-regulated by iron excess. Differential expression of the WRKY transcription factor was confirmed by RT-PCR. WRKY proteins are a super family of transcription factors that are mainly found in higher plants with 74 members in *Arabidopsis* and up to 105 members predicted in rice (Dong et al. 2003). WRKYs was already described as involved in responses to stresses like high salinity in rice shoots (Zhou et al. 2005), water deficit in grapevine (Cramer et al. 2006), sucrose starvation in rice suspension cells (Wang et al. 2006), ozone stress in *Arabidopsis* (Rizzo et al. in press), cold and drought in barley (Marè et al. 2004), combined heat shock and drought in tobacco (Rizhsky et al. 2002) and senescence in *Arabidopsis* (Miao et al. 2004; Robatzek et al. 2007). In our RT-PCR experiments, WRKY is up-regulated mostly in the third day of iron excess treatment. It is tempting to suggest that the WRKY transcription factor is an early regulator of responses to iron excess, up-regulating other genes important to protect the rice plant against the stress. More experiments will be necessary to confirm this hypothesis.

Concluding Remarks

In this work, we isolated 24 sequences up-regulated by iron excess and confirmed the differential expression pattern of eleven of them by semi-quantitative RT-PCR analysis. Although we could not confirm differential expression of all sequences, possibly because the RT-PCR sensibility was not high enough, we were able to make considerations about the genes found and their functional categorization. Almost all genes have already been described to be responsive to other stresses, and many are also responsive to senescence. It has been shown that senescence is a process with extensive overlap with stress responses concerning gene expression profiles (Park et al., 1998; Weaver et al. 1998; Chen et al. 2002) which is probably true for iron-excess stress. So, we suggest that some senescence-associated genes (SAGs) are found in response to iron-excess because they are preparing the plant to undergo senescence. We don't have supporting data to affirm that 9-day iron excess plants are already senescing, although the iron-excess probably leads to senescence. Gregersen and Holm (2007) analyzed the senescence transcriptome in the flag leaves of wheat, and eight genes found to be up-regulated are well correlated with our findings. Further physiological and biochemical studies will be necessary to test this hypothesis. Furthermore, this is the first attempt to describe the description of genes up-regulated by iron excess in plants.

Acknowledgements

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

References

Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(3):213-23.

Becana, M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I (1998) Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected in environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* 201: 137-147.

Bassi R, Caffarri S (2000) Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynthesis Research* 64(2-3):243-56.

Benckiser G, Santiago S, Neue HU, Watanabe I, Ottow JCG (1984) Effect of fertilization on exudation, dehydrogenase activity, iron-reducing populations and Fe⁺⁺ formation in the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to iron toxicity. *Plant and Soil* 79, 305-316.

Briat JF, Lobréaux S, Grignon N, Vansuyt G (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Science* 56, 155-166.

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1(1):3-22.

Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. Annual Review of Biochemistry 58, 79-110.

Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell 14: 559–574.

Chen RF, Shen RF, Gu P, Dong XY, DU CW, Ma JF (2006) Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. Annals of Botany 98: 389–395.

Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EA, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch KA, Schooley DA, Cushman JC (2006) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. Functional & Integrative Genomics In Press.

Dong J, Chen C, Chen Z (2003) Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. Plant Molecular Biology 51(1):21-37.

Downs CA, Heckathorn SA (1998) The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Letters* 3;430(3):246-50.

Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank I S, Vainstein M H, Schrank A (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology* 155: 245-251.

Fang WC, Wang JW, Lin CC, Kao CH (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzymes activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 35, 75-80.

Flexas J, Ribas-Carbo M, Bota J, Galmes J, Henkle M, Martinez-Canellas S, Medrano H (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172(1):73-82.

Garcia-Lorenzo M, Zelisko A, Jackowski G, Funk C (2005) Degradation of the main Photosystem II light-harvesting complex. *Photochemical & Photobiological Science* 4(12):1065-71.

Gepstein S (2004) Leaf senescence--not just a 'wear and tear' phenomenon. *Genome Biology* 5(3):212.

Gong Z, Dong CH, Lee H, Zhu J, Xiong L, Gong D, Stevenson B, Zhu JK (2005) A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 17(1):256-67.

Gorantla M, Babu P, Reddy Lachagari V, Reddy A, Wusirika R, Bennetzen JL, Reddy AR (2007) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of Experimental Botany* 58(2):253-65.

Gregersen PL, Holm PB (2007) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* 5(1):192-206.

Guerinot and Yi (1994) Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiology* 104: 815-820.

Guo G, Cai Z, Gan S (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell & Environment* 27(50): 521-547.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Letters* 307: 108-112.

Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK

(2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant Journal* 45(3):335-46.

Jones PG, Mitta M, Kim Y, Jiang W, Inouye M (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy of Science*. 93(1):76-80.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995) Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia*. Implications to oxidative stress. *Plant Physiology* 107, 725-735.

Kanaoka MM, Urban S, Freeman M, Okada K (2005) An *Arabidopsis* Rhomboid homolog is an intramembrane protease in plants. *FEBS Letters* 24;579(25):5723-8.

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert H J (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13: 889-905.

Kim S T, Cho K S, Yu S, Kim S G, Hong J C, Han C D, Bae D W, Nam M H, Kang KY (2003) Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3: 2368-2378.

Kim CY, Koo YD, Jin JB, Moon BC, Kang CH, Kim ST, Park BO, Lee SY, Kim ML, Hwang I, Kang KY, Bahk JD, Lee SY, Cho MJ (2003) Rice C2-domain proteins are induced and translocated to the plasma membrane in response to a fungal elicitor. *Biochemistry* 42(40):11625-33.

Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129-2141.

Krupinska K, Humbeck K (2004) Photosynthesis and chloroplast breakdown. In: Noode'n LD, ed. *Plant cell death processes*. San Diego, CA: Academic Press, 169–187.

Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126(6):1109-20.

Loh E, Peter F, Subramaniam NV, Hong W (2005) Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science* 118, 1209-1222.

Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L (2004) Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology* 55(3):399-416.

Martinez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guamet JJ (2007) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany* In Press.

Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 33(3):493-502.

Mehta RA, Fawcett TW, Porath D, Mattoo AK (2002) Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 277(4):2810-6.

Mengel K, Kirkby EA (1982) Iron. In *Principles of Plant Nutrition*, 3rd ed. (Edited by K. Mengel and E. A. Kirkby), pp. 473–489. Der Bund Press, Bern, Germany

Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55(6):853-67.

Nakamura T, Muramoto Y, Yokota S, Ueda A., Takabe T (2004) Structural and transcriptional characterization of a salt-responsive gene encoding putative ATP-dependent RNA helicase in barley. *Plant Science* 167:63–70.

Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *Journal of Experimental Botany* 57(14):3767-79.

Olaleye AO, Tabi FO, Ogunkule AO, Singh BN, Sahrawat KL (2001) Effect of toxic iron concentration on the growth of lowland rice. *Journal of Plant Nutrition* 24: 441-457.

Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 17(4):1105-19.

Ouelhadj A, Kusch P, Humbeck K (2006) Heavy metal stress and leaf senescence induce the barley gene HvC2d1 encoding a calcium-dependent novel C2 domain-like protein. *New Phytologist* 170(2):261-73.

Park JH, Oh SA, Kim YH, Woo HR, Nam HG (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 37: 445–454.

Parker R, Flowers TJ, Moore AL, Harpham NV (2006) An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany* 57(5):1109-18.

Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany (London)* 89:833-9.

Pastorian K, Hawell III L, Byus C V (2000) Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analytical Biochemistry* 283: 89-98.

Pesaresi P, Varotto C, Meurer J, Jahns P, Salamini F, Leister D (2001) Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant Journal* 27(3):179-89.

Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G, Schmidt W (2001) Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* 213(6):967-76.

Ponnamperuma FN, Bradfield R, Peech M (1955) Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. *Nature* 175, 265.

Ponnamperuma FN (1972) The chemistry of submerged soils. *Advances in Agronomy* 4, 29-96.

Portis AR, Jr (1990) Rubisco activase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1051, 15-28.

Portis AR, Jr (1992) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 415-437.

Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize . Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology* 117(4):1253-63.

Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130(3):1143-51.

Rizzo M, Bernardi R, Salvini M, Nali C, Lorenzini G, Durante M (2006) Identification of differentially expressed genes induced by ozone stress in sensitive and tolerant poplar hybrids. *Journal of Plant Physiology* In Press.

Robatzek S, Somssich IE (2007) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development* 16(9):1139-49.

Sahrawat KL (2000) Elemental composition of rice plants as affected by iron toxicity under field conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31: 2819-2827.

Sahrawat KL (2004) Iron Toxicity in Wetland Rice and The Role of Other Nutrients. *Journal of Plant Nutrition* 27:1471-1504.

Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2(9):1131-45.

Sanan-Mishra N, Pham XH, Sopory SK, Tuteja N (2005) Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *PNAS* 11;102(2):509-14.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13(1):61-72.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Shinozaki K Y, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of

7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31: 279-292.

Shin JS, Kwon YS, Lee JJ, Kim CW (2004) Isolation of ethanol-induced genes in pancreatic beta-cells by representational difference analysis (RDA). *Experimental & Molecular Medicine* 29;36(1):36-42.

Shiu SH, Bleeker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Science* 98(19): 10763–10768.

Spiller SC, Terry N (1980) Limiting factors of photosynthesis II: iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiology* 65: 121-125.

Sridha S, Wu K (2006) Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Journal* 46(1):124-33.

Suh H, Kim CS, Lee J, Jung J (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology* 75: 513-518.

Taylor MA, Davies HV (1994) Nucleotide sequence of a cDNA clone for a 60S ribosomal protein L27 gene from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiology* 105(3):1025-6.

Teramoto H, Nakamori A, Minagawa J, Ono TA (2002) Light-intensity-dependent expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 130(1):325-33.

Tsuiji H, Saika H, Tsutsumi N, Hirai A, Nakazono M (2006) Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant Cell Physiology* 47(7):995-1003.

Urban S, Lee JR, Freeman M (2001) *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107(2):173-82.

Vashisht AA, Pradhan A, Tuteja R, Tuteja N (2005) Cold- and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. *Plant Journal* 44(1):76-87.

Yamauchi M, Peng XX (1995) Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. *Plant and Soil* 173, 21-28.

Yazaki N, Kojima K, Suzuki K, Kishimoto N, Kikuchi S (2004) The Rice PIPELINE: a unification tool for plant functional genomics. *Nucleic Acids Research* 32: 383-387.

Yoshida S, Forno D A, Cock J H, Gomez K A (1976) *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A (2001) Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 42: 170-178.

Wang X L, He R F, He G C (2005) Construction of suppression subtractive hybridization libraries and identification of brown planthopper-induced genes. *Journal of Plant Physiology* 162: 1254-1262.

Watanabe H, Abe K, Emori Y, Hosoyama H, Arai S (1991) Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *Journal of Biological Chemistry* 266(25):16897-902.

Weaver LM, Gan S, Quirino BF, Amasino RM (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37: 455–469.

Xiong L, Lee MW, Qi M, Yang Y (2001) Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(5):685-92.

Zervos EE, Tanner SM, Osborne DA, Bloomston M, Rosemurgy AS, Ellison EC, Melvin WS, de la Chapelle A. (2006) Differential gene expression in patients genetically predisposed to pancreatic cancer. *The Journal of Surgical Research* 135(2):317-22.

Zhou J, Wang X, Jiao Y, Qin Y, Liu X, He K, Chen C, Ma L, Wang J, Xiong L, Zhang Q, Fan L, Deng XW (2007) Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Molecular Biology*, in press.

Table 1: Gene-specific PCR primers used for semi-quantitative RT-PCR

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Putative N-terminal acetyltransferase	TCTTTTGTTAGCGGCAAAGC	AGTGCCACAGCGTGTCTAT
RuBisCO activase small isoform	CATAGGAGGAGGAGGGCAAG	CGGCTGCTTAAAAGGTGTA
chlorophyll a/b binding protein	CAGTTGCAGCAGTGCATGTAT	CGATCCAAAGAAGCAAAGATG
Oryzain Alpha	TACCCCATCTGCAATGTTCA	GGCTCTGGACGGTCTGATAC
Rhomboid protein-related	CACCTGCCTATGTGCTTTGT	CATCTGGATGGGGATGTCA
ubiquitin-conjugating enzyme E2	GCTGCTGCCATTTCTCCTAC	GCGGGTTATGAACGTGAGTT
Lyxoygenase	TAACGCCCTGCATTATTTCC	GCAACCCCTCTGTGCTACAT
DEAD/DEAH box RNA helicase	ACTGCACTGGCTTTCTCGTT	GTAATGCCTCGTCCGAAACT
C2 domain-containing protein	AAGGTGAAGCAAGACGTGGT	TGCGAGCTATGCAAGACTGT
beta-glucosidase	GCCTACTGGTTCAGGGACAT	TTCATAGCCAGCTCTGATGC
Transport protein particle (TRAPP) component Bet3	CACATGCTGCCTGTTTGTTT	CTACTTGATGCTGCCGTGAA
NADH-ubiquinone oxidoreductase	CAGAGCAAGCCTGAGCACTA	CTCGACAACAGATTGGAGA
Leucine-rich repeat/extensin/phytosulfokine receptor	GCGGAGGAGGACAAGTACAG	CCAAGAGCAACCGAATCAAT
WRKY family protein	CCATCATTTGGACCTCAGAT	TTCTGCATTCTTTGCTTCCA

Table 2. Rice gene sequences up-regulated by iron excess treatment.

Functional Categories	Clone Number (Rice Pipeline)	Description	Redundancy (%)	Best E-value
Protein modification	J013135O21	Putative N-terminal acetyltransferase	133(66,83%)	6e-96
Photosynthesis	J013001C24	RuBisCO activase small isoform	26(13,06%)	1e-140
	001-034-G02	chlorophyll a/b binding protein	4(2,01%)	0.0
	J023063I15	photosystem II 10 kDa polypeptide psbR	1(0,05%)	3e-72
Proteolysis	J013065M08	Oryzain Alpha	6(3,01%)	0.0
	J033029B20	rhomboid protein-related	1(0,05%)	0.0
	J023056A05	ubiquitin-conjugating enzyme E2	1(0,05%)	0.0
Stress Response	J013079G10	Lipoxygenase	4(2,01%)	0.0
	J013048C24	DEAD/DEAH box RNA helicase	1(0,05%)	1e-169
	J033052D22	C2 domain-containing protein	1(0,05%)	2e-73
Sugar Metabolism	J033125I15	beta-D-glucan exohydrolase	3(1,5%)	0.0
	J033117C01	beta-glucosidase	1(0,05%)	1e-173
Amino Acid Metabolism	J013170O18	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	3(1,5%)	1e-156
Protein Synthesis	J013120K02	ribosomal protein L11	2(0,1%)	8e-56
	J033038C19	ribosomal protein L27	1(0,05%)	5e-53
Intracellular Transport	J033122A14	Transport protein particle (TRAPP) component Bet3	1(0,05%)	0.0
Electron Transport	J013066N17	NADH-ubiquinone oxidoreductase	1(0,05%)	1e-173
Cell differentiation/proliferation	J013075O17	Leucine-rich repeat/extensin/phytosulfokine receptor	1(0,05%)	6e-98
Transcription Factors	J013058H19	Myb factor protein	1(0,05%)	0.0
	J033138N11	WRKY family protein	1(0,05%)	2e-74
Unknown	J013002B13	Unknown	2(0,1%)	
	J023112A22	Unknown	2(0,1%)	
	J013129D08	Unknown	1(0,05%)	
	001-105-B04	Unknown	1(0,05%)	

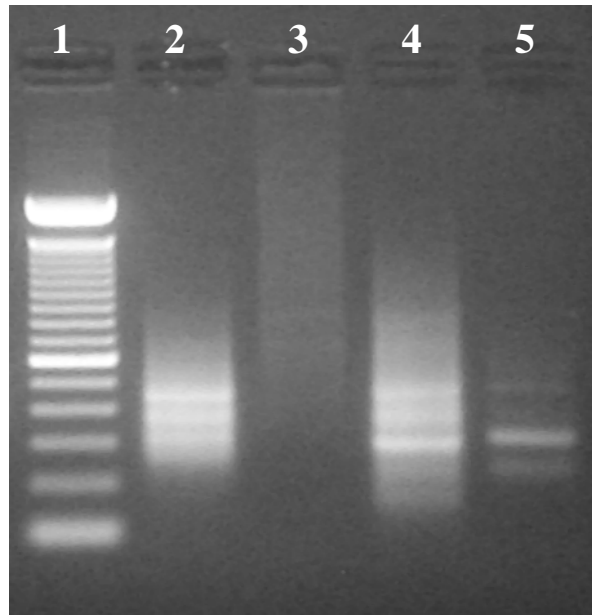


Figure 1: cDNA population used during RDA technique. 100 bp ladder (1), control-treatment driver (2), iron excess-treatment tester (3), DP1(4) e DP2 (5). 1,0% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide.

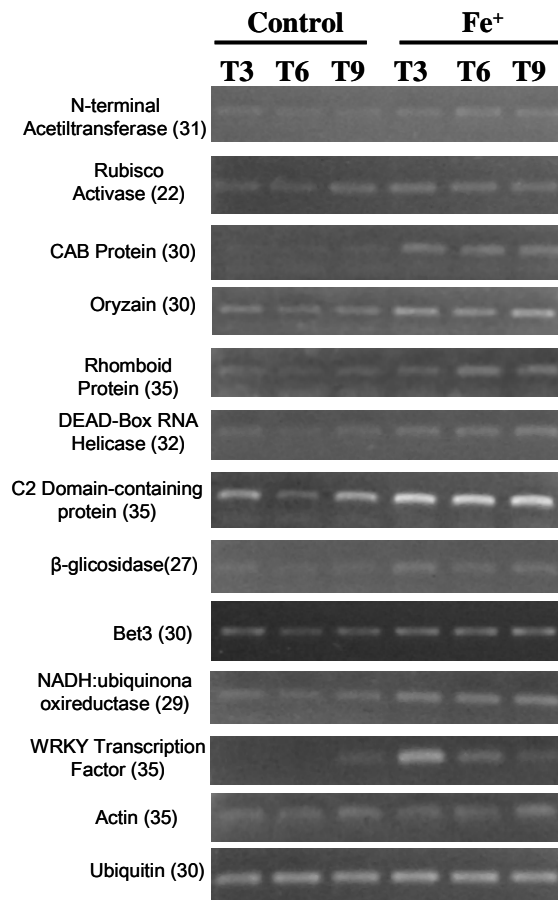


Figure 2: Confirmation of differential expression pattern by semi quantitative RT-PCR. Numbers in parentheses indicate the number of cycles needed to detect the PCR product. Control, control treatment; Fe⁺, iron-excess treatment. 1,0% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide.

Capítulo 2

**Utilização da técnica de Representational
Difference Analysis (RDA) para isolamento de
genes inibidos pelo excesso de ferro em partes
aéreas de plantas de arroz (*Oryza sativa*)**

Utilização da técnica de Representational Difference Analysis (RDA) para isolamento de genes inibidos pelo excesso de ferro em partes aéreas de plantas de arroz (*Oryza sativa*)

Introdução

A técnica de cDNA-RDA permite o isolamento de seqüências específicas de um tratamento ou situação quando em comparação com outro, enriquecendo a amostra para essas seqüências de interesse em detrimento das que são comuns a ambas as situações (Pastorian et al. 2000). Isso é feito através da hibridização de uma população *tester*, que é a de interesse, com uma população *driver*, que é utilizada em excesso para remoção das seqüências em comum. Sendo assim, ao comparar uma população não-tratada como *tester* com uma tratada como *driver*, a amostra será enriquecida para seqüências específicas da população não-tratada, ou seja, aquelas cuja expressão foi diminuída após o tratamento. Neste trabalho, foram realizados experimentos de cDNA-RDA para a identificação de genes inibidos pelo excesso de ferro, os quais podem ter importância na resposta ao estresse. A análise do padrão de expressão gênica das seqüências encontradas foi feita por meio de RT-PCR semi-quantitativa. Os resultados obtidos são apresentados neste Capítulo.

Material e Métodos

Crescimento das Plantas

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) da cultivar BR-IRGA 409 foram cedidas pelo Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA). As sementes foram germinadas por quatro dias em incubadora (a 28°C, sendo os primeiros dois dias no escuro e os dois últimos sob luz constante) em placas de petri sobre papel filtro e embebidas em água destilada. Após a germinação e crescimento em vermiculita e solução nutritiva (Yoshida et al. 1976) por 14 dias (28°C, com 16 horas de luz), as plantas foram transferidas para potes de vidro envolvidos em papel alumínio contendo 500 mL de solução nutritiva. As plantas (4 plantas por pote) foram mantidas por 10 dias em solução de adaptação (modificada de Yoshida et al. 1976) contendo 3.2 ppm Fe, tendo como fonte de ferro FeCl₃.6H₂O e pH 5.0 ± 0.1. Foram então transferidas para o tratamento controle (6.5 ppm Fe tendo como fonte de ferro FeSO₄.7H₂O e pH 5.0 ± 0.1) ou para o tratamento excesso de ferro (500 ppm Fe tendo como fonte de ferro FeSO₄.7H₂O e pH 5.0 ± 0.1) por 3, 6 e 9 dias. Todas as soluções foram trocadas a cada três dias. O experimento foi conduzido sob fotoperíodo de 16 / 8 horas de luz / escuro, com uma irradiância de aproximadamente 60 μmol m⁻² s⁻¹, em temperatura controlada de 26 ± 1°C.

Extração de RNA e síntese de cDNA

As plantas sob os tratamentos controle e excesso de ferro foram coletadas após 3, 6 ou 9 dias de tratamento (n=4 para cada grupo), sendo as partes aéreas separadas das raízes. A extração de RNA total foi feita utilizando-se o reagente Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). A qualidade do RNA foi testada através de eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes e através de análise em espectrofotômetro. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando-se a transcriptase reversa

(Superscript II, Invitrogen, CA, USA) com 1 µg de RNA (aproximadamente 300 ng de cada um dos tempos: 3, 6 e 9 dias, para cada tratamento). Os cDNA foram então preparados com o kit SMART PCR cDNA Synthesis da Clontech[®] Laboratories (Palo Alto, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, na presença de RNase OUT (Invitrogen[®] Life Technologies).

Representational Difference Analysis

A técnica de cDNA *Representational Difference Analysis* (cDNA-RDA) foi usada como descrito por Pastorian et al. (2000), incluindo as otimizações de Dutra et al. (2004). Os *pools* de cDNA dupla-fita foram digeridos com enzima de restrição *Sau3AI* (Amershan Pharmacia[®] Biotech). O produto resultante foi purificado com o kit GFX (Amershan Pharmacia[®] Biotech) e ligado aos adaptadores (RBam12: GATCCTCGGTGA e RBam24: AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG). A fim de obter quantidades suficientes de material, os cDNAs foram diluídos e amplificados, utilizando-se RBam24 como *primer* (25 ciclos, desnaturação a 95°C por 45 segundos, e anelamento e extensão a 70°C por 3 minutos). Os produtos finais do PCR foram purificados com o kit GFX, resultando nas populações de cDNA submetidas a tratamento controle e tratamento excesso de ferro. Essas populações foram chamadas de *drivers*. Para gerar as populações *tester*, uma pequena alíquota dos *drivers* foi novamente digerida com *Sau3AI* para remover os adaptadores RBam, purificada por GFX e ligada aos adaptadores JBam (JBam12: GATCCGTTTCATG e JBam24: ACCGACGTCGACTATCCATGAACG).

Para isolar seqüências inibidas pelo excesso de ferro, o primeiro produto diferencial foi obtido através da mistura de *driver* excesso ferro: *tester* controle em uma proporção de 50:1 (5 µg *driver*: 100 ng *tester*), em um volume final de 5 µl e hibridização a 67°C por 24 horas, seguido de amplificação utilizando-se JBam24 como *primer*. Para minimizar o aumento linear de cDNAs simples fita que possuem adaptadores JBam em apenas uma extremidade (comuns às duas populações), o produto dos sete primeiros foi usado como molde em uma nova reação, diluindo então essas seqüências não-desejadas. Após ser purificado, o primeiro produto diferencial (DP1) foi digerido com *Sau3AI* para remoção dos adaptadores JBam e ligado a adaptadores NBam (NBam12: GATCCTCCCTCG e NBam24: AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG). A segunda hibridização foi feita em uma proporção de 500:1 (5 µg *driver*: 10 ng DP1). O segundo produto diferencial (DP2) foi obtido da mesma maneira que o DP1, utilizando-se NBam24 como *primer* em vez de JBam24.

Clonagem e Seqüenciamento

A DP2 foi purificada e clonada no vetor pCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) e transformada por eletroporação em células competentes de *Escherichia coli* cepa XL1 Blue. Clones individuais foram isolados e cultivados em placas de 96 poços. DNA plasmidial de 192 clones foram preparados e as amostras seqüenciadas no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) utilizando-se o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências do vetor e dos adaptadores foram removidas manualmente e as seqüências resultantes foram comparadas a clones completos de cDNA de arroz, utilizando-se a Rice Pipeline Database (<http://cdna.01.dna.affrc.go.jp/PIPE/>), uma ferramenta que unifica informações de dados de várias bases de dados relacionadas a seqüências de arroz. (Yazaki et al. 2004).

RT-PCR Semi-quantitativo

Para a síntese da primeira fita de cDNA, 1 µg de RNA total de cada tempo de tratamento (3, 6 e 9 dias, tanto para tratamento controle quanto para tratamento com excesso de ferro) foi utilizado. A transcrição reversa foi feita com Superscript II e um oligo-dT como *primer*, em uma reação de 20 µL como volume final. A reação foi então diluída 5 vezes, e 2 µL foram usados para cada reação com *primers* específicos para cada gene. Todos os *primers* foram projetados para amplificar seqüências de 150 a 200 pares de base da região 3' não traduzida e para que tivessem T_M (*melting temperature*) semelhantes ($60 \pm 2^\circ\text{C}$). Na Tabela 1 estão mostrados os *primers* específicos utilizados. As condições das reações foram de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos em um volume final de 50 µl. O número ótimo de ciclos para cada gene foi determinado, garantindo que a análise dos produtos fosse feita ainda durante a fase exponencial de amplificação. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio, nos quais foram comparadas lado-a-lado as intensidades das bandas.

Resultados

A realização deste trabalho tem como objetivo isolar seqüências cuja expressão é diminuída pelo tratamento por excesso de ferro. O *driver* “excesso de ferro” e o *tester* “controle” foram hibridizados em uma proporção 50:1 para gerar a DP1, e uma alíquota nova do *driver* “excesso de ferro” foi usada em uma nova hibridização com a DP1 em uma proporção 500:1, gerando a DP2. A figura 1 mostra todas as populações e produtos diferenciais usados na execução da técnica. Nota-se um padrão de arraste diferente entre as populações *driver*, *tester* e DP1. Após a segunda hibridização, o aparecimento de bandas na DP2 indica o enriquecimento da população com cDNAs diferencialmente expressos, sendo os demais subtraídos.

Duas placas de 96 poços foram preparadas com DNA plasmidial de colônias transformadas e isoladas, e então submetidas ao seqüenciamento. De 192 reações de seqüenciamento, 186 resultaram em seqüências analisáveis. Foram encontradas 15 seqüências diferentes entre si, que possuíam pelo menos um clone com homologia no Rice Pipeline Database. A categorização funcional de cada uma foi feita seguindo a classificação do Gene Ontology Database (<http://www.godatabase.org/>). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2. São mostrados os melhores *E-values* encontrados para cada clone, indicando o grau de confiança na similaridade entre as nossas seqüências e as seqüências do banco (quanto mais próximo de zero, mais provável de que aquela similaridade não seja espúria). Os cálculos de porcentagem de redundância foram feitos sob o total de seqüências válidas, indicando quantas vezes uma mesma seqüência é encontrada na população DP2.

Para confirmar o padrão diferencial de expressão das seqüências encontradas, foram realizados experimentos de RT-PCR semi-quantitativa. Os *primers* projetados

anelam nas porções 3' UTR dos genes ou muito próximos, minimizando os riscos de haver reação cruzada com outros genes similares que não os encontrados em nosso trabalho. A análise da expressão por RT-PCR de cada um dos genes, nos tempos 3, 6 e 9 dias de tratamento é mostrada em separado, enquanto que no cDNA-RDA os três tempos de exposição foram agrupados em quantidades iguais. Para cada gene, nós analisamos a amplificação em 20, 25, 30 e 35 ciclos para cada tempo de tratamento, para ambos os tratamentos, a fim de comparar as intensidades de banda apenas na fase exponencial de amplificação. Algumas seqüências foram testadas após diferentes números de ciclos, para refinar a análise. Actina e ubiquitina foram usadas como controles internos. Na figura 2 estão mostrados os resultados das RT-PCRs semi-quantitativas para três genes, β -glicanase (GLC1), fosfatidil-inositol 3,4 quinase (PIK) e ZIP. Não foi possível confirmar a redução da expressão de nenhum destes genes quando as plantas foram submetidas a excesso de ferro, comparando-se com a expressão no tratamento controle.

Discussão

Os resultados obtidos indicam problemas na obtenção de seqüências inibidas pelo excesso de ferro. Inicialmente, observamos que seqüências já encontradas como sendo ativadas pelo excesso de ferro foram isoladas (RuBIsCO ativase, β -glucosidase e a proteína *Myb*), sendo que as duas primeiras foram confirmadas como sendo ativadas em experimentos de RT-PCR (ver Capítulo 1). Esse fato poderia indicar contaminação da DP2 controle pela DP2 excesso de ferro. Além disso, encontramos uma seqüência genômica, nunca descrita como sendo expressa nos bancos de dados do *Rice Pipeline Database*, como a mais redundante de toda a biblioteca. Como nossas preparações de

RNA total não foram tratadas com DNase, a presença dessa seqüência pode indicar contaminação com DNA genômico não-subtraído.

Grande parte das seqüências encontradas está relacionada com estresse em plantas. RuBisCO ativase e β -glucosidase já tiveram sua relação com estresse comentada no capítulo 1. As proteínas PDI (proteínas dissulfeto-isomerase) são oxirredutases da família das tiorredoxinas, envolvidas no dobramento correto de proteínas no retículo endoplasmático (Meiri et al. 2002). Alguns membros da superfamília PDI-like estão relacionadas à estresse do retículo endoplasmático, aumentando sua expressão em resposta ao mesmo (Houston et al. 2005). β -glicanase (GLC1) já foi bastante descrita como aumentando sua expressão em resposta a diversos estresses, como seca em arroz (Gorantla et al. 2006), seca e alta salinidade em *Vitis vinifera* (Cramer et al. 2006) e dano mecânico em tomate (Wu and Bradford, 2003). Um trabalho mostra que triptofano sintase aumenta sua expressão em resposta a fitoprostanos, produtos não-enzimáticos resultantes de lipoperoxidação, relacionados a estresse oxidativo (Loeffler et al. 2005). O gene glicina desidrogenase / descarboxilase, no entanto, tem sua inibição relacionada a estresse oxidativo em um trabalho em mitocôndrias de ervilha (Taylor et al. 2002).

Ainda assim, foram realizados experimentos de RT-PCR semi-quantitativo para algumas seqüências. GLC1, já descrita como sendo ativada por estresses em geral, se mostrou mais expressa no tempo 3 do tratamento excesso de ferro, ainda tendo alguma expressão nos tempos 6 e 9. Embora apresente expressão no tempo 6 do tratamento controle, claramente a expressão é mais intensa na situação excesso de ferro, se levarmos em conta que os três tempos de exposição foram somados na realização do cDNA-RDA. O mesmo acontece para PIK, cuja expressão também é maior na situação excesso de ferro. O gene ZIP, pertencente à família dos transportadores regulados por

zinco (ZRT) / IRT, é homólogo ao ZIP5 de Arabidopsis, o qual é descrito como tendo a expressão aumentada por deficiência de zinco em parte aérea (Wintz et al. 2003). Nos experimentos de RT-PCR, o transportador parece ser induzido pelo excesso de ferro, e não inibido.

Parece então que obtivemos um conjunto de seqüências que não são inibidas pelo excesso de ferro, mas sim ativadas. Uma possível explicação, já comentada, é a contaminação da DP2 controle com a DP2 excesso de ferro. Isso, no entanto, não explica a presença de outras seqüências, ausentes na DP2 excesso de ferro, também ativadas pelo estresse, como GLC1, PIK e ZIP, e mais outras possivelmente ativadas, tendo em vista sua correlação com outros estresses. O manual da Clontech[®] Laboratories (Palo Alto, CA, USA) para a Hibridização Subtrativa Supressiva (*Suppressive Subtractive Hybridization* – SSH), comenta a possibilidade de, em se comparando duas situações contrastantes, se aquela utilizada como *tester* apresenta um pequeno número de seqüências diferencialmente expressas em relação ao *driver*, é provável que o background aumente. Ou seja, mesmo que a subtração seja realizada de maneira eficiente, serão encontradas seqüências comuns a ambas as populações, sendo difícil garimpar aquelas que são comuns e aquelas que são realmente diferencialmente expressas. O mesmo problema foi observado na tentativa de isolar seqüências inibidas por deficiências de ferro em nosso laboratório (Sperotto et al., não publicado). Talvez seja possível isolar essas seqüências utilizando-se outras técnicas, como o SSH, que normaliza as quantidades dos clones da biblioteca, permitindo o acesso a seqüências raras. A técnica de SSH (Diatchenko et al. 1996) se baseia em princípios semelhantes ao cDNA-RDA, sendo possível que as seqüências encontradas sejam resultantes de um

background alto, devido a uma pequena quantidade de seqüências realmente inibidas pelo excesso de ferro.

Tabela 1: *primers* específicos utilizados nos experimentos de RT-PCR semi-quantitativo

Gene	<i>Primer</i> Forward	<i>Primer</i> Reverse
Photosystem I 20 kDa subunit/PSI-D	GCTCCGCTCCAAGTACAAGA	TTGACCTTCTCCGGGTAGAC
PDI-like protein	ATTTAAGCGTGCCTGGATGT	GTACCAGCAACCCCAATACC
beta 1,3-glucanase (GLC1)	TCACCTCCAATGACCCTAGC	GCAAGCCAGGCAGTATTAGC
glycine dehydrogenase/decarboxylase	TCTCGTTCAGCTTCCCAACT	TTCACCTTTGAACGGGAATG
tryptophan synthase	CCAACAACTGAATGCTTCG	GCCATCAGGATCACCTTCTT
phosphatidylinositol 3 and 4-kinase (PIK)	TCTCCCAGGGTCAAGTGAAG	TCCATTGAAGAGTGGCTTGTC
zinc transporter OsZIP	CAGGAATGGCAGGTTTTTGT	AGTTTCAACCAACGGAGTGG

Tabela 2: Genes encontrados como sendo inibidos pelo excesso de ferro.

Functional Categories	Clone Number (Rice Pipeline)	Description	Redundancy (%)	Best E-value
Unknown	AP005825	Genomic Sequence	146(78,49)	0.0
	J023002B13	Expressed protein	11(5,91%)	1e-142
	001-120-C06	Hypothetical Protein	1(0,53%)	1e-147
Photosynthesis	J023114B22	Photosystem I 20 kDa subunit/PSI-D	5(2,68%)	1e-103
	J013001C24	RuBisCO activase small isoform precursor	2(1,07%)	1e-135
Transcription Factor	J013058H19	Myb factor protein	4(2,15%)	0.0
	J013119H17	Myb DNA binding protein-like	3(1,61)	0.0
Electron Transport (?)	J023022B19	PDI-like protein	4(2,15%)	0.0
Sugar Metabolism	J033112J01	Beta 1,3-glucanase (GLC1)	2(1,07%)	0.0
	J033117C01	Beta-glucosidase	1(0,53%)	1e-12
Amino Acid Metabolism	J013119H17	Glycine dehydrogenase/decarboxylase	2(1,07%)	1e-112
	J023149F17	Tryptophan synthase	1(0,53%)	1e-72
Intracellular Transport	J023063C17	Exocyst subunit EXO70	1(0,53%)	1e-159
Protein Degradation	J023047L02	Phosphatidylinositol 3 and 4-kinase (PIK)	2(1,07%)	1e-143
Transporter	J023071F17	Zinc transporter OsZIP	1(0,53%)	2e-13

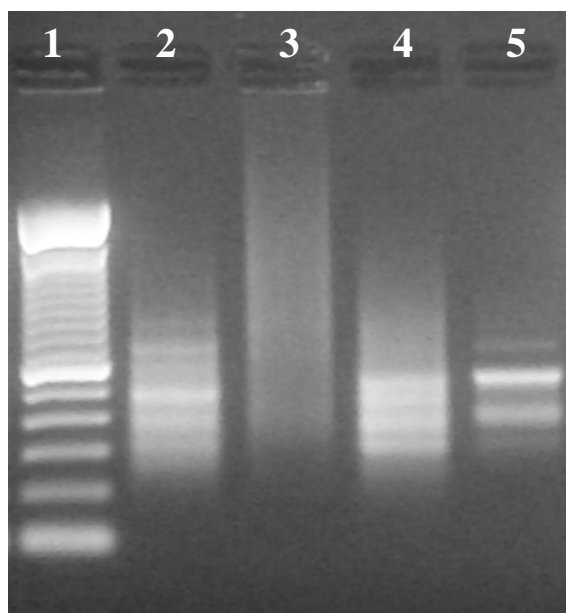


Figura 1: Resultados do RDA. 100 bp ladder (1), *driver* excesso de ferro (2), *tester* controle (3), DP1(4) e DP2 (5) para a situação controle. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio.

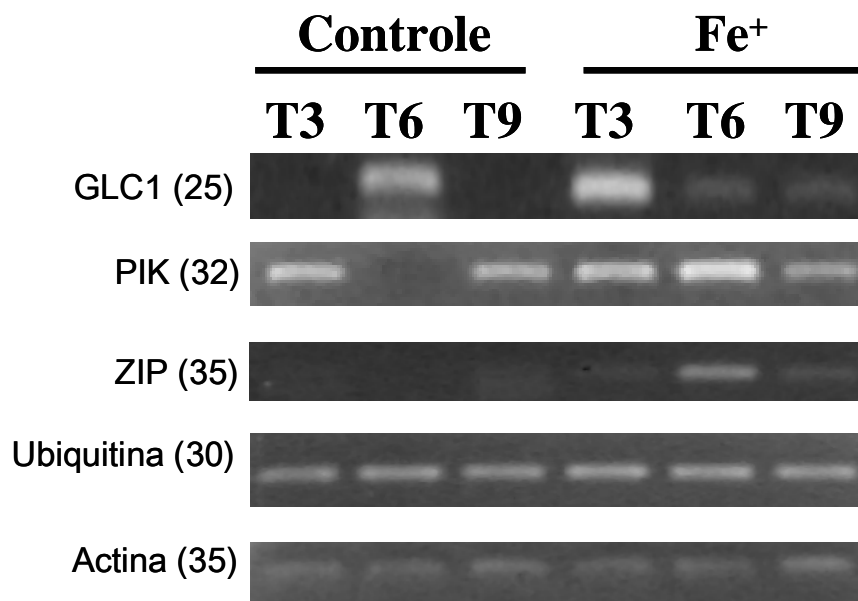


Figura 2: Avaliação do padrão diferencial de expressão das seqüências encontradas através de RT-PCR semi-quantitativo. Os números entre parênteses indicam o número de ciclos usados para detectar o produto de PCR. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio.

Conclusões Gerais

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de cDNA-RDA com o intuito de isolar seqüências envolvidas na resposta ao excesso de ferro em partes aéreas de plantas de arroz, buscando-se tanto seqüências cuja expressão é inibida quanto aquelas cuja expressão é aumentada. As seqüências encontradas tiveram seu padrão diferencial de expressão analisados através de RT-PCR semi-quantitativa. Foi possível confirmar que 11 seqüências têm a expressão aumentada pelo excesso de ferro, enquanto que nenhuma seqüência encontrada como inibida pelo estresse obteve confirmação. Ainda assim, a técnica de RDA é bastante confiável no que diz respeito à presença de falsos positivos, uma vez que as seqüências encontradas como sendo inibidas são provavelmente um ruído de fundo causado pela ausência de um grande número de genes realmente inibidos por esse tratamento. Também foi possível verificar que a técnica de RT-PCR semi-quantitativa, menos sensível que a RT-PCR em tempo real, foi capaz de demonstrar as diferenças no padrão de expressão. Provavelmente alguns dos genes testados e não confirmados o seriam, se esta técnica fosse utilizada. Considerando-se a facilidade de trabalhar-se com a RT-PCR semi-quantitativa, esta técnica se mostra como um boa ferramenta para este tipo de trabalho. Para estudos de expressão gênica mais específicos, no entanto, a utilização de RT-PCR em tempo real deve render resultados melhores.

Referências

Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I (1998) Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected in environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* 201: 137-147.

Becker R, Fritz E, Manteuffel R (1995) Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. *Plant Physiology* 108(1):269-275.

Becker R, Manteuffel R, Neumann D, Scholz G (1998) Excessive iron accumulation in pea mutants *dgl* and *brz*: subcellular localization of iron and ferritin. *Planta* 207:217-223.

Belouchi A, Kwan T, Gros P (1997) Cloning and characterization of the *OsNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Mol. Biol.* 33: 1085-1092.

Briat JF, Lebrun M (1999) Plant responses to metal toxicity. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 322:43-54.

Bode HP, Dumschat M, Garotti S, Fuhrmann GF (1995) Iron sequestration by the yeast vacuole. A study with vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 228(2):337-42.

Cataldo DA, McFadden KM, Garland TR, Wildung RE (1988) Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiol.* 86: 734-739.

Christou, P. Rice Biotechnology and Genetic Engineering. Technomic Publication: Basel, Switzerland. 1994.

Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14: 1347-1357.

Connolly EL, Guerinot ML (2002) Iron Stress in plants. *Genome Biology.* 3(8):1-4.

Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EA, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch KA, Schooley DA, Cushman JC (2006) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & Integrative Genomics*, in press.

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL (2001) Maize *Yellow Stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* 409: 346-349.

Deak M, Horvath GV, Davletova S, Torok K, Sass L, Vass I, Barna B, Kiraly Z, Dudits D (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* 17(2):192-196.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *PNAS* 93(12):6025-30.

DiDonato Jr. RJ, Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL (2004) *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)*: a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J.* 39: 403-414.

Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology* 155: 245-251.

Eide, D.; Broderius, M.; Fett, J.P. & Guerinot, M.L. A novel iron-regulated metal transport from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science* 93:5624-5628, 1996.

Fang WC, Kao CH (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science* 158: 71-76.

Fang WC, Wang JW, Lin CC, Kao CH (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 35: 75-80.

Floyd RA (1983) Direct demonstration that ferrous iron complexes of di- and triphosphate nucleotides catalyze hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 225 : 263-270.

Gaymard F, Boucherez J, Briat JF (1996) Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochemical Journal* 318(1):67-73.

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun W, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TD, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R,

Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 296:92-100.

Gorantla M, Babu P, Reddy Lachagari V, Reddy A, Wusirika R, Bennetzen JL, Reddy AR (2007) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of Experimental Botany* 58(2):253-65.

Gross J, Stein RJ, Fett-Neto AG, Fett JP (2003). Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology* 26:472-497.

Guerinot ML, Yi Y (1994) Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiology* 104: 815-820.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219:1-14.

Hendry GAF, Brocklebnak KJ (1985) Iron-induced oxygen radical metabolism in waterlogged plants. *New Phytology*. 101, 199–206.

Houston NL, Fan C, Xiang JQ, Schulze JM, Jung R, Boston RS (2005) Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family

in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiology* 137(2):762-78.

Howeler RH (1973) Iron-induced orange disease of rice in relation to physicochemical changes in a flooded Oxisol. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 37:898–903.

Hubank M, Schatz D (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research* 22: 5640-5648.

Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsubishi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant Journal* 45(3):335-46.

Jayawardena SDG, Watabe T, Tanaka K (1977) Relation between root oxidizing power and resistance to iron toxicity. *Rep. Crop Sci. Soc. Breed. Kinki, Japan.* 22:38–47.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995) Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia*. Implications to oxidative stress. *Plant Physiology* 107, 725-735.

Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J.* 39: 415-424.

Kozian DH, Kirschbaum BJ (1999) Comparative gene-expression analysis. *Trends in Biotechnology* 17: 73-77.

Krüeger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R (2002) A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* 277: 25062-25069.

Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Brygoo HB, Thomine S (2005) Mobilization of vascular iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24: 4041-4051.

Lisitsyn NA, Lisitsyn N, Wigler M (1993) Representational Difference Analysis: finding differences between genomes. *Science* 259: 946-951.

Lobréaux S, Thoiron S, Briat JF (1995) Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *Plant Journal* 8 (3), 443–449.

- Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiology* 137(1):328-40.
- Marentes E, Grusak MA (1998) Iron transport and storage within the seed coat and embryo of developing seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Seed Science Research* 8:367-375.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, USA.
- Meiri E, Levitan A, Guo F, Christopher DA, Schaefer D, Zryd JP, Danon A (2002) Characterization of three PDI-like genes in *Physcomitrella patens* and construction of knock-out mutants. *Molecular Genetics & Genomics* 267(2):231-40.
- Neue HU, Quijano C, Senadhira D and Setter T (1998) Strategies for dealing with micronutrient disorders and salinity in lowland rice systems. *Field Crops Res.* 56, 139-155.
- Olaleye AO, Tabi FO, Ogunkule AO, Singh BN, Sahrawat KL (2001) Effect of toxic iron concentration on the growth of lowland rice. *Journal of Plant Nutrition* 24, 441-457

Ottow JCG, Benckiser G, Watanabe I (1982) Iron Toxicity of Rice as a Multiple Nutritional Soil Stress. Trop Agric. Res. Ser. 15:167-179.

Pastorian K, Hawell III L, Byus CV (2000) Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. Analytical Biochemistry 283: 89-98.

Petit JM, Briat JF, Lobreaux S (2001) Structural and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* gene family. Biochemical Journal 359:575-582.

Petit JM, Van Wuytswinkel O, Briat JF, Lobreaux S (2001) Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. Journal of Biological Chemistry 276(8):5584-5590.

Ponnamperuma FN, Bradfield R, Peech M (1955) Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. Nature 275: 265.

Ponnamperuma FN (1972) The chemistry of submerged soils. Advances in Agronomy 24: 29-96.

Proudhon D, Wei J, Briat JF, Theil EC (1996) Ferritin gene organization: differences between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *Journal of Molecular Evolution* 42:325-336.

Raguzzi F, Lesuisse E, Crichton RR (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 231(1):253-8.

Rausser WE (1990) Phytochelatins. *Annual Reviews of Biochemistry* 59:61-86.

Robinson NJ, Sadjuga, Groom QJ (1997) The froh gene family. from *Arabidopsis thaliana*: Putative iron-chelate reductases. *Plant Soil* 196:245–248

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ (1993) Plant metallothioneins. *Biochemical Journal* 295:1-10.

Rouault TA, Tong WH (2005) Iron-Sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 345-351.

Sahrawat KL (2004) Iron Toxicity in Wetland Rice and The Role of Other Nutrients. *Journal of Plant Nutrition* 27:1471-1504.

Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, Von Wirén N (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotinamine-chelated metals. *Journal of Biological Chemistry* 279:9091-9096.

Scholz G, Becker R, Pich A, Stephan UW (1992) Nicotianamine – a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: a review. *J. Plant Nutr.* 15, 1647–1665.

Shimamoto K, Kyojuka J (2001) Rice as a model for comparative genomics in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 399-419.

Stephan UW, Schmidke I, Stephan VW, Scholz G (1996) The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals* 9:84–90.

Suh HJ, Kim CS, Lee JY, Jung J (2002) Photodynamic Effect of Iron Excess on Photosystem II Function in Pea Plants. *75(5):* 513-518.

Tadano T (1975) Devices of rice roots to tolerate high iron concentration in growth media. *Japanese Agricultural Research Quart (JARQ)*. 9(1):34–39.

Tadano T, Yoshida S (1978) Chemical changes in submerged soils and their effect on rice growth. *Soils and Rice*. International Rice Research Institute: Manila, Philippines. 399–420.

Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, 2^a ed.

Tanaka AR, Loe R, Navasero A (1966) Some Mechanisms Involved in the Development of Iron Toxicity Symptoms in the Rice Plant. *Soil Science and Plant Nutrition*. 12:158-164.

Taylor NL, Day DA, Millar AH (2002) Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 277(45):42663-8.

Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder J I, Barbier-Brygoo H (2003) *AtNRAMP3*, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J*. 34: 685-695.

von Wiren N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* 119(3):1107-14.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Yoshida S (1981) Growth and development of the rice plant. In: Fundamentals of Rice Crop Science. The International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp 1-61

Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Yajun Deng BL, Yan Zhou LD, Zhang X, Jing Liu MC, Jiabin Tang JS, Xiaobing Huang YC, Chen Ye WL, Lijuan Cong WT, Yujun Han JG, Wei Li LL, Xiangang Huang GH, Jian Li WL, Long Li ZL, Qiuhui Qi JL, Li Li JL, Xuegang Wang TL, Tingting Wu HL, Peixiang Ni MZ, Wei Dong MM, Xiaoli Feng XR, Xianran Li PC, Xin Xu HW, Zhao Xu WZ, Sijie He HW, Jichen Xu JZ, Xianwu Zheng KZ, Wanyong Zeng JD, Jia Ye LT, Xide Ren LT, Jun He XC, Wei Tian DL, Hongai Xia CT, Gang Li QB, Ting Cao HG, Wenming Zhao JW, Wei Chen PL, Yong Zhang XW, Jing Wang JH, Jian Yang SL, Yuqing Xiong GZ, Long Mao ZL, Zhen Zhu CZ, Bailin Hao RC, Shouyi Chen WS, Guojie Li WG, Ming Tao SL, Lihuang Zhu JW, Yuan L, Yang H (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). Science 296:79-92.

Waters BM, Blevins DG, Eide DJ (2002) Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition. Plant Physiol. 129, 85-94.

Waters BM, Chu HH, DiDonato Jr. RJ, Roberts LA, Eislely RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. Plant Physiol. 141: 1446-1458.

Wintz H, Fox T, Wu Y Y, Feng V, Chen W, Chang H S, Zhu T, Vulpe C (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278: 47644-47653.

Wu CT, Bradford KJ (2003) Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiology* 133(1):263-73.

Wuytswinkel OV, Vansuyt G, Grignon N, Fourcroy P, Briat JF (1999) Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant Journal* 17 (1), 93–97.

Zhang X, Zhang F and Mao D 1999 Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake. *Plant Soil* 209, 187-192.