

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Análise funcional dos genes *OsZIFL4* e *OsZIFL9* em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)

Edilena Reis Sperb

Trabalho apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de
Ciências Biológicas.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Janette Palma Fett
Co-orientação: Felipe Klein Ricachenevsky
Porto Alegre, junho de 2010

AGRADECIMENTOS

À professora Janette Fett pela oportunidade e pela orientação.

A todos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial ao Felipe Ricachenevsky (pela co-orientação, dicas, idéias, conselhos e até mesmo pelos sustos), ao Vinícius (por ter mandado diversas vezes figuras e artigos importantes para o trabalho), à Paloma (pela ajuda com a recombinação) e à Karina, cuja amizade tem sido muito importante para mim no tempo que estou no laboratório.

Ao Dr. Felipe Maraschin e à professora Luciane Passaglia por terem aceitado o convite para participar na banca examinadora.

A todos os amigos.

Ao meu namorado, Felipe Marranghello, pela paciência, compreensão e pelas vezes que ele fingiu entender o que eu estava explicando sobre o meu trabalho.

À minha família, em especial a minha mãe Solange.

RESUMO

Ferro e zinco são micronutrientes essenciais para o desenvolvimento de todas as plantas. Porém, quando em excesso, ambos se tornam tóxicos, levando à redução da biomassa, clorose, estresse oxidativo e inibição do crescimento das raízes. Portanto, as plantas desenvolveram mecanismos para lidar tanto com a deficiência quanto com o excesso desses micronutrientes. Ferro e zinco também são micronutrientes essenciais para a saúde humana. Uma melhor compreensão dos mecanismos de absorção, transporte e armazenamento de ferro e zinco nas plantas poderá auxiliar programas de biofortificação que buscam aumentar o conteúdo desses micronutrientes nas plantas consumidas pela população humana.

Foi descrito, em *Arabidopsis thaliana*, um gene cuja expressão é induzida por excesso de zinco, denominado *ZINC-INDUCED FACILITATOR1* (*AtZIF1*). Mutações nesse gene alteram a distribuição de zinco na planta. Sua expressão, além de ser induzida por excesso de zinco, também é induzida por deficiência de ferro. Treze membros pertencentes à família *ZIF-like* (*ZIFL*) foram identificados pelo nosso grupo no genoma do arroz. Os genes *OsZIFL4* e *OsZIFL9*, localizados nos cromossomos 11 e 12 respectivamente, foram originados a partir de um evento de duplicação, apresentando 92% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos. Em nosso laboratório, foi constatado que os genes *OsZIFL4* e *OsZIFL9* apresentam, respectivamente, 9 e 10 sequências para ligação de IDEF1, fator de transcrição de resposta à deficiência de ferro.

Foram realizados experimentos para verificar se os genes *OsZIFL4* e *OsZIFL9* são mais expressos em excesso de zinco e deficiência de ferro. A expressão desses dois genes foi avaliada em diferentes órgãos de plantas de arroz no estágio vegetativo (raízes, caules e folhas) e em panículas em diferentes fases do estágio reprodutivo (R3, R5 e R7). Apenas o gene *OsZIFL4* teve expressão induzida em excesso de zinco e deficiência de ferro, indicando que o gene *OsZIFL4* pode codificar um transportador de ferro ou de zinco. As análises de expressão nos diferentes órgãos revelaram que o gene *OsZIFL4* é mais expresso em raízes, enquanto o gene *OsZIFL9* é mais expresso em panículas. Esses resultados indicam que um processo de subfuncionalização desses dois genes pode ter começado a ocorrer após o evento de duplicação. Mais experimentos são necessários para comprovar essas hipóteses.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Arroz	1
1.2. Zinco na nutrição vegetal	1
1.3. Zinco na nutrição humana	4
1.4. Ferro na nutrição vegetal	5
1.5. Ferro na nutrição humana	7
1.6. Biofortificação	8
1.7. Família ZIF	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Análises por RT-PCR quantitativo	14
3.1.1. Coleta das plantas crescidas a campo	14
3.1.2. Cultivo de plantas em laboratório	14
3.1.3. Extração de RNA, síntese de cDNA e reações de RT-PCR quantitativo	15
3.1.4. Análises estatísticas	15
3.2. Recombinação em <i>Escherichia coli</i>	16
3.2.1. Obtenção e clivagem do plasmídeo	16
3.2.2. Adição das sequências de recombinação	16
3.2.3. Recombinação	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Análises por RT-PCR quantitativo	19
4.2. Recombinação em <i>Escherichia coli</i>	21
4.2.1. Obtenção e clivagem do plasmídeo	21
4.2.2. Adição das sequências de recombinação	22
4.2.3. Recombinação	22
5. DISCUSSÃO	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a base da dieta para a metade da população mundial e provê 20% da energia consumida por seres humanos. Esse cereal é o principal componente da dieta em dezessete países da Ásia e do Pacífico, nove países nas Américas do Sul e do Norte e oito países da África (FAO, 2004). Devido à sua proeminência na dieta de países em desenvolvimento, o arroz tem sido um importante alvo de pesquisa na área de biofortificação, já que a produção de linhagens com maior conteúdo de nutrientes – tais como ferro, zinco e vitamina A – poderá ter um impacto significativo na solução do problema da má nutrição (HarvestPlus, 2006).

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11,1 milhões de toneladas por ano para um consumo de 11,7 milhões de toneladas. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz no Brasil, sendo responsável por 62,2% da produção nacional dessa cultura (IBGE, 2010).

1.2. Zinco na nutrição vegetal

As plantas necessitam de um conjunto de nutrientes minerais essenciais, sem os quais elas são incapazes de completar o seu ciclo de vida (Marschner, 1995). Esses nutrientes minerais são tradicionalmente classificados em macro e micronutrientes, dependendo da quantidade exigida para o desenvolvimento normal da planta. Os micronutrientes são necessários em quantidades relativamente pequenas, mas críticas para o funcionamento correto do metabolismo: entre 5 e 100 mg kg⁻¹ (Alloway, 2004).

O zinco é um dos oito micronutrientes essenciais para as plantas. Ele é o metal de transição mais abundante nos organismos depois do ferro, e é o único metal representado em todas as seis classes de enzimas (Broadley *et al.*, 2007). Em solução, contrastando com o Fe^{+2} e o Cu^{+2} , o zinco existe num estado de oxidação +2 e é redox-estável sob condições fisiológicas (Barak & Helmke, 1993). Desse modo, o zinco, em sistemas biológicos, só existe na forma Zn^{+2} e não participa de reações de oxirredução (Maschner, 1995).

As funções metabólicas do zinco são baseadas na sua forte tendência a formar complexos tetraédricos com os ligantes nitrogênio (N), oxigênio (O) e, principalmente, o enxofre (S). Três sítios primários de ligação para o Zn^{+2} em proteínas são reconhecidos: estrutural, catalítico e cocatalítico (Maret, 2005). Nos sítios estruturais, o zinco garante o dobramento correto da proteína. Nos sítios catalíticos, o zinco está diretamente envolvido na função catalítica da enzima. Em sítios cocatalíticos, o zinco pode ser utilizado para funções catalíticas, reguladoras e estruturais. Mais de setenta metaloproteínas contendo zinco já foram identificadas (Barak & Helmke, 1993), entre elas: álcool desidrogenase, anidrase carbônica, CuZn-superóxido dismutase, fosfatase alcalina, fosfolipase, carboxipeptidase e RNA polimerase.

Esse papel do zinco como componente integral de diversas enzimas torna esse elemento crucial para vários processos metabólicos na planta, tais como a fotossíntese, síntese protéica, manutenção da integridade da membrana, metabolismo de auxina e reprodução. Uma das funções mais conspícuas do zinco está relacionada com a regulação da expressão gênica: vários fatores de transcrição dependem da presença do zinco para formar o motivo dedo-de-zinco, reconhecer seqüências de DNA específicas e ativar a transcrição (Alberts *et al.*, 1998; Brown, 2006).

Os sintomas característicos mais visíveis da deficiência de zinco são crescimento reduzido e folhas cloróticas, necróticas e mal formadas. Várias mudanças bioquímicas também podem ser relacionadas à deficiência de zinco: redução da atividade fotossintética, produção de radicais livres, diminuição da síntese protéica, redução dos níveis do fitormônio ácido indol-acético, entre outras.

As plantas obtêm todo o zinco de que necessitam a partir do solo. Contudo, muitas condições do solo podem resultar em quantidades insuficientes de zinco disponível. Por exemplo, solos arenosos geralmente têm um baixo conteúdo total de zinco, e solos calcáreos possuem um pH alcalino que diminui a disponibilidade desse metal (Alloway, 2004). Solos inundados por longos períodos de tempo, como nas plantações de arroz irrigado, produzem condições redutoras. Isso pode levar a uma redução no pH e a uma alta concentração de íons bicarbonato, o que também inibe a captura de zinco pelas plantas (Marschner, 1995).

A raiz é o principal órgão de captura de nutrientes minerais nas plantas. Aparentemente, a maioria do zinco parece ser obtida como um cátion divalente (Zn^{+2}); e em pH alto, possivelmente também é obtido como um cátion monovalente ($ZnOH^+$) presentes na solução do solo (Marschner, 1995). Porém, foi proposto que as raízes também podem absorver o zinco quelado a fitossideróforos (Zhang *et al.*, 1991). Fitossideróforos são aminoácidos não-protéicos que podem ser excretados na rizosfera para mobilização de metais insolúveis. Inicialmente, a liberação de fitossideróforos foi descrita como um mecanismo para mobilizar o Fe^{+3} presente no solo em compostos inorgânicos insolúveis (Marschner & Romheld, 1994). Contudo, descobriu-se que os fitossideróforos liberados por raízes de gramíneas podem ligar-se não só ao Fe^{+3} , como também efetivamente quelam Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} (Buchanan *et al.*, 2000).

1.3. Zinco na nutrição humana

O zinco é um micronutriente essencial não só para as plantas, mas também para os animais, incluindo os seres humanos. Já foram identificadas mais de trezentas enzimas que contem zinco e estão envolvidas em processos metabólicos básicos nos seres humanos. Portanto, um consumo adequado desse mineral é necessário para o crescimento e reprodução normais (FAO/WHO/IAEA, 1996). Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja sob risco de consumo insuficiente de zinco, condição que pode resultar em vários problemas de saúde, entre os quais destacam-se o crescimento retardado, a imaturidade sexual, problemas cognitivos e a imunodepressão (IZiNCG, 2004). A deficiência de zinco em humanos é a terceira mais importante no mundo, depois das deficiências de ferro e vitamina A (Hambidge, 2000).

As pessoas obtêm todo zinco de que necessitam através da dieta. Plantas deficientes em zinco geralmente têm baixas concentrações de zinco nos tecidos, e essa deficiência acaba afetando também os consumidores primários e secundários das plantas. Muitos produtos alimentícios são derivados diretamente de plantas, incluindo cereais como o arroz, o trigo, o milho e o sorgo. Mas é importante notar que o conteúdo de zinco de produtos animais também é afetado pelas relações solo-planta, pois ruminantes consomem pasto e outros animais (e.g. suínos e aves) consomem cereais. Portanto, a deficiência de zinco não só reduz a produtividade agrícola (Fageria *et al.*, 2002), como também reduz o valor nutricional de grãos e produtos animais consumidos por humanos (Alloway, 2004).

1.4. Ferro na nutrição vegetal

O ferro é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas (Morrisey & Guerinot, 2009), fazendo parte de centros de oxiredução de proteínas essenciais para a fotossíntese e respiração (Gross *et al.*, 2003). Sua deficiência afeta o desenvolvimento das plantas, inibindo o crescimento do meristema apical, além de gerar zonas de clorose intervenal, podendo levar à morte celular em casos severos. Mas, ao mesmo tempo, o ferro é altamente reativo e tóxico por meio da reação de Fenton (Morrisey & Guerinot, 2009). Portanto, as plantas desenvolveram mecanismos para lidar tanto com a deficiência quanto com a falta do ferro.

Embora o ferro seja o elemento mais abundante na crosta terrestre, sua disponibilidade para as raízes das plantas é muito baixa. Isso acontece porque, em solos aerados ou com alto pH, o ferro é rapidamente oxidado, formando óxidos férricos insolúveis. Em baixo pH, o ferro está livre dos óxidos, tornando-se mais disponível para a absorção pelas raízes das plantas (Morrisey & Guerinot, 2009).

A incorporação do ferro entre os constituintes celulares requer a redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} . Dependendo da origem filogenética da espécie, este processo acontece fora da célula ou dentro do citoplasma (Schmidt, 2003). Em gramíneas, há a secreção de quelantes pela planta. Esses quelantes (fitossideróforos, por exemplo) formam um complexo de alta afinidade com o ferro III, propiciando a entrada do ferro quelado por meio de transportadores específicos (estratégia II) (Römheld & Marschner, 1986). Na estratégia I, utilizada principalmente por dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas, a mobilização do ferro acontece por meio de uma ação combinada entre H^+ -ATPases, que realizam a extrusão de prótons, e ferro-quelato redutases, que realizam a redução do Fe^{+3} quelado a Fe^{+2} , para então o Fe^{+2} ser absorvido pelas raízes das plantas por meio de

transportadores específicos (Robinson *et al.*, 1999). As duas estratégias de absorção de ferro requerem diferentes sistemas de absorção (Schmidt, 2003), sendo que estes sistemas possuem a capacidade de se adaptar às diferentes condições de disponibilidade de ferro no solo. Em gramíneas, por exemplo, tanto o efluxo de fitossideróforos quanto o nível de transportadores Yellow Stripe 1 (YS1), que é um componente celular relacionado ao transporte do complexo Fe^{+3} -fitossideróforo (Curie *et al.*, 2001), são fortemente induzidos por deficiência de ferro (Currie *et al.*, 2001; Mori, 1999).

Nos anos 1990, foram identificados alguns componentes moleculares relacionados às duas estratégias (Gross *et al.*, 2003). O gene que codifica o transportador de Fe^{+2} relacionado à estratégia I, o *Iron Regulated Transporter 1 (IRT1)*, de *Arabidopsis thaliana*, foi utilizado na complementação funcional de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente na aquisição de ferro (Eide *et al.*, 1996). A enzima ferro-quelato redutase, também relacionada à estratégia I, foi identificada em *A. thaliana* (AtFRO2) (Robinson *et al.* 1999) e mais tarde em ervilha (PsFRO2) (Waters *et al.*, 2002).

Após entrar na epiderme, o ferro é ligado a quelantes. O ferro move-se simplasticamente através dos citoplasmas das células das raízes, difundindo-se ao longo do gradiente de concentração (Marschner, 1995). No periciclo, o ferro é levado para o xilema e se move em direção às folhas em consequência da corrente transpiratória (Morrisey & Guerinot, 2009).

O vacúolo é o reservatório mais importante de ferro em *A. thaliana*. Desempenha um importante papel no estoque e liberação de ferro em resposta aos níveis citosólicos deste metal (Morrisey & Guerinot, 2009). Para realizar essas funções, são necessários transportadores vacuolares de ferro. Em *A. thaliana*, VIT1 transporta Fe^{+2} para dentro do vacúolo e é expresso na vasculatura, especialmente durante o desenvolvimento do embrião

e das sementes (Kim *et al.*, 2006). Nesta mesma espécie, NRAMP3 e NRAMP4 também são transportadores vacuolares, mas realizam o transporte do ferro para o exterior dos vacúolos (Lanquar *et al.* 2005). Considerando que os vacúolos desempenham um papel essencial na estocagem do ferro, mecanismos de transporte vacuolar também são importantes para evitar tanto a deficiência quanto a toxidez por excesso deste micronutriente.

1.5. Ferro na nutrição humana

O ferro também é um micronutriente essencial para os seres humanos. Por causa da sua capacidade de doar e receber elétrons, o ferro serve como cofator para muitas proteínas contendo complexos heme, *clusters* de ferro-enxofre e outros grupos prostéticos (Theil, 2004). Essas proteínas estão envolvidas em vários processos fisiológicos nos seres humanos, como transporte de oxigênio e respiração.

A deficiência nutricional de ferro ocorre quando as quantidades necessárias não são supridas pela dieta. A biodisponibilidade do ferro é baixa em populações que possuem a dieta baseada em produtos de origem vegetal. A alta incidência da deficiência de ferro nos países em desenvolvimento causa prejuízos substanciais para a saúde humana e para a economia, incluindo problemas durante a gestação, redução no rendimento escolar e queda na produtividade (Zimmermann & Hurrell, 2007). A deficiência de ferro é o problema nutricional mais prevalente no mundo. Entre 4 e 5 bilhões de pessoas sofrem de deficiência de ferro e há estimativas de que aproximadamente 2 bilhões de pessoas sejam anêmicas. Mulheres e crianças geralmente são mais vulneráveis: 50% das mulheres grávidas e de 40% a 50% das crianças abaixo dos 5 anos em países em desenvolvimento apresentam deficiência de ferro (UNICEF, 2010).

A deficiência de ferro também é comum em mulheres e crianças em países industrializados. No Reino Unido, 21% das mulheres entre 11 e 18 anos e 18% das mulheres entre 16 e 64 anos apresentam deficiência de ferro. Nos Estados Unidos, 9-11% das mulheres não gestantes com idades entre 16 e 49 anos são portadoras de deficiência de ferro, sendo que 2-5% são portadoras de anemia decorrente da deficiência de ferro, com frequência maior em populações minoritárias, mais pobres e com menor nível de escolarização. Na França, a deficiência de ferro e a anemia decorrente da deficiência de ferro afetam 29% e 4% das crianças com idade abaixo de 2 anos, respectivamente e, nos Estados Unidos, 2% das crianças com idade entre 1 e 2 anos apresentam anemia decorrente da deficiência de ferro (Zimmermann & Hurrell, 2007).

Existem três estratégias principais que podem ser utilizadas com a finalidade de corrigir a deficiência de ferro nas populações, sozinhas ou em combinação: modificação e diversificação da dieta, suplementação e a biofortificação em alimentos por meio de melhoramento clássico ou engenharia genética (Zimmermann & Hurrell, 2007).

1.6. Biofortificação

Grãos não perecíveis, em especial grãos de cereais, são fontes pobres em micronutrientes. Como resultado, as populações mais pobres, que geralmente obtêm alimento por meio de monoculturas, são populações mais vulneráveis às doenças provenientes da deficiência mineral. Várias estratégias têm sido propostas para lidar com a deficiência de micronutrientes, incluindo a suplementação, a fortificação de alimentos processados, a biofortificação, através da aplicação de fertilizantes, e a implementação de

programas de cruzamentos e de engenharia genética com a finalidade de gerar grãos ricos em nutrientes minerais (Gómez-Galera *et al.* 2010).

Uma vez que as intervenções convencionais possuem um impacto limitado, a biofortificação tem sido proposta como uma alternativa de longo prazo para melhorar a nutrição mineral (Zhu *et al.* 2007). O foco da biofortificação é não apenas aumentar as concentrações de minerais nos grãos, mas também aumentar a biodisponibilidade desses minerais. O aumento das concentrações pode ser obtido por meio de intervenções agronômicas, cruzamentos ou engenharia genética, enquanto o aumento da biodisponibilidade desses minerais somente pode ser obtido por meio de cruzamentos ou engenharia genética (Gómez-Galera *et al.* 2010).

O melhoramento clássico e a engenharia genética são comparados porque ambos envolvem a criação de linhagens de plantas contendo genes que favorecem o acúmulo de minerais biodisponíveis. A principal vantagem dessas duas técnicas para o aumento de minerais é que os grandes investimentos são necessários apenas nas etapas de pesquisa e desenvolvimento, e, após isso, as culturas enriquecidas são inteiramente sustentáveis. Porém uma desvantagem dos cruzamentos é que são limitados a plantas sexualmente compatíveis, enquanto a engenharia genética não possui limitações taxonômicas, sendo que até mesmo genes artificiais podem ser utilizados (Gómez-Galera *et al.* 2010).

A engenharia genética utiliza técnicas de biotecnologia para introduzir diretamente genes de interesse. Esses genes podem vir de qualquer fonte e são desenvolvidos para atingir um ou mais objetivos específicos. As maiores vantagens da engenharia genética sobre os cruzamentos convencionais são a diversidade das fontes de informação genética, a rapidez com que as variedades podem ser geradas e, futuramente, a presença de diversas

vitaminas e minerais na mesma planta sem a necessidade de programas complexos de cruzamentos (Gómez-Galera *et al.* 2010).

Apesar de todas essas vantagens, ainda não existem grãos enriquecidos com minerais por meio de engenharia genética. A necessidade de uma longa fase de desenvolvimento, bem como a existência de barreiras em certos países impedem a produção, o transporte e o uso de produtos transgênicos (Gómez-Galera *et al.* 2010).

1.7. Família ZIF

O trabalho realizado por Haydon e Cobett (2007) descreve um novo gene encontrado em *Arabidopsis thaliana*, denominado ZINC-INDUCED FACILITATOR 1 (*AtZIF1*). Este gene pertence a uma nova família de transportadores com três membros em *A. thaliana*: *AtZIF1*, *AtZIFL1* e *AtZIFL2*. O transportador *AtZIF1* está envolvido na homeostase de zinco, e o mutante por perda de função *atzif1* possui a distribuição de zinco alterada em toda a planta. As proteínas *AtZIF1* são expressas no tonoplasto e, provavelmente, estão envolvidas no transporte de zinco, zinco e algum ligante ou apenas o ligante no vacúolo (Haydon & Cobett, 2007). O trabalho citado também demonstra que a transcrição do gene *AtZIF1* é induzida por excesso de zinco, e outros dois trabalhos, Buckhout *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010, demonstraram que sua transcrição também é induzida por deficiência de ferro.

Tendo em vista que o gene *ZIF1* desempenha um papel importante na homeostase de zinco e talvez de ferro em *A. thaliana*, foram utilizadas a sequência do gene *AtZIF1* e as sequências de outros dois genes *ZIFlike* de *A. thaliana* para realizar buscas no genoma do arroz, com a finalidade de verificar se havia genes com sequências semelhantes neste genoma. Desta forma, foram encontradas 13 cópias de genes *ZIFlike* no genoma do arroz (Figura 1). Dentre esses 13 genes encontrados, estão os genes *OsZIFL4* e *OsZIFL9*, localizados nos cromossomos 11 e 12, respectivamente. Foi constatado, em nosso laboratório, que estes dois genes foram gerados a partir de um evento de duplicação e que apresentam 92% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos. Além disso, os genes *OsZIFL4* e *OsZIFL9* apresentam, respectivamente, 9 e 10 sequências para a ligação de IDEF1, fator de transcrição de resposta à deficiência de ferro (Kobaiashi *et al.* 2009). Os

outros genes pertencentes a família *ZIF-like* de arroz também estão sendo estudados pelo nosso grupo e fazem parte do trabalho de doutorado do aluno Felipe Klein Ricachenevsky.

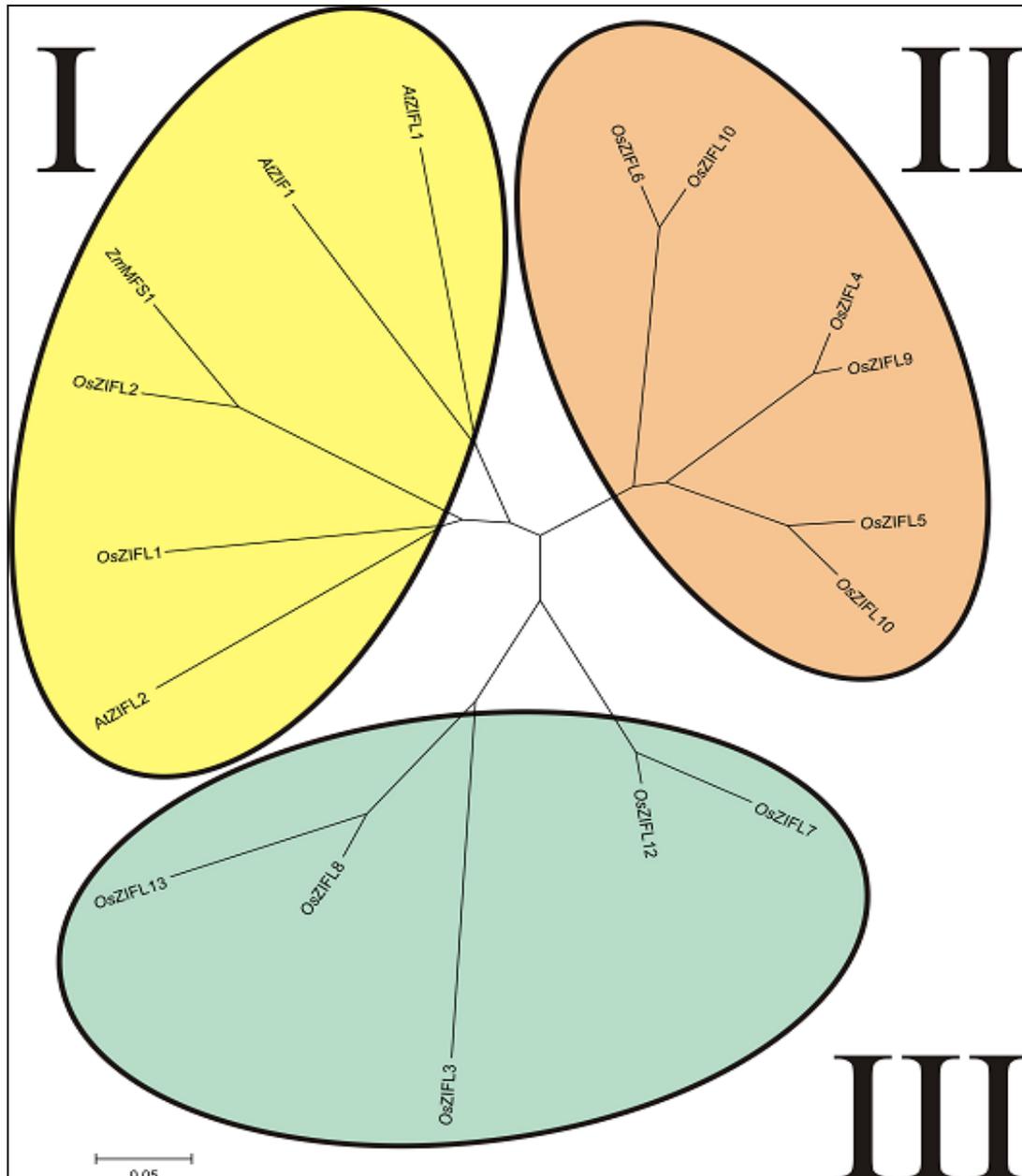


Figura 1: Árvore filogenética obtida a partir de neighbor-joining mostrando as relações entre os genes *OsZIFL 1* a *13*, *AtZIF1*, *AtZIFL1*, *AtZIFL2* e *ZmMSF1*. Figura cedida por Felipe Klein Ricachenevsky.

2. OBJETIVOS

2.1. Analisar a expressão dos genes *OsZIFLA* e *OsZIFL9* em diferentes órgãos (raízes, caules e folhas) em estágio vegetativo; em panículas e folhas-bandeira em diferentes estágios reprodutivos; em raízes e folhas de plantas submetidas a excesso de zinco e deficiência de ferro.

2.2. Clonar as regiões codificantes do gene *OsZIFLA* em vetores para expressão em leveduras mutantes para o transporte de zinco e ferro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises por RT-PCR quantitativo

3.1.1. Coleta de plantas crescidas a campo

As coletas de raízes, caules e folhas de plantas nos estágios reprodutivos R3 (antese), R5 (enchimento do grão) e R7 (endurecimento do grão) foram realizadas no IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz, Cachoeirinha, RS).

3.1.2 Cultivo de plantas

Em laboratório, plantas da cultivar Nipponbare foram germinadas durante 4 dias em uma incubadora a 28°C em placa de *Petri* com papel filtro umedecido em água destilada. Após a germinação, as plantas foram transferidas para recipientes com solução nutritiva (descrita por Ogo *et al.* 2006) contendo 0,1mM de KCl, 0,1mM de KH₂PO₄, 0,7 mM de K₂SO₄, 2mM de Ca(NO₃)₂ e 0,5mM de MgSO₄, 0,5μM de MnSO₄, 0,01 μM de (NH₄)₆Mo₂₇O₂₄, 10μM de H₃BO₃, 0,5 μM de ZnSO₄, 0,2μM de CuSO₄ e 100μM de Fe₂(SO₄)₃. A solução nutritiva foi trocada a cada 3 dias. As plantas submetidas ao tratamento deficiência de ferro foram mantidas em solução nutritiva na qual o Fe₂(SO₄)₃ foi suprimido por 7 dias. Já as plantas submetidas ao tratamento excesso de zinco foram submetidas à solução nutritiva acrescida de 200μM de ZnSO₄ por 3 dias. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento a 26°C ± 1 sob luz branca com um fotoperíodo de 16/8h luz-escuro (irradiação de aproximadamente 100 μmol m⁻² s⁻¹).

3.1.3. Extração de RNA, síntese de cDNA e reações de RT-PCR quantitativo

A extração de RNA total de raízes, caules, folhas e panículas foi realizada com o reagente Concert *Plant RNA Reagent* (Invitrogen®) e a quantificação através do fluorímetro QUBIT, Invitrogen®. As amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen®) e foi realizada a transcrição reversa utilizando um *primer* oligo-dT₃₀ e a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen®). Experimentos por RT-PCR quantitativo foram realizados utilizando *primers* específicos para o gene constitutivo ubiquitina (*OsUBQ1*) e para os genes *OsZIFL4* (5'- TGTGATTGAATTAATTGGACTTGC-3'; 3'-GGGGTGCTATTCCAGCTTCT-5') e *OsZIFL9* (5'-TGCCCTAAAATGGATTGTCC-3'; 3'-CAATGTTGATCTGACCCCAA-5'). A enzima utilizada foi a Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®). Também foram realizadas reações de RT-PCR quantitativo utilizando *primers* para os genes *OsNAS1* (5'-GTCTAACAGCCGGACGATCGAAAGG-3'; 3'-TTTCTCACTGTCATACACAGATGGC -5'), que é um gene marcador de excesso de zinco (Ishimaru *et al.*, 2008) e para o gene *OsIRT1*(5'- GCAATTCGCTGCATTGTTAG-3'; GAAGTACATCATCAGTCACGAA- 3'), marcador de deficiência ferro (Buglio *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006).

3.1.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através de teste-t ou ANOVA seguindo de Tukey HSD, utilizando o programa SPSS Base 12.0 para Windows.

3.2. Recombinação em *Escherichia coli*

3.2.1. Obtenção e clivagem do plasmídeo

Foi realizada a transformação de células Omnimax de *E. coli* com o plasmídeo pCM190 (descrito por Garí *et al*, 1997, figura 2). Estas células foram multiplicadas em meio LB líquido contendo 100µg/mL de ampicilina. Foi realizada a extração do plasmídeo e o tratamento com RNase. Após, os plasmídeos foram clivados com as enzimas BamHI e NotI. As amostras (plasmídeos íntegros e plasmídeos clivados) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%).

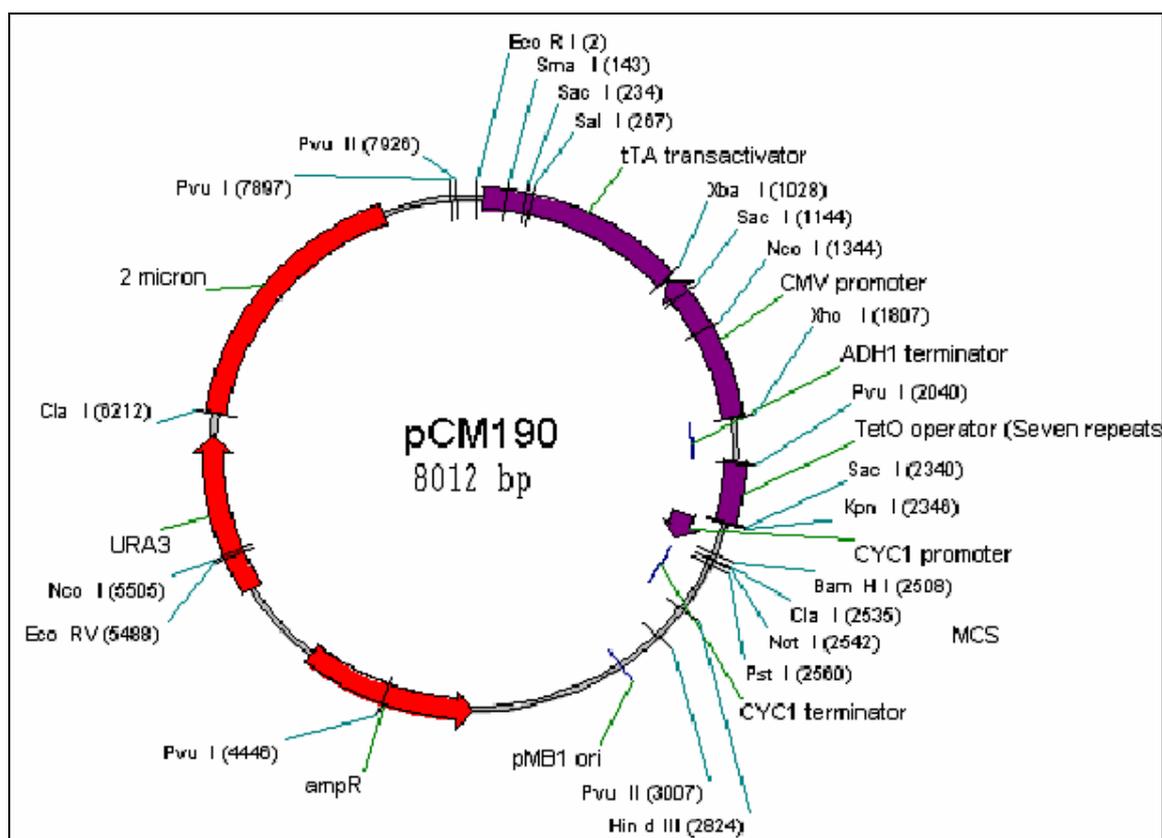


Figura 2: Representação gráfica do plasmídeo pCM 190 (Garí *et al*,1997).

3.2.2. Adição das sequências de recombinação

A adição das sequências de recombinação foi realizada por meio de duas etapas de PCR. Na primeira etapa, foram utilizados *primers* que anelam na extremidade do gene *OsZIFL4* e contem uma extensão de 20 pb (5'-TAAATTACCGGATCAATTCGGAGTCAATGAGTGAGGAGGCAC-3'; 3'-TAATTACATGATGCGGCCCTTTGTTTAATTTGGTATTGCCAGG-5'). Na segunda etapa, foram utilizados *primers* que anelam na extensão de 20 pb do primeiro par de *primers* (5'-ACGCAAACACAAATACACACACTAAATTACCGGATCAATTCGG-3'; 3'-AATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGATGCGGCCCT-5'), sendo que este último par também contem uma extensão de 20 pb (Figura 3). Deste modo, foi obtida uma construção do gene *OsZIFL4* com 40 pb nas extremidades, que foi utilizada para inserir o fragmento através de recombinação homóloga no plasmídeo pCM190 em células da linhagem KC8 de *E. coli*. Após a amplificação, essa construção foi purificada utilizando o *kit* GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®).

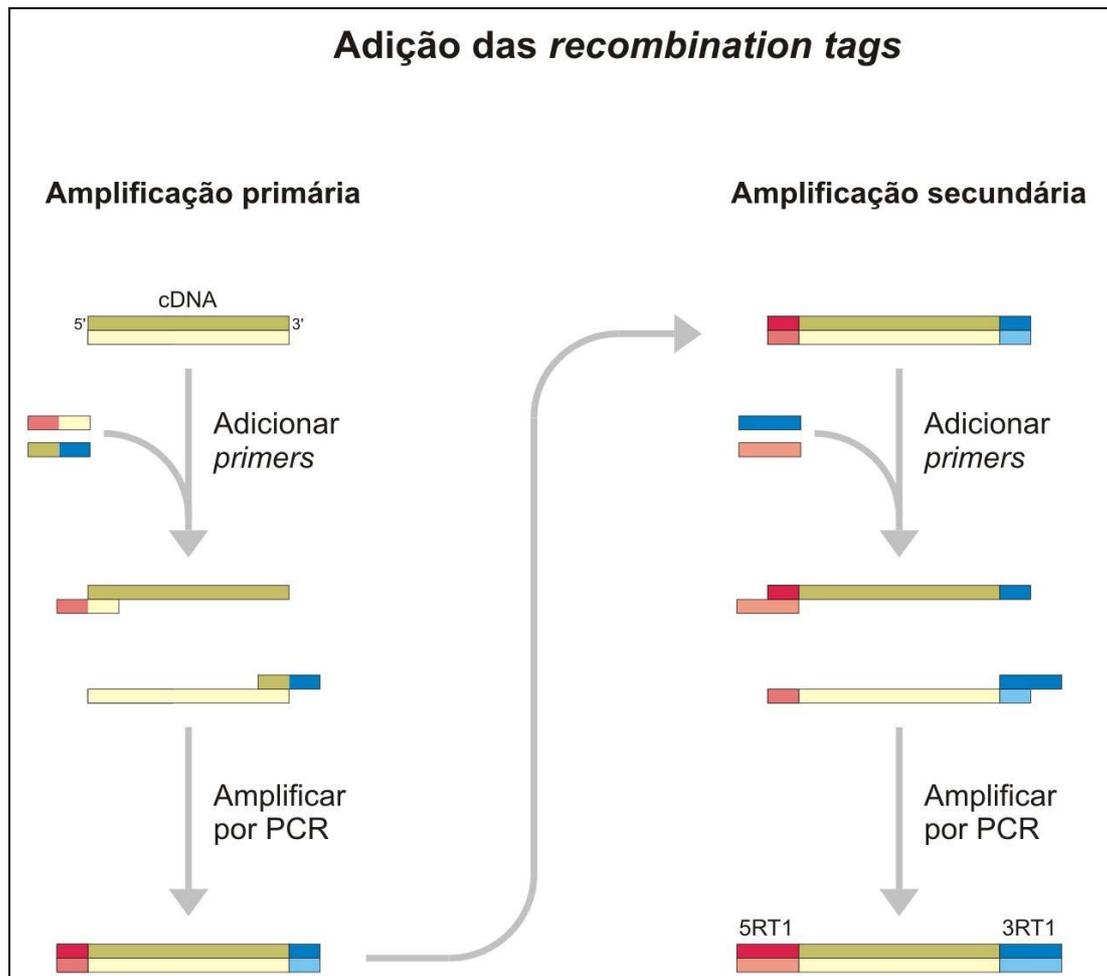


Figura 3: Representação gráfica do processo da adição das sequências de recombinação por meio de duas etapas de PCR. Figura cedida por Vinícius de Abreu Waldow.

3.2.3. Recombinação

A recombinação foi realizada conforme Parrish *et al.*, 2004, utilizando o produto de PCR secundário, o plasmídeo pCM190 clivado no sítio de BamHI e NotI e células da linhagem KC8 de *E. coli*. Como controle positivo, foi utilizado o plasmídeo íntegro e, como controle negativo, foi utilizado o plasmídeo clivado e sem o produto de PCR secundário.

Com a finalidade de verificar se as colônias que se multiplicaram realmente eram recombinantes, foi realizado PCR de *pool* de colônias, sendo que cada *pool* continha 10 colônias. Utilizando-se os *primers* do PCR primário, o *pool* que apresentou a amplificação esperada foi selecionado e foi realizada uma nova etapa de PCR, selecionando as colônias isoladamente, de forma que cada reação continha apenas uma colônia. Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%).

As colônias que apresentaram a amplificação prevista foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100µg/mL de ampicilina. Após, foi realizada a extração do plasmídeo e o tratamento com RNase. Para confirmar que estas colônias realmente continham o plasmídeo contendo o fragmento de DNA correspondente ao gene *OsZIFLA* clonado, foi realizada mais uma reação de PCR utilizando os *primers* do PCR primário. Os produtos dessas reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1%).

4. RESULTADOS

4.1. Análises por RT-PCR quantitativo

O gene *OsZIFL4* apresentou expressão pronunciada em raízes, enquanto que o gene *OsZIFL9* não apresentou expressão nesse órgão (Figura 4). Tanto *OsZIFL4* quanto *OsZIFL9* aumentaram a expressão ao longo do desenvolvimento das panículas, sendo que a expressão de *OsZIFL9* foi detectada desde a fase R5, enquanto *OsZIFL4* teve expressão detectada apenas em R7.

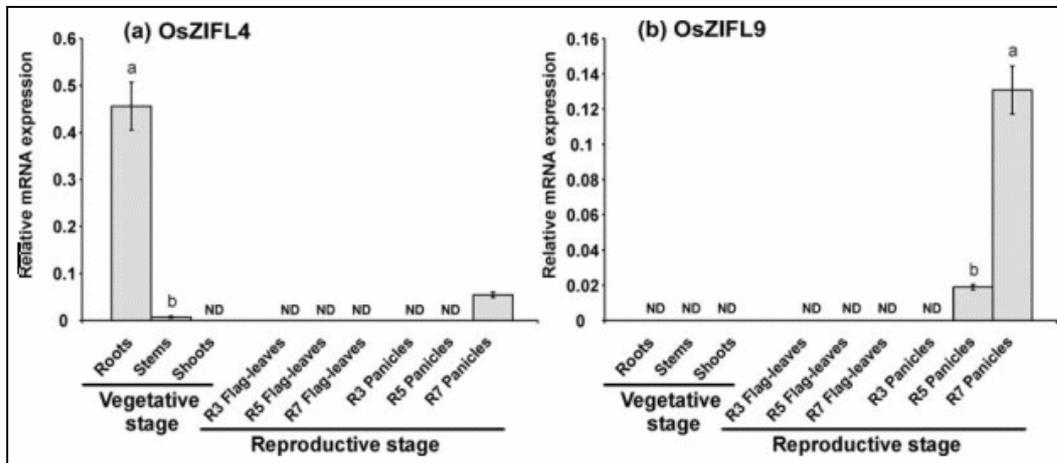


Figura 4: Análise da expressão dos genes *OsZIFL4* (a) e *OsZIFL9* (b) em raízes, caules e folhas em estágio vegetativo e em folhas-bandeira e panículas nos estágios reprodutivos R3, R5 e R7. Os valores de expressão são relativos à expressão de ubiquitina e representam as médias de 3 amostras \pm erro padrão.

A expressão do gene *OsZIFL4* aumentou cerca de 3,5 vezes em raízes de plantas submetidas a excesso de zinco (Figura 5) e 2 vezes em plantas submetidas à deficiência de ferro (Figura 6). O aumento da expressão do *OsZIFL4* nesses dois tratamentos foi correspondente ao aumento da expressão dos genes *OsIRT1* e *OsNAS1*, que são marcadores de excesso de zinco e deficiência de ferro, respectivamente. Já o gene *OsZIFL9* não teve expressão detectada em nenhum dos dois tratamentos.

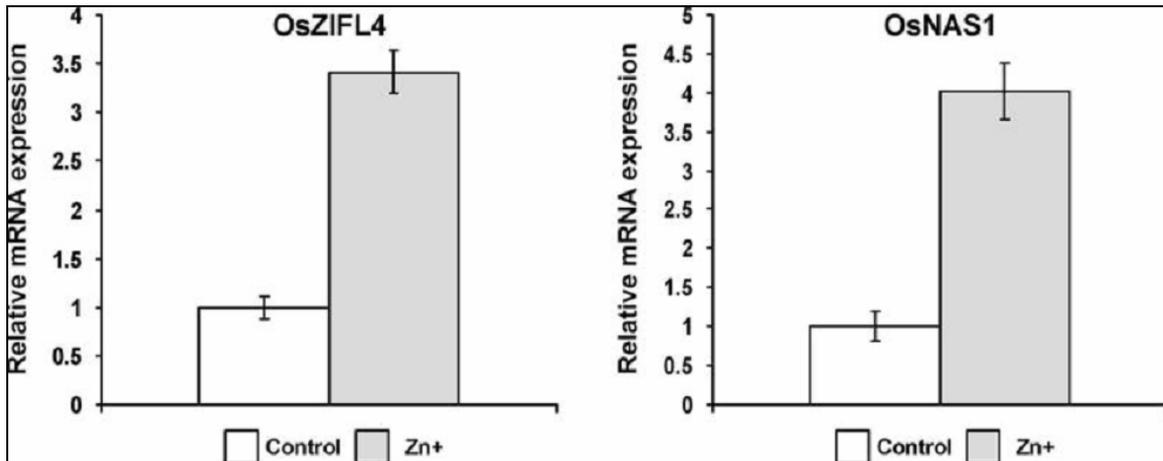


Figura 5: Análise da expressão dos genes *OsZIFL4* e *OsNAS1* (marcador de excesso de zinco) em raízes de plantas de arroz submetidas a excesso de zinco. Os valores de expressão são relativos à expressão de ubiquitina e representam as médias de 3 amostras \pm erro padrão.

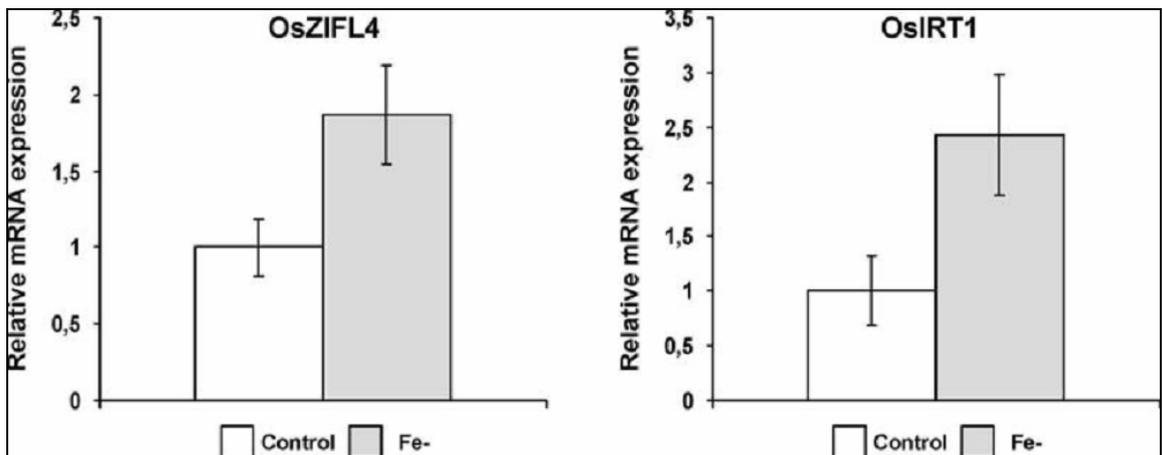


Figura 6: Análise da expressão dos genes *OsZIFL4* e *OsIRT1* (marcador de deficiência de ferro) em raízes de plantas de arroz submetidas à deficiência de ferro. Os valores de expressão são relativos à expressão de ubiquitina e representam as médias de 3 amostras \pm erro padrão.

4.2. Recombinação em *Escherichia coli*

Considerando que apenas o gene OsZIFL4 teve a expressão regulada por ferro e zinco, apenas este gene foi escolhido para a realização de experimentos de complementação de leveduras mutantes. Para realizar estes experimentos, a primeira etapa consiste em inserir a sequência codificante do gene em vetor de expressão em leveduras através de recombinação em *E. coli*. Para a recombinação em *E. coli*, foram realizados os seguintes passos:

4.2.1. Obtenção e clivagem do plasmídeo

Foram obtidos os plasmídeos pCM190 íntegro e clivado. O plasmídeo clivado foi detectado no gel como uma banda única com o tamanho esperado: 8012pb (Figura 7).

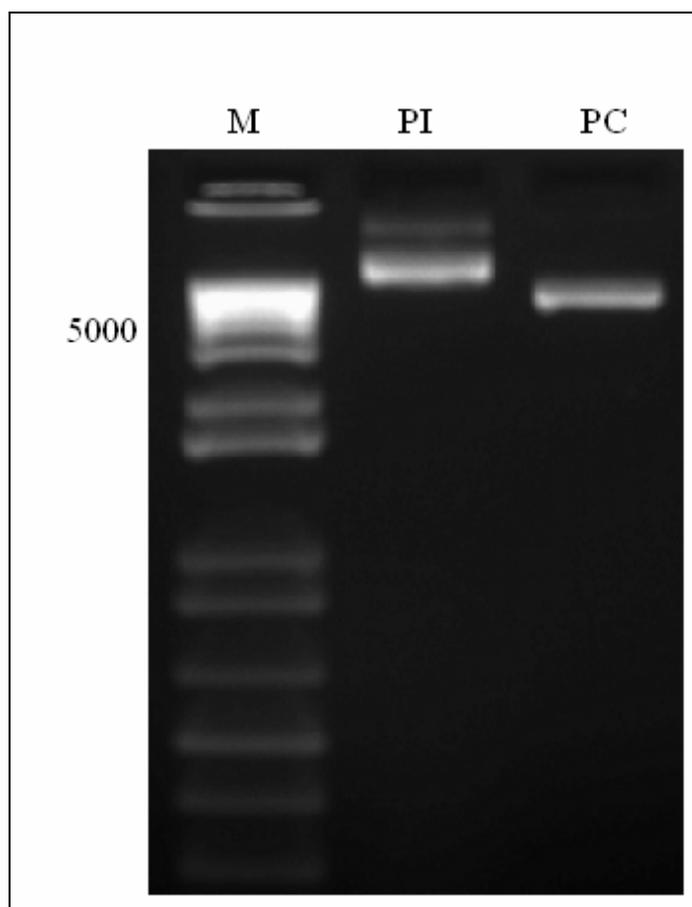


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1%). M: marcador, PI: plasmídeo íntegro, PC: plasmídeo linearizado por clivagem com as enzimas BamHI e NotI.

4.2.2. Adição das sequências de recombinação

As sequências de recombinação foram adicionadas por meio de duas etapas de PCR, gerando uma construção contendo o gene *OsZIFLA* mais 40 pb em cada uma das extremidades, totalizando 1502pb (Figura 8).

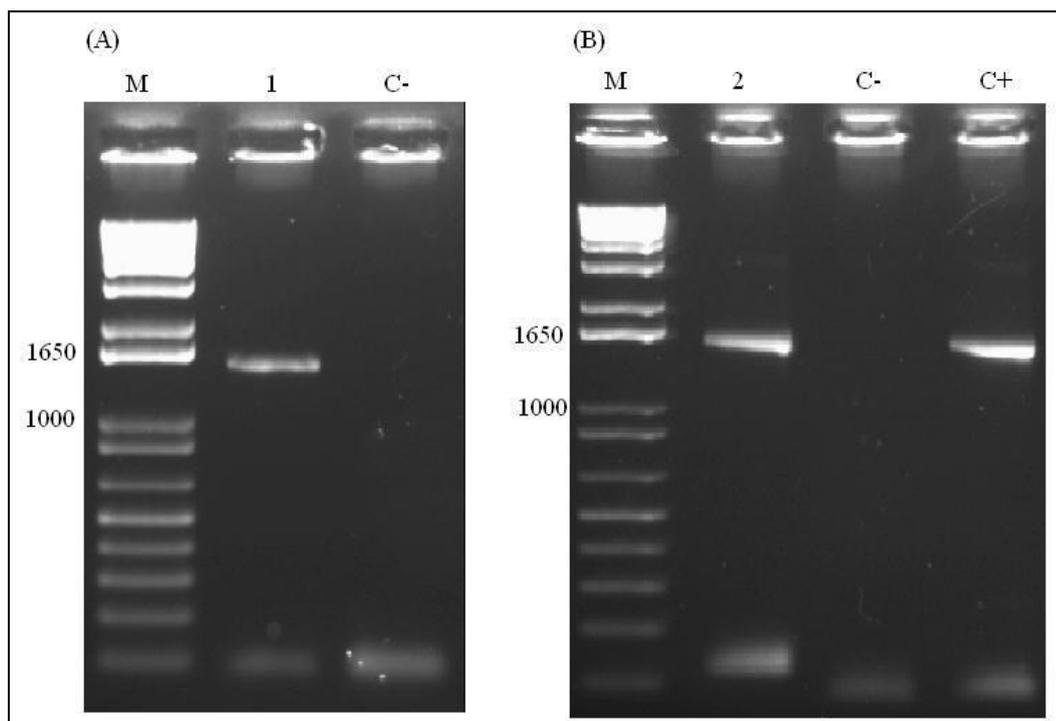


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR primário (A) e secundário (B). M: marcador, 1: produto do PCR primário, 2: produto do PCR secundário, C-: controle negativo C+: controle positivo.

4.2.3. Recombinação

Entre os *pools* de colônias selecionados, apenas um apresentou a amplificação esperada (Figura 9, número 3). Quando as 10 colônias pertencentes a esse *pool* foram analisadas por PCR isoladamente, 5 apresentaram a amplificação que era esperada para os recombinantes (Figura 10, números 2, 6, 7, 8 e 9). Quando inoculadas em meio LB líquido

contendo ampicilina, apenas uma colônia apresentou multiplicação, porém esta colônia não apresentou a inserção de DNA correspondente ao gene *OsZIFLA* clonado (Figura 11).

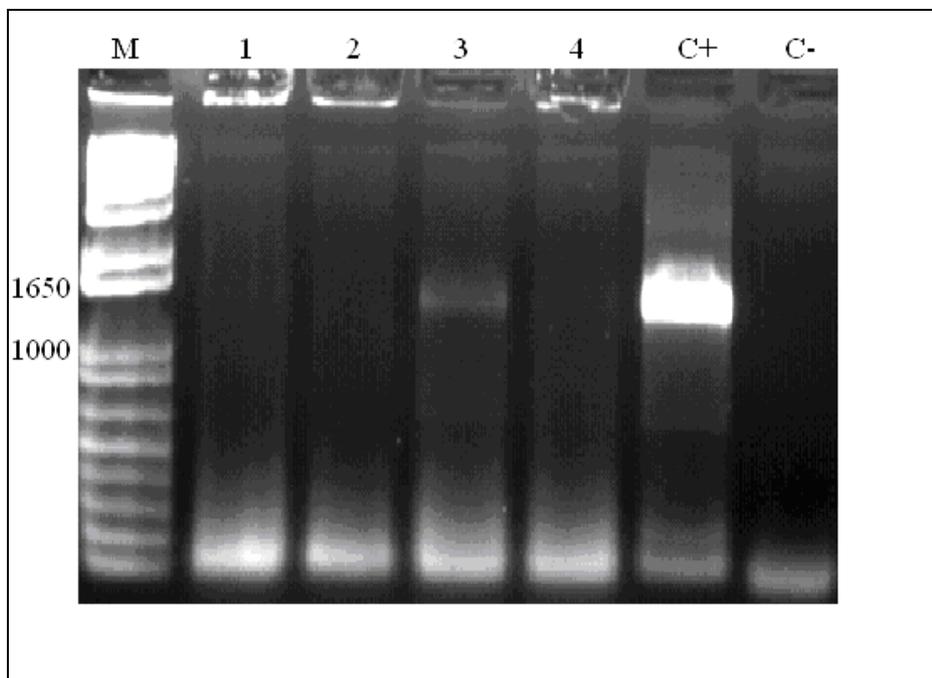


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de *pool* de colônias. M: marcador, 1 a 4: produtos de PCR obtidos de diferentes *pools*, C-: controle negativo, C+: controle positivo.

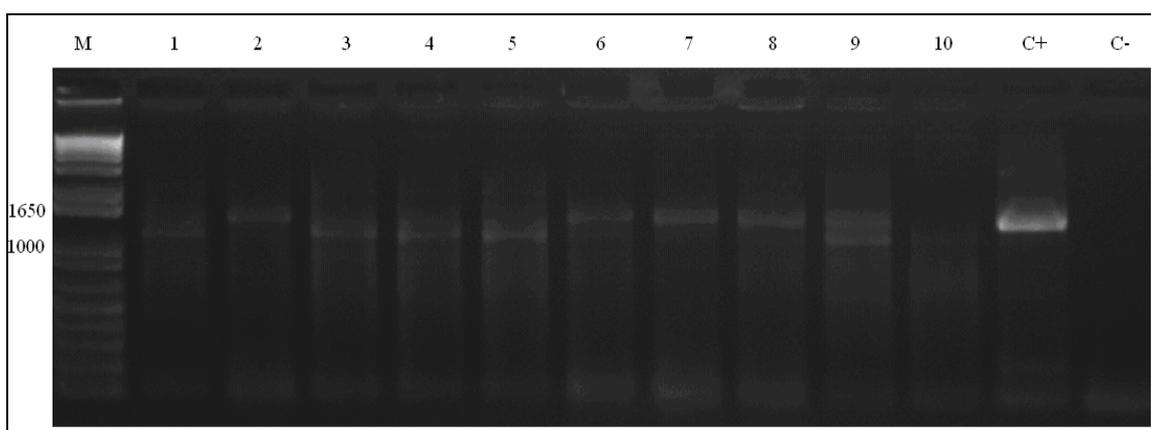


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de colônia. M: marcador, 1 a 10: produtos de PCR obtidos de diferentes colônias, C-: controle negativo, C+: controle positivo.

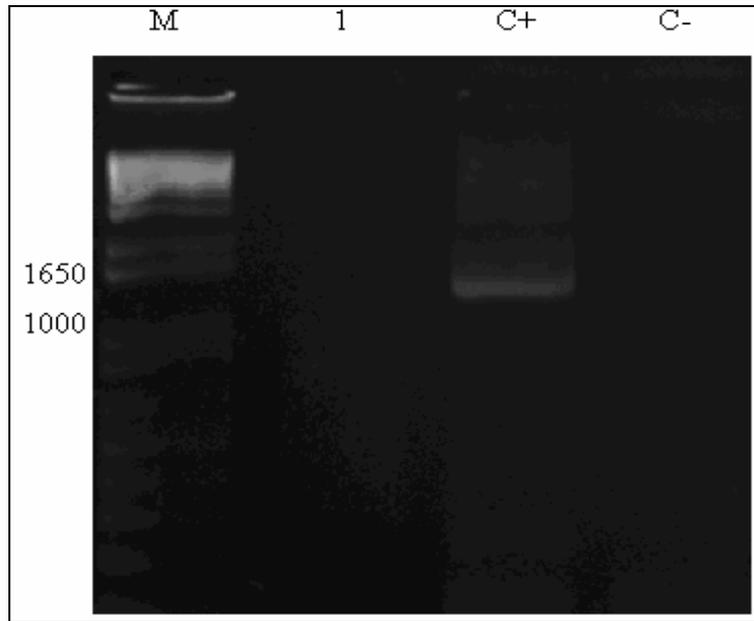


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de colônia. M: marcador, 1: produto de PCR obtido a partir da extração do plasmídeo, C-: controle negativo, C+: controle positivo.

5. DISCUSSÃO

O gene *OsZIFL4* apresenta um perfil de expressão raiz-específico. Também foi observado que *OsZIFL4* é induzido em deficiência de ferro e excesso de zinco. Já a expressão de *OsZIFL9* não foi detectada em raízes em condições controle ou sob os tratamentos. Esses resultados sugerem que, após o evento de duplicação, os padrões de expressão divergiram, pois enquanto os dois genes são expressos em panículas, somente *OsZIFL4* é expresso em raízes. *OsZIFL9* possui expressão pronunciada em panículas já na fase R5, enquanto *OsZIFL4* tem expressão detectada apenas em R7, sendo, ainda assim, bem menor do que a expressão de *OsZIFL9* nesta mesma fase. Então, sugerimos que o ancestral comum de *OsZIFL4* e *OsZIFL9* era expresso tanto em raízes quanto em panículas e que estes dois genes podem estar sofrendo um processo de subfuncionalização, com o gene *OsZIFL4* se especializando em raízes e o gene *OsZIFL9*, em panículas. O processo de subfuncionalização, descrito por Hughes (1994), sugere que genes duplicados adquirem mutações deletérias, porém complementares, que alteram uma ou mais funções desses novos genes em comparação ao gene ancestral. A força deste conceito está no fato de que ele não se baseia na ocorrência de mutações benéficas esparsas, mas sim na ocorrência de mutações deletérias que causam a perda de função em regiões reguladoras (Force *et al.*, 1999), de forma que os genes gerados por duplicação acabam compartilhando funções antes exercidas pelo ancestral.

O gene *OsZIFL4* foi induzido em ambos os tratamentos: deficiência de ferro e excesso de zinco. Isso pode acontecer porque a deficiência de ferro causa aumento das concentrações de zinco na planta, pois alguns dos transportadores que fazem parte dos mecanismos de absorção de ferro (induzidos sob deficiência) também transportam zinco de maneira secundária (Lee & An, 2009). Sendo assim, a indução observada em deficiência de

ferro pode ser consequência do aumento da absorção de zinco pela planta, e não diretamente por causa da deficiência de ferro. Experimentos com deficiência conjunta de ferro e zinco, assim como a quantificação de ferro e zinco nas raízes de plantas utilizadas nestes experimentos, poderão testar esta hipótese.

A partir dos resultados obtidos por RT-PCR quantitativo nos experimentos de excesso de zinco e deficiência de ferro podemos sugerir três possíveis mecanismos fisiológicos. Caso o gene *OsZIFL4* codifique um transportador vacuolar de zinco, o transportador *OsZIFL4* atuaria transportando o zinco excedente para dentro dos vacúolos, ajudando a evitar a toxidez por excesso de zinco nas células quando as plantas são submetidas a excesso de zinco. Esta é a hipótese mais provável, tendo em vista que o trabalho realizado por Haydon & Cobett (2007) sugere que o gene *AtZIF1* codifica um transportador vacuolar de zinco. Porém, duas outras hipóteses menos prováveis também podem ser sugeridas a partir desses mesmos resultados: *OsZIFL4* poderia ser um transportador de membrana e atuaria transportando ferro para dentro das células em situações de deficiência de ferro, tal como o transportador *IRT1* (Ishimaru *et al.*, 2006); ou ainda, seria um transportador vacuolar de ferro e atuaria transportando ferro para fora dos vacúolos, com o objetivo de disponibilizar o ferro estocado em situações de deficiência de ferro, assim como acontece com os transportadores *NRAMP3* e *NRAMP4* (Lanquar *et al.*, 2005).

Experimentos utilizando complementação funcional de leveduras poderão esclarecer a função do gene *OsZIFL4*. Não foi possível completar estes experimentos, pois a etapa de recombinação necessária não foi bem sucedida. É possível que as amplificações obtidas nas figuras 8 e 9 tenham ocorrido por causa de uma contaminação amostral. Como perspectivas, pretendemos concluir os experimentos realizando complementação funcional

de leveduras mutantes, já disponíveis no laboratório, para o transporte de ferro e zinco. É importante destacar que a etapa de recombinação foi realizada 3 vezes e, em todas, foram obtidos resultados semelhantes. Portanto, para a realização de uma nova etapa de recombinação, será feita a clivagem do plasmídeo e adição das sequências de recombinação novamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, I.L., Nadassy, K. & Wodak, S.J. (1998) Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Science*, 7: 1700–1716.

Alloway, B.J. (2004) *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. International Zinc Association, Brussels, 115 p.

Barak, P. & Helmke, P.A. (1993) The chemistry of zinc. In: Robson, A.D., ed. *Zinc in soil and plants*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1–13.

Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. & Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist*, 173: 677-702.

Brown, T.A. (2006) *Genomes*, 3rd edition. Garland Science, Manchester.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1367 p.

Bughio, N., Yamaguchi, H., Nishisawa, N K., Nakanishi, H. & Mori, S. (2002) Cloning an iron- regulated metal transporter in rice. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1677- 1682.

Curie, C.; Panaviene, Z.; Loulergue, C.; Dellaporta, S.L.; Briat, J.F. & Walker, E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, 409: 346-349.

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

Fageria, N.K., Baligar V.C. & Clark R.B. (2002) Micronutrients in crop production. *Advances in Agronomy*, 77: 185–268.

FAO (2004) Rice and human nutrition. FAO, Rome, 2 p.

FAO/WHO/IAEA (1996) Trace elements in human nutrition and health. WHO, Geneva, 361 p.

Force, A.; Linch, M.; Pickett, F. B.; Amores A.; Yan, Y. L. & Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicated genes by complementary degenerative mutations. *Genetics*, 151: 1531-1545.

Garí, E.; Piedrafita, L.; Aldea, M. & Herrero, H. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Functional Analysis Reports*, 13:837-848.

Gómez-Galera, S.; Rojas, E.; Sudhakar, D.; Zhu, C.; Pelacho, A. M.; Capell, T. & Christou, P. (2010) Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Research*, 19: 165-180.

Gross, J.; Stein, R.J.; Fett-Neto, A.G. & Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 477-495.

Hambidge, M. (2000) Human zinc deficiency. *Journal of Nutrition*, 130: 1344S–1349S.

HarvestPlus (2006) Biofortified rice. HarvestPlus, Manila, 2 p.

Hughes, A. L. (1994) The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 256: 119-124.

IBGE (2010)

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>

Acesso em junho de 2010.

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, N. K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe^{+3} -phytosiderophore and as Fe^{+2} . *The Plant Journal*, 45: 335-346.

Ishimaru, Y.; Suzuki M.; Ogo, Y.; Takahashi M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; & Nishizawa, N. K. (2008) Synthesis of nicotianamine and deoxymugineic acid is regulated by OsIRO2 in Zn excess rice plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54: 417-423.

IZiNCG (2004) Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. In: Hotz, C. & Brown, K.H. eds. *Food and Nutrition Bulletin*, 25: S91-S204.

Kim, S.A.; Punshon, T.; Lanzirotti, A.; Li, L.; Alonzo, J.M.; Ecker, J.R.; Kaplan, J. & Guerinot, M.L. (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314: 1295-1298.

Lanquar, V.; Lelievre, F.; Bolte, S.; Hames, C.; Alcon, C.; Neumann, D.; Vansuyt, G.; Curie, C.; Schroder, A.; Kramer, U.; Barbier-Brygoo, H. & Thomine, S. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal*, 24: 4041-4051.

Lee, S. & An, G. (2009) Over-expression of OsIRT1 leads to increase iron and zinc accumulations in rice. *Plant, Cell and Environment*, 32: 408–416.

Maret, W. (2005) Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19: 7–12.

Marschner, H. & Romheld, V. (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil*, 165: 261–274.

Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd Edition. Academic Press, Boston, 674 p.

Menezes, V.G., Macedo, V.R.M. & Anghinoni, I. (2004) Projeto 10: estratégias de manejo para o aumento de produtividade e sustentabilidade da lavoura de arroz irrigado no RS. Instituto Rio-Grandense do Arroz, Cachoeirinha.

Mori, S. (1999) Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 250-253.

Morrissey, J. & Guerinot, M.L. (2009) Iron uptake and transport in plants: the bad, the good and the ionome. *Chemical Reviews*, 109: 4553-4567.

Parrish, J. R.; Limjindaporn, T; Hines, J. A.; Liu, J.; Liu, G. & Finley, Jr., R. L. (2004) High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Proteome Research*, 3: 582-586.

Robinson, N. J.; Procter, C. M.; Connolly, E.L. & Guerinot, M. L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397: 694-697.

Römheld, V. & Marschner, H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80: 175-180.

Schmidt, W. (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in plant science*, 8: 188-192.

Schmidt, W. (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in Plant Science*, 8: 188-192.

Schmidt, W.; Michalke, W. & Schikora, A. (2003) Proton pumping by tomato roots. Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in rhizodermal cells. *Plant, Cell and Environment*, 26: 361-370.

Theil, E. C. (2004) Iron, ferritin and nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 24: 327-343.

UNICEF (2010) www.unicef.org/nutrition/index_iodine.html

Acesso em junho 2010.

Waters, B.M.; Blevins, D.G. & Eide D.G. (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiology*, 129: 85-94.

Zhang, F.S., Romheld, V. & Marschner, H. (1991) Release of zinc mobilising root exudates in different plant species as affected by zinc nutritional status. *Journal of Plant Nutrition*, 14: 675–686.

Zhu, C.; Naqvi, S.; Gómez-Galera, S.; Pelacho, A. M.; Capell, T. & Christou, P. (2007) Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends in Plant Science*, 12: 548-555.

Zimmermann, M.B.; Hurrell, R.F. (2007) Nutritional iron deficiency. *The Lancet*, 370: 511-520.