

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**Caracterização das cisteína desulfurases de arroz [*Oryza sativa*
(L.)] e soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**

MARTA DALPIAN HEIS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Jeverson Frazzon

Co-orientador: Rogério Margis

Porto Alegre, fevereiro de 2011

Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biologia Molecular Vegetal (LBMV) e de Genomas e Populações de Plantas (LGPP) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foi fonte financiadora deste trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Jeverson Frazzon, que sempre esteve presente e foi fundamental para a realização deste trabalho. Ainda, por sempre se dispor a me ajudar e a me transmitir conhecimento constantemente.

Ao meu co-orientador, Dr. Rogério Margis, que acompanhou todo desenvolvimento do trabalho e sempre o enriqueceu com sua visão crítica.

Ao Dr. Giancarlo Pasquali pela participação como membro da Comissão de Acompanhamento, por ser relator dessa dissertação e pela disponibilização do seu laboratório durante os dois anos de trabalho.

À Dra. Ana Paula Guedes Frazzon por participar da minha Comissão de Acompanhamento e, principalmente, por ter me inserido no mundo da Biologia Celular.

Aos colegas do laboratório 213, pelos apoios técnico, científico e pessoal constantes.

Aos colegas do laboratório 212, pelo apoio e pela companhia diária. Ao Genaro, por discutir comigo os problemas científicos que ambos tivessem e por completar qualquer frase com uma letra de música. Ao Gus, pelos conhecimentos a respeito das proteínas e pelos comentários e músicas inusitados. À Lu, por ser minha vizinha de bancada fiel e por tornar os dias no laboratório mais felizes. À Mi, por sempre saber a resposta às minhas perguntas, por ser fiel companheira do café-matinal e por sempre resolver os “trens” do laboratório. À Ro, pela sua criatividade e por tornar os dias mais alegres no laboratório.

Aos funcionários, Silvia e Luciano, que sempre estiveram prontos para me ajudar nas questões burocráticas do Mestrado.

Ao Matheus, meu namorado, pela paciência, pela companhia, por tornar todos os meus dias, e de quem mais estivesse por perto, mais alegres, e pelo amor.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou nas decisões por mim tomadas. Além do agradecimento, a eles dedico esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Mestrado.

Muito Obrigada!

Índice

Lista de Figuras e Tabelas	9
Resumo	11
Abstract	12
CAPÍTULO I	13
1.1 Agrupamentos [Fe-S]	14
1.1.1 Estrutura e sistemas de biossíntese dos agrupamentos [Fe-S]	17
1.1.2 Proteínas Fe-S em plantas	22
1.1.3 Cisteína desulfurase.....	25
1.2 Estresses Bióticos e Abióticos.....	27
1.2.1 Estresse por frio.....	28
1.2.2 Estresse por alumínio	29
1.2.3 Estresse por ácido salicílico	31
1.3 <i>Oryza sativa</i> (L.).....	32
1.4 <i>Glycine max</i> (L.) Merrill	33
1.5 Regiões Promotoras	34
1. 6 Objetivos	36
1.6.1 Objetivo geral.....	36
CAPÍTULO II.....	37

2.1 Materiais e Métodos.....	38
2.1.1 Identificação dos genes envolvidos na biossíntese de cofatores [Fe-S].....	38
2.1.2 Análise filogenética.....	38
2.1.3 Análise das sequências de DNA	39
2.1.4 Material vegetal e tratamentos	39
2.1.5 Extração de RNA e RT-qPCR.....	40
2.1.6 Análise dos dados.....	42
2.2 Resultados.....	43
2.2.1 Análise das sequências	43
2.2.2 Análise filogenética.....	46
2.2.3 Análise dos transcritos dos genes de cisteína desulfurase e ISD11 em soja.....	48
2.2.4 Busca por <i>cis</i> -elementos nas regiões promotoras.....	57
2.3 Discussão.....	64
2.4 Conclusões	69
CAPÍTULO III	71
3.1 Materiais e Métodos.....	72
3.1.1 Material vegetal.....	72
3.1.2 Tratamentos	72
3.1.3 Extração de RNA total	73
3.1.4 Síntese de cDNA a partir de RNA total	73
3.1.5 RT-qPCR em tempo real	74
3.1.6 Análise de bioinformática	75
3.2 Resultados.....	76
3.2.1 Análise das sequências	76
3.2.3 Análise dos transcritos das cisteína desulfurases	79

3.3 Discussão	84
3.4 Conclusões	85
Referências Bibliográficas – Capítulos I, II e III.....	86
ANEXO A.....	99

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

AS	ácido salicílico
°C	graus Celsius
bp	par(es) de bases
cDNA	DNA complementar
C _T	<i>threshold cycles</i>
cv	cultivar
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eF1 α	fator de alongamento alfa 1
EST	fragmentos de sequências de genes expressos (<i>expressed sequence tags</i>)
F-BOX	proteína da família F-Box
FDH	aldeído desidrogenase
Fe-S	ferro-enxofre
FTs	fatores de transcrição
ISC	sistema do cofator ferro-enxofre (<i>iron-sulfur cluster</i>)
kDa	quilo Dalton (1.000 Dalton)
M	molar(es)
MET	metaloprotease
mg	miligrama(s)
mL	mililitro(s)
μ L	microlitro(s)
mM	milimolar(es)
μ M	micromolar(es)
MS	meio de Murashige e Skoog
mV	milivolts
NIF	sistema de fixação de nitrogênio (<i>nitrogen fixation system</i>)
nm	nanômetro(s)
pb	par(es) de bases
qPCR	reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa em tempo real
RT-qPCR	qPCR precedida de transcrição reversa

SUF sistema de mobilização do enxofre (*sulfur mobilization*)
ssp. subespécie
U unidade(s) de atividade enzimática

Lista de Figuras e Tabelas

Capítulo I

- Figura 1. Estrutura e estado oxidativo de alguns cofatores [Fe-S].
- Figura 2. Estrutura da nitrogenase de *Azotobacter vinelandii*.
- Figura 3. Organização gênica de *nifU*.
- Figura 4. Modelo de formação de cofatores dos sistemas ISC e SUF bacterianos.
- Figura 5. Proteínas responsáveis pela biossíntese de cofatores [Fe-S] em plantas.
- Figura 6. Esquema da fotossíntese.
- Figura 7. Mecanismo de ação da cisteína desulfurase.
- Figura 8. Estrutura do monômero de IscS de *Escherichia coli*.

Capítulo II

- Tabela 1 Sequência dos oligonucleotídeos e características do produto de amplificação de cada gene.
- Tabela 2 Condições de amplificação das qPCRs.
- Tabela 3 Sítios de ligação a fatores de transcrição e motivos de ligação.
- Tabela 4 Sítios putativos de ligação a fatores de transcrição nos promotores dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11*.
- Figura 1 Alinhamento das proteínas IscS-like.
- Figura 2 Alinhamento das proteínas SufS-like.
- Figura 3 Alinhamento das proteínas ISD11.
- Figura 4 Análise filogenética das proteínas cisteína desulfurase.
- Figura 5 Expressão dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* em raiz e em folha.
- Figura 6 Expressão de *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* em plantas tratadas com frio.
- Figura 7 Expressão de mRNA total *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* em plantas tratadas com frio.
- Figura 8 Expressão dos genes *NFS1* e *NFS2* em plântulas tratadas com AS.

- Figura 9 Análise filogenética das regiões promotoras.
- Figura 10 Análise filogenética das proteínas ISD11 de *Glycine max* e *Medicago truncatula*.
- Figura 11 Visão geral do controle da expressão dos genes *NFS1* e *NFS2*.

Capítulo III

- Tabela 1 Oligonucleotídeos utilizados na análise por RT-qPCR.
- Figura 1 Alinhamento das cisteína desulfurases de *Oryza sativa*, *Escherichia coli* e *Arabidopsis thaliana*.
- Figura 2 Árvore filogenética que avalia a relação entre as cisteína desulfurases participantes da rota de formação dos cofatores [Fe-S].
- Figura 3 Análise por RT-qPCR dos genes *NFS1* e *NFS2* envolvidos na biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] em *Oryza sativa* ssp. *japonica* e *O. sativa* ssp. *indica*.
- Figura 4 Análise por RT-qPCR dos genes *NFS1* e *NFS2* em *Oryza sativa* ssp. *japonica* e ssp. *indica* no tratamento de frio.
- Figura 5 Análise por RT-qPCR dos genes *NFS1* e *NFS2* em *Oryza sativa* ssp. *japonica* no tratamento com alumínio.

Resumo

Os agrupamentos ferro-enxofre [Fe-S] são grupos prostéticos requeridos em processos essenciais como respiração, fotossíntese, reações metabólicas, sinalização e regulação gênica. Em plantas, a biossíntese das proteínas Fe-S é compartimentalizada e adaptada às necessidades de uma célula eucariótica fotossintetizante. Diversos fatores ambientais afetam o desenvolvimento das plantas e limitam sua produtividade. Dentre esses organismos afetados encontram-se a soja e o arroz, culturas de grande importância comercial no Brasil e no mundo. Foram analisados, pelo método de RT-qPCR, os perfis de expressão dos genes que codificam a enzima cisteína desulfurase *NFS1* e *NFS2* de ambas as espécies, participantes da rota de formação dos cofatores [Fe-S] mitocondriais e plastídicos, respectivamente. Para *Oryza sativa* ssp. *indica* e ssp. *japonica*, as análises permitiram mostrar uma distribuição diferencial dos transcritos entre órgãos. *OsNFS1* apresenta maiores níveis de transcritos tanto em raiz quanto em folha, enquanto *OsNFS2* apresentou maiores níveis de transcritos em folha do que em raiz. A resposta destes genes ao frio (24 h a 4°C) difere entre as subespécies. Na ssp. *japonica*, os dois genes são induzidos em ambos os tecidos. Para a ssp. *indica* há redução dos níveis de mRNA de *NFS1* e aumento de *NFS2* em folhas, e não há respostas em raízes. Nos tratamentos com alumínio na ssp. *japonica*, há redução dos níveis de mRNA de ambos os genes nas raízes, enquanto não há resposta na parte aérea. As análises em *Glycine max*, organismo que apresenta duplicação dos genes, permitiram demonstrar que a modulação destes é realizada de maneira diferencial. Em raiz, o tratamento com frio (5 h, 10 h e 24 h a 4°C) promoveu a redução dos níveis de mRNA de uma das cópias de *NFS1* e a indução da outra, enquanto os genes codificadores de *NFS2* foram reprimidos. Em folha, o mesmo tratamento induziu uma das cópias de *NFS1* e uma de *NFS2*, enquanto que as outras oscilaram em nível bem inferior de expressão. A exposição de *G. max* ao ácido salicílico induz a modulação dos genes mitocondriais, aumentando os níveis de mRNA em raízes e reprimindo-os em folhas. As análises dos *cis*-elementos permitiram mostrar a correlação destes com os dados encontrados em RT-qPCR. Desta maneira, tanto em arroz quanto em soja, a cisteína desulfurase parece ser modulada por diferentes estresses, possuindo padrões diferenciados conforme o órgão e o gene.

Abstract

Iron-sulfur [Fe-S] clusters are prosthetic groups required to maintain life processes including respiration, photosynthesis, metabolic reactions, sensing, signaling and, gene regulation. In plants the biogenesis of Fe-S protein is compartmentalized and adapted to specific needs of the eukaryotic and photosynthetic cell. Many environmental factors affect plant development and limit the productivity and the geographical distribution. Among those affected organisms are soybean and rice, crops with huge economic importance worldwide. Here we analyze the expression profile of cysteine desulfurase genes *NFS1* and *NFS2*, involved in the biogenesis of [Fe-S] clusters in mitochondria and plastid, respectively, from both species, by RT-qPCR. Analysis of *Oryza sativa* ssp. *indica* and ssp. *japonica* showed a differential expression between organs, *OsNFS1* has a higher expression in roots and leaves than *OsNFS2*, and *OsNFS2* is more expressed in leaves than in roots. Rice subspecies exhibited different responsiveness to cold. The *japonica* ssp. increased transcript level from both genes in both organs, while ssp. *indica* decreased *OsNFS1* and increased *OsNFS2* expressions in leaves, and did not change the expression pattern in roots. Rice ssp. *japonica* showed a decrease in *OsNFS1* and *OsNFS2* transcript levels in root, while leaves did not change, under aluminum stress. Soybean analysis, which presents duplication of both genes, demonstrated particular transcript levels considering organ and stress response. *GmNFS1* had a high expression in roots, while *GmNFS2* did not differ between organs. Cold-treated plants (0, 5, 10 and 24h at 4°C) showed a decrease in cysteine desulfurases transcript level in roots, and an increase in leaves. Plants treated with salicylic acid increased *GmNFS1* transcript level in roots, and decreased in leaves. Besides that, an analysis of promoter regions showed the presence of different *cis*-elements among cysteine desulfurase genes, corroborating with differential expression of each loci. Our results suggest that cysteine desulfurases, in rice and soybean, may be involved in stress response, being modulated by different stimuli according to organ and gene.

CAPÍTULO I
Referencial Teórico

1.1 Agrupamentos [Fe-S]

Os agrupamentos ferro-enxofre [Fe-S] parecem ser os cofatores inorgânicos descritos mais antigos e versáteis [1]. Esta versatilidade é vista tanto nas conformações que tais cofatores podem adquirir quanto nas diferentes proteínas com as quais eles podem interagir (Figura 1). A descoberta dos agrupamentos [Fe-S] se deu na década de 1960 por meio do estudo de estruturas protéicas pelo método de ressonância. Até o ano de 2005, mais de 120 proteínas e enzimas que contêm em sua estrutura os cofatores [Fe-S] foram descritas, as chamadas proteínas Fe-S [2, 3]. A ligação das proteínas Fe-S aos respectivos cofatores [Fe-S] se dá pela interação de átomos de ferro do agrupamento com resíduos de, mais comumente, cisteína ou histidina da cadeia polipeptídica [4]. As primeiras proteínas descritas com esta característica foram as ferredoxinas de bactérias e plantas e o complexo respiratório I-III presente em bactérias e mitocôndrias [5]. Os cofatores [Fe-S] encontram-se envolvidos em diversos processos tais como fotossíntese, fixação de nitrogênio, respiração celular, assimilação de nutrientes, reparo de DNA e regulação gênica, neste caso agindo como sensor de condições intra e extracelulares. Entretanto, sua função mais comum é a de transporte de elétrons pela capacidade de alteração do estado oxidativo do ferro [6-8].

A maior parte dos agrupamentos contém de um a quatro átomos de ferro, enquanto outros chegam a apresentar oito átomos. Além do ferro, pode haver a presença de outros metais como átomos de níquel e de molibdênio [9]. As formas mais comuns de organização desses cofatores são as que apresentam um centro rômboico [2Fe-2S] e as que têm o centro na forma de um cubo [4Fe-4S]. Ambas as formas contêm em sua estrutura ferro ($\text{Fe}^{2+/3+}$) e enxofre (S^{2-}) [4]. Estima-se que a formação de cofatores com diferentes estruturas derivem da forma [2Fe-2S]. O cofator tetranuclear pode ser gerado pela fusão de dois agrupamentos binucleares, enquanto que o cofator [3Fe-4S] parece ser derivado de um [4Fe-4S] que teve um átomo de ferro removido [10]. As proteínas Fe-S descritas até o momento têm tamanho variado, podendo passar de 500 kDa e possuir até 9 cofatores [Fe-S] em sua estrutura [11].

A distribuição de diferentes cofatores varia entre as proteínas. Uma ferredoxina bacteriana, primeira proteína Fe-S isolada, possui uma cadeia polipeptídica pequena, de apenas 55 aminoácidos. Ligados a ela, encontram-se dois cofatores [4Fe-4S], que correspondem à grande parte da estrutura e fornecem estabilidade por intermédio das interações com a cadeia polipeptídica [12]. Bactérias fotossintetizantes apresentam um tipo de ferredoxina de alto potencial. Estas são proteínas pequenas que possuem um cofator [4Fe-4S] que serve como doador de elétrons. O potencial redox destas proteínas é alto, podendo variar de +100 a +400 mV [13]. Já as ferredoxinas de plantas apresentam uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 100 aminoácidos e um cofator [2Fe-2S] ligado a sua estrutura próximo à superfície. Essas enzimas têm como função o transporte de elétrons entre o fotossistema I e demais proteínas, participando das reações envolvidas no ritmo circadiano [4, 14].

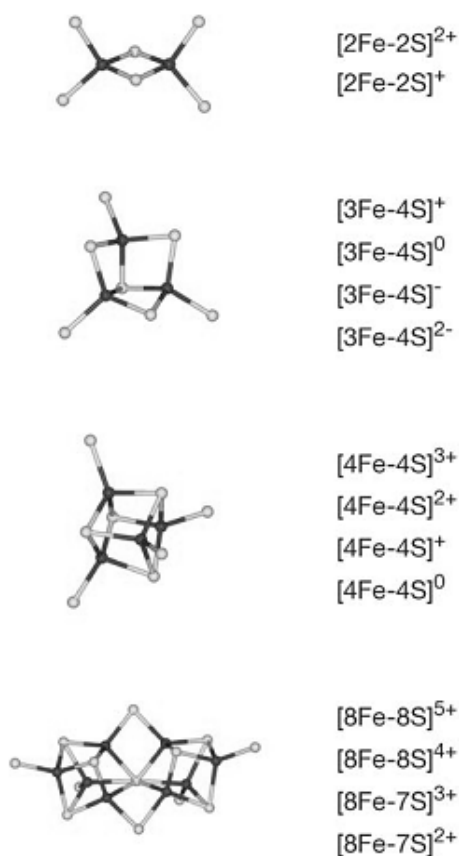


Figura 1. Estrutura e estado oxidativo de alguns cofatores [Fe-S]. Representação de cofatores caracterizados por cristalografia, mostrando seus possíveis estados oxidativos. Estão representados os átomos de enxofre (claro) e os átomos de ferro (escuro). (Adaptado de [3]).

Os cofatores [Fe-S] estão envolvidos no controle da expressão gênica e atuam como sensores de condições intra e extracelulares. Em células humanas, a IRP-1 (proteína reguladora do ferro 1 ou *iron regulatory protein-1*) controla a expressão gênica de proteínas envolvidas na captação, no armazenamento, na utilização e na exportação de ferro conforme a presença ou ausência do cofator [Fe-S]. Quando a IRP-1 não está interagindo com o cofator, ela adquire a capacidade de se ligar ao RNA junto a elementos responsivos ao ferro (IREs ou *iron-responsive elements*), em porções não traduzidas de mRNAs de proteínas relacionadas ao ferro. Esta interação pode ocorrer tanto na extremidade 5' não traduzida quanto na extremidade 3'. Ocorrendo na extremidade 5', há o bloqueio da tradução. Já a ligação à extremidade 3' estabiliza o mRNA. Este controle diversificado faz com que, na falta de cofator [Fe-S], haja expressão de proteínas importadoras de ferro e redução na tradução de proteínas de armazenamento. Essa função é perdida quando há um cofator ligado à estrutura da IRP-1. Dessa maneira, a presença do cofator informa que não há necessidade de maior captação de ferro, impedindo a tradução de proteínas relacionadas a esse processo [15]. Ainda não se tem um mecanismo similar a este descrito para plantas [7].

Em bactérias, estão descritos mecanismos onde esses agrupamentos funcionam como sensores de oxigênio ou de estresse oxidativo ligados a fatores de transcrição. A oxidação dos cofatores [Fe-S] pode ter duas conseqüências: desencadear rearranjo ou desmontagem do agrupamento (reações irreversíveis); ou então provocar mudança no estado oxidativo do agrupamento (reação reversível) [16]. Tem-se como exemplo do primeiro caso a proteína que regula a redução de nitrato e fumarato (FNR) e que exerce o controle da síntese de proteínas necessárias para a respiração anaeróbica. Sua expressão é constitutiva, mas apenas sua forma dimérica possui um cofator $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ que é essencial para sua atividade. Quando se encontra nesta condição, a proteína FNR adquire alta afinidade ao DNA e, assim, controla a expressão gênica. Na presença de oxigênio há conversão de $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ em $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, estado em que a FNR apresenta-se monomérica e inativa [17, 18]. O segundo caso pode ser exemplificado pela proteína sensora de estresse oxidativo SoxR de *Escherichia coli*. A proteína SoxR ativa, em resposta a exposição da célula a oxigênio e/ou óxido nítrico, induz a transcrição da proteína SoxS, a qual induz transcrição de genes de defesa contra o estresse oxidativo. A proteína SoxR possui a forma

homodimérica com um cofator [Fe-S] em cada monômero. Sua forma inativa tem ligada a sua estrutura o cofator [2Fe-2S]¹⁺, após a ação dos agentes oxidantes, o cofator adquire a forma [2Fe-2S]²⁺ e pode induzir a transcrição do gene *soxS* [19].

1.1.1 Estrutura e sistemas de biossíntese dos agrupamentos [Fe-S]

Experimentos *in vitro* permitiram mostrar que a formação dos cofatores [Fe-S] ocorre de maneira espontânea na presença de S²⁻ e Fe^{+2/+3} livres [5, 20]. Entretanto, estes compostos apresentam toxicidade para célula, devendo existir proteínas responsáveis pela captação dos elementos, posterior formação do cofator e destinação deste [21, 22]. Sendo assim, a formação dos agrupamentos [Fe-S] é dividida em três etapas: primeiro há a formação do enxofre elementar que irá compor os cofatores, segundo há a montagem destes cofatores, e terceiro há a inserção do agrupamento em apoproteínas [23]. Desse modo, três diferentes sistemas de formação destes agrupamentos já foram descritos em bactérias [3]. Estes sistemas têm em comum nas suas rotas a presença de uma cisteína desulfurase e de proteínas de ancoragem, essas proteínas parecem estar conservadas em bactérias, fungos, animais e plantas [7].

O primeiro sistema a ser descrito foi o sistema NIF (sistema de fixação de nitrogênio ou *nitrogen fixation system*), composto pelos genes *nif*, em *Azotobacter vinelandii*, organismo fixador de nitrogênio [24]. O mesmo sistema foi descrito alguns anos depois para outras bactérias diazotróficas como *Azospirillum brasilense* [25]. Este sistema de formação de cofatores [Fe-S] é responsável pela atividade da enzima nitrogenase, catalisadora da conversão de nitrogênio molecular (N₂) em amônia (NH₃) nas bactérias que fixam este elemento [26]. Devido à sua importância no metabolismo dessas bactérias, a nitrogenase demanda alta quantidade de cofatores, possuindo, assim, um sistema especializado de biossíntese desses [3]. Para descobrir as proteínas envolvidas no processo de montagem desses cofatores, estudaram-se geneticamente e bioquimicamente as proteínas essenciais para fixação de nitrogênio em *A. vinelandii* [27].

A nitrogenase é uma metaloenzima dependente de molibdênio formada por duas proteínas chamadas de Fe-proteína e a MoFe-proteína (Figura 2). A Fe-proteína é um dímero de 60 kDa com subunidades iguais e que contém um único cofator [4Fe-4S]. Essa estrutura é responsável pelo fornecimento de elétrons para a redução do substrato. A MoFe-proteína possui a forma de um tetrâmero de 220 kDa e possui um sítio de ligação e de redução do substrato. Em sua estrutura são encontrados dois tipos de cofatores, o cofator ferro-molibdênio (FeMoCo) e o chamado cofator P, [8Fe-7S] [27, 28]. Estudos mostraram que a inativação de diversos genes *nif* resulta em defeitos na maturação da Fe-proteína ou da MoFe-proteína, mas a deleção dos genes *nifU* e *nifS* levam à perda de atividade de ambas proteínas constituintes [24]. Como o único aspecto comum entre as duas proteínas é que ambas são proteínas Fe-S, os genes mutados deveriam ser essenciais para a formação dessas estruturas [3].

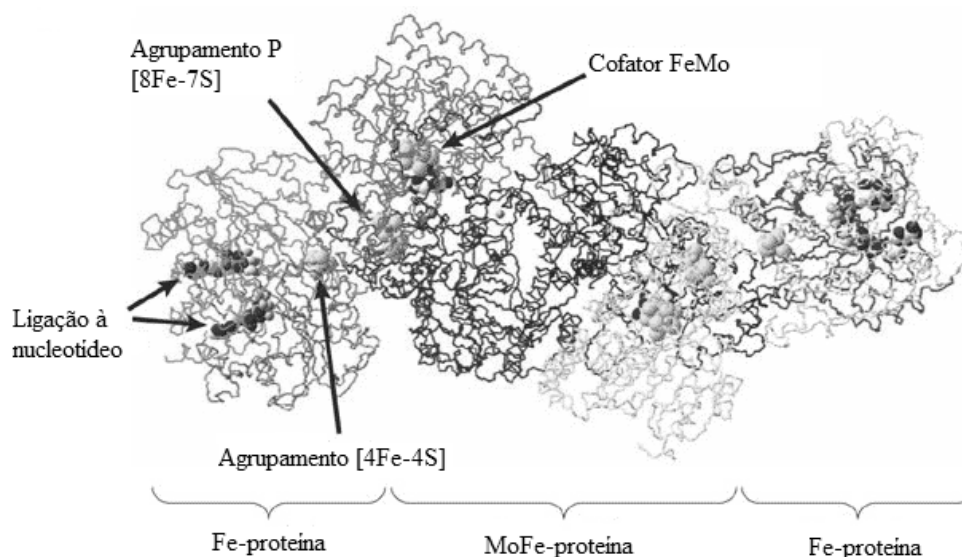


Figura 2. Estrutura da nitrogenase de *Azotobacter vinelandii*. Estrutura da enzima nitrogenase de *Azotobacter vinelandii* mostrando as subunidades (Fe-proteína e MoFe-proteína) e os cofatores ligados à estrutura. (Adaptado de [29]).

Estudos posteriores de purificação permitiram revelar que a proteína NifS, organizada na forma de homodímero, contém piridoxal-fosfato (PLP) como cofator [30] e é responsável pela dessulfurização da L-cisteína que fornece o enxofre para o cofator [31]. Sendo o gene *nifS* responsável pelo fornecimento de enxofre para a formação dos cofatores

[Fe-S], buscou-se a função da proteína codificada pelo gene *nifU*. Estudos da estrutura do gene *nifU* permitiram mostrar que seu domínio central possui um sítio de ligação permanente ao cofator [2Fe-2S], enquanto que suas extremidades podem prover local de formação de cofatores transientes destinados à nitrogenase (Figura 3). Essas hipóteses foram comprovadas por estudos de substituição de aminoácidos [32, 33], mostrando que NifU é uma proteína de ancoragem funcionando como sítio intermediário para formação de agrupamentos [Fe-S] para a nitrogenase.

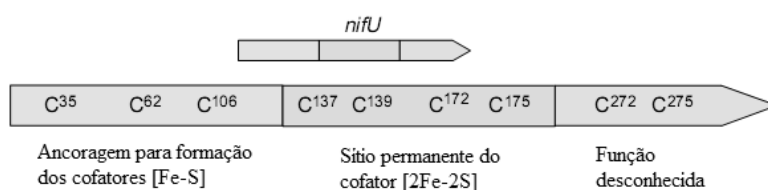


Figura 3. Organização gênica de *nifU*. Organização do gene *nifU* mostrando em evidência suas cisteínas responsáveis pela ancoragem dos cofatores que serão destinados para a nitrogenase. (Adaptado de [27]).

Posteriormente, descreveu-se em *A. vinelandii* o sistema ISC (cofator ferro-enxofre ou *iron-sulfur cluster*). Por meio da purificação de proteínas de uma linhagem mutante para do gene *nifS*, identificou-se uma proteína com a mesma atividade de dessulfurização apresentada pela NifS (Figura 4). Esta proteína foi chamada de IscS e também se organizava em homodímeros contendo PLP como cofator. O grupo de genes onde *iscS* se localizava apresentava outros genes homólogos a genes do sistema NIF, como *iscU* e *iscA*, genes codificadores de proteínas de ancoragem [34]. Além de *A. vinelandii*, outros genomas apresentam genes homólogos ao grupo *nifUS*, como o genoma de *Escherichia coli* [35] e o de humano [36].

Comparações feitas entre os genes presentes em bactérias e nas mitocôndrias mostraram que há grande similaridade de sequências entre os componentes desses dois sistemas ISC. Essa semelhança corrobora com a relação evolucionária existente entre bactérias e mitocôndrias, mostrando a presença de genes homólogos entre o hospedeiro endossimbiótico e a bactéria ancestral [37, 38]. Desse modo, a proteína de ancoragem IscU de bactéria é chamada de Isu1 em mitocôndria, possuindo a mesma função de suportar a

formação do cofator e inseri-lo na proteína Fe-S de destino. Já a proteína IscS de bactéria é chamada de Nfs1 nessa organela e catalisa a liberação de enxofre a partir de L-cisteína [5]. Nfs1 encontra-se organizada em dímeros possuindo dois domínios, um onde há a ligação ao PLP e outro onde está localizado o sítio catalítico [39].

A biogênese de proteínas Fe-S nucleares e citosólicas depende do funcionamento da maquinaria ISC mitocondrial. A mitocôndria apresenta um sistema de exportação, sendo responsável pela maturação de proteínas Fe-S extra-mitocondriais. Este sistema apresenta a proteína Atm1 na membrana interna da organela e a proteína Erv1 no espaço entre-membranas [40]. A natureza molecular do composto exportado pelo sistema descrito ainda não é conhecida, mas supõe-se que seja um cofator [Fe-S] ou um precursor que contenha enxofre, que após estabilização, é exportado e incorporado em apoproteínas do citoplasma e/ou núcleo [41].

O último sistema de formação dos agrupamentos [Fe-S] descrito foi o sistema SUF (sistema de mobilização de enxofre ou *sulfur mobilization*) em *Escherichia coli* [42]. Este sistema apresenta semelhanças com o sistema ISC, porém é induzido principalmente quando sob limitação de ferro e estresse oxidativo [43]. O sistema SUF é encontrado em plastídeos de plantas e algas verdes, sendo responsável pela formação dos cofatores [Fe-S] necessários para o aparato fotossintético [7]. O sistema SUF presente em plastídeos parece ter sido herdado de cianobactérias, de acordo com sua homologia e com a teoria endossimbiótica [5] (Figura 4).

Nesse procarioto, foi identificado um operon que contém seis genes, *sufABCDSE*, e que é capaz de formar cofatores [Fe-S]. Destes genes, *sufS* foi caracterizado como uma cisteína desulfurase responsável pela captura do enxofre. Bactérias mutantes para o sistema ISC, mas que super-expressavam o operon recém-descoberto, apresentavam-se viáveis. A letalidade era reportada quando ambos os sistemas se encontravam mutados. Sendo assim, descobriu-se que o operon *suf* possui uma via independente do sistema ISC, mas que suas atividades tinham um grau de superposição, uma vez que a mutação de um deles não tornava o organismo inviável [42].

As proteínas Fe-S possuem em sua estrutura um ou mais agrupamento [Fe-S] ligados a ela. O transporte de elétrons é uma das funções mais comuns dessas estruturas, sendo o papel desempenhado por diversas proteínas pertencentes a este grupo, incluindo as ferredoxinas. No cloroplasto, a ferredoxina contém um cofator [2Fe-2S] e sua atividade é fundamental para a realização da fotossíntese e para a sinalização da organela com o núcleo [44]. Em cianobactérias, uma proteína de ancoragem chamada CnfU foi descrita como a responsável por entregar o cofator a essa proteína [45]. Tal relação foi vista também em *Arabidopsis thaliana* [46]. Ainda, defeitos na proteína responsável pela entrega deste cofator desencadeiam redução na atividade do fotossistema I, estrutura dependente de cofatores [Fe-S] [5].

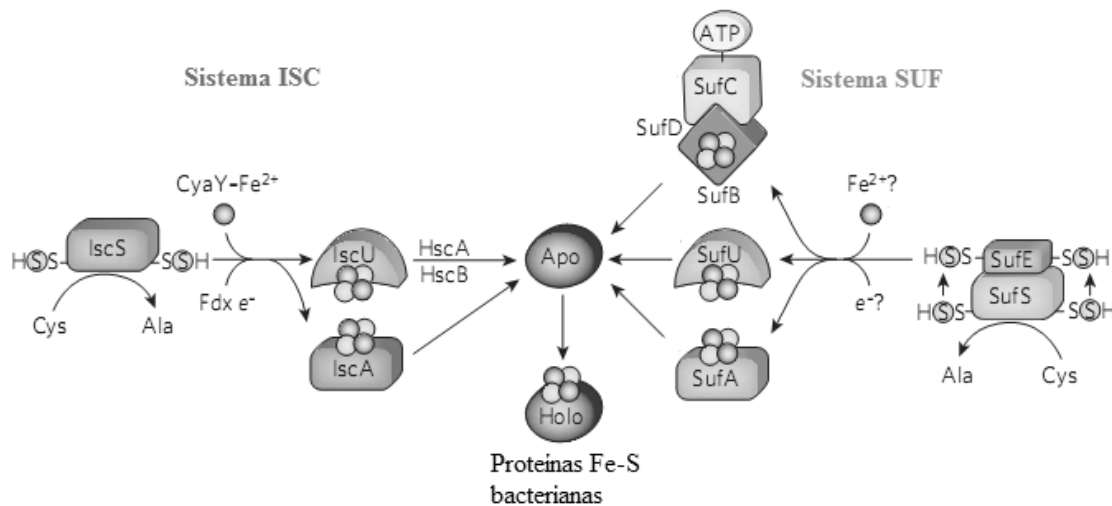


Figura 4. Modelo de formação de cofatores dos sistemas ISC e SUF bacterianos. Comparação entre a formação dos cofatores realizada em dois sistemas bacterianos distintos. Os sistemas apresentam algumas diferenças, principalmente a respeito das proteínas de ancoragem. Entretanto, ambos os sistemas coincidem no seu final, onde há a entrega do cofator formado à apoproteína. (Adaptado de [5]).

As plantas, assim como algumas bactérias, possuem dois sistemas distintos de formação de cofatores [Fe-S]. Entretanto, devido à estrutura complexa da célula vegetal, os dois sistemas presentes se encontram isolados em plastídeos e mitocôndrias. O sistema ISC, proveniente de bactérias, encontra-se localizado na mitocôndria, enquanto que o

sistema SUF, com origem em cianobactérias, encontra-se no plastídeo [7]. Essa relação está exemplificada na Figura 5.

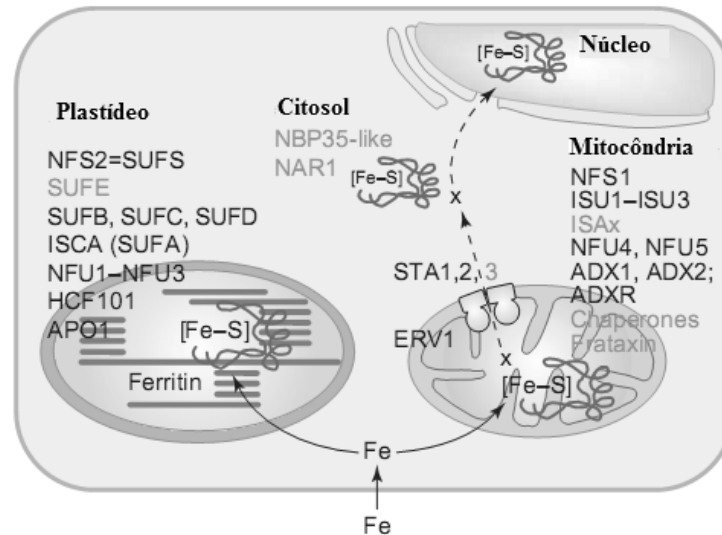


Figura 5. Proteínas responsáveis pela biossíntese de cofatores [Fe-S] em plantas. Esquema da distribuição das proteínas responsáveis pela formação dos agrupamentos [Fe-S] em uma célula vegetal. As cisteína desulfurases encontram-se anotadas como NFS1 (mitocôndria) e NFS2 (plastídeo) (Adaptado de [7]).

1.1.2 Proteínas Fe-S em plantas

Ao contrário de outros organismos, as plantas possuem uma estrutura de biossíntese dos cofatores [Fe-S] diferenciada. Ela encontra-se compartimentalizada em mitocôndria e plastídeo, sendo que cada organela possui um sistema próprio com diferenças bioquímicas e genéticas [7]. Mesmo apresentando diferenças, os sistemas têm um fluxo de informação conservado. Isso inclui a atividade de uma cisteína desulfurase na mobilização do enxofre, ação de enzimas de ancoragem que são responsáveis por capturar o ferro para montagem do cofator e posterior entrega destes cofatores às proteínas Fe-S.

Estima-se que haja aproximadamente 100 classes de proteínas em plantas que contenham agrupamentos [Fe-S] em suas estruturas. Além disso, infere-se que em torno de 2% do conteúdo de enxofre encontrado nestes organismos seja proveniente dos cofatores

[47]. Desta maneira, diversas funções vitais das plantas são dependentes da presença dos cofatores [Fe-S].

Encontram-se na mitocôndria diversas proteínas que possuem cofatores [Fe-S] em sua estrutura. Entre essas proteínas, descrevem-se os complexos da cadeia respiratória I, II e III, a aconitase do ciclo de Krebs, a biotina sintase e a ferredoxina [48-51]. Dessa maneira, o processo de respiração celular está vinculado ao correto funcionamento de montagem e distribuição dos cofatores [Fe-S]. Além disso, fora da mitocôndria, no citosol e núcleo, há proteínas Fe-S relacionadas à transcrição, tradução e reparação do DNA [3, 5, 40, 52].

As proteínas Fe-S presentes no plastídeo requerem um sistema de formação muito eficiente, uma vez que essa organela apresenta elevada concentração de oxigênio e a biogênese dos agrupamentos é sensível a essa molécula [49, 53]. Um estudo recente mostrou que podem existir proteínas de ancoragem específicas para cada tipo de cofator. Nesse contexto, foi mostrado que, em cloroplasto, a proteína de ancoragem HCF101 é responsável pelo carregamento de cofatores [4Fe-4S], destinando-os para o complexo do fotossistema I e ferredoxina-tiorredoxina redutase [54].

No plastídeo, diversas proteínas Fe-S envolvidas na fotossíntese estão presentes (Figura 6). Esses cofatores são encontrados, por exemplo, nas proteínas do tipo Rieske, no fotossistema I, na ferredoxina e na ferredoxina-tiorredoxina redutase. Além disso, há proteínas Fe-S envolvidas na assimilação de nitrogênio (nitrito redutase), na assimilação de enxofre (sulfito redutase), no transporte de proteínas (Tic55) e na biossíntese de aminoácidos (glutamato sintase) [4, 5, 49, 55, 56].

A proteína Fe-S Rieske compõe o complexo do citocromo *b₆f* da membrana tilacóide dos cloroplastos. Ela tem como função receber elétrons no plastoquinol e transferi-los para o ferro heme do citocromo *f*. Essa transferência de elétrons é mediada pela presença do cofator [2Fe-2S] na estrutura da proteína Rieske [7, 57]. Estudos mostraram que a inibição da atividade dessa proteína ocorre quando há ligação de uma molécula ao cofator, impedindo o transporte de elétrons e, conseqüentemente, a atividade

de oxidoreductase [58]. A proteína Rieske tem parte N-terminal hidrofóbica e responsável pela ligação à membrana do tilacóide, enquanto que a porção C-terminal possui aminoácidos cisteína e histidina conservados para ligação com o cofator. A ausência dessa proteína acarreta na não formação do complexo do citocromo [59]. Dessa maneira, a proteína descrita acima se mostra essencial para o evento fotossintético, uma vez que o transporte de elétrons entre fotossistema I (PSI), citocromo *b₆f* e fotossistema II (PSII) caracteriza o processo.

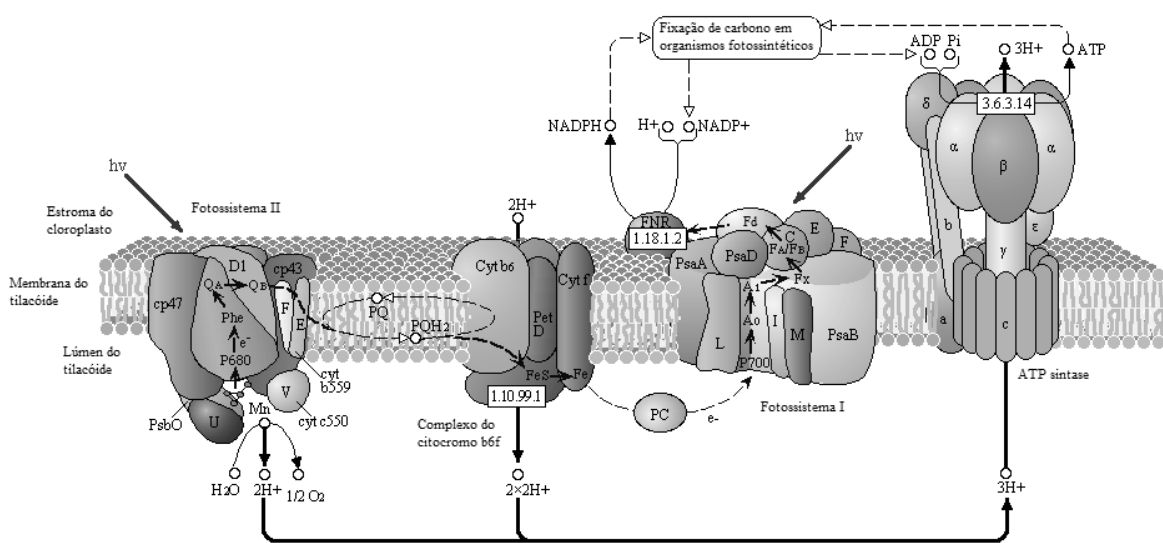


Figura 6. Esquema da fotossíntese. O esquema mostra os complexos envolvidos na fotossíntese: fotossistema II, complexo do citocromo *b₆f*, fotossistema I e ATP sintase. Dentre as proteínas envolvidas no processo exemplificado, diversas são descritas como proteínas Fe-S. São elas: uma proteína do tipo Rieske localizada no citocromo *b₆f* que recebe elétrons do plastoquinol (PQH₂); as subunidades PsaA, PsaB e PsaC do fotossistema I; a ferredoxina (Fd) associada ao fotossistema I. (Adaptado de www.genome.jp/kegg/).

Além da proteína do complexo do citocromo *b₆f* depender da presença de cofatores [Fe-S], mais três subunidade do PSI requerem essa estrutura para sua correta atividade. São elas, as subunidades PsaA e PsaB que se ligam ao agrupamento [4Fe-4S] e a subunidade PsaC que interage com dois cofatores [4Fe-4S] [7, 49]. Sendo assim, os cofatores [Fe-S] são estruturas fundamentais na manutenção da estrutura dos fotossistemas. Estudos mostram que a maior causa de fotoinibição de cloroplastos é a inativação dos cofatores [Fe-S] presentes no PSI [60, 61].

1.1.3 Cisteína desulfurase

As cisteína desulfurases são enzimas do grupo das aminotransferases dependentes de piridoxal 5'-fosfato (PLP). Essa enzima possui algumas características descritas experimentalmente: (a) a cisteína do sítio ativo é altamente reativa com agentes alquilantes; (b) a proteína alquilada se torna inativa; (c) a substituição da cisteína do sítio ativo por uma alanina anula a atividade da enzima; (d) a vinilglicina é um inibidor da reação de desulfurase, pois forma uma ligação covalente com o sítio ativo; (e) quando a cisteína desulfurase é incubada com L-cisteína há formação de ligação persulfito no sítio ativo. Desta maneira, a atividade catalítica dessa enzima é descrita como a conversão de L-cisteína em L-alanina através da captura da molécula de enxofre, isso acontece mediante ataque nucleofílico que forma uma ligação persulfito com o resíduo de cisteína conservado da cadeia polipeptídica [3, 30, 31] (Figura 7). A análise da estrutura cristalográfica de uma das cisteína desulfurases de *Escherichia coli* mostrou que essa enzima está organizada em homodímeros contendo dois domínios, um onde há ligação ao cofator PLP e outro onde se encontra localizado o sítio ativo [39] (Figura 8).

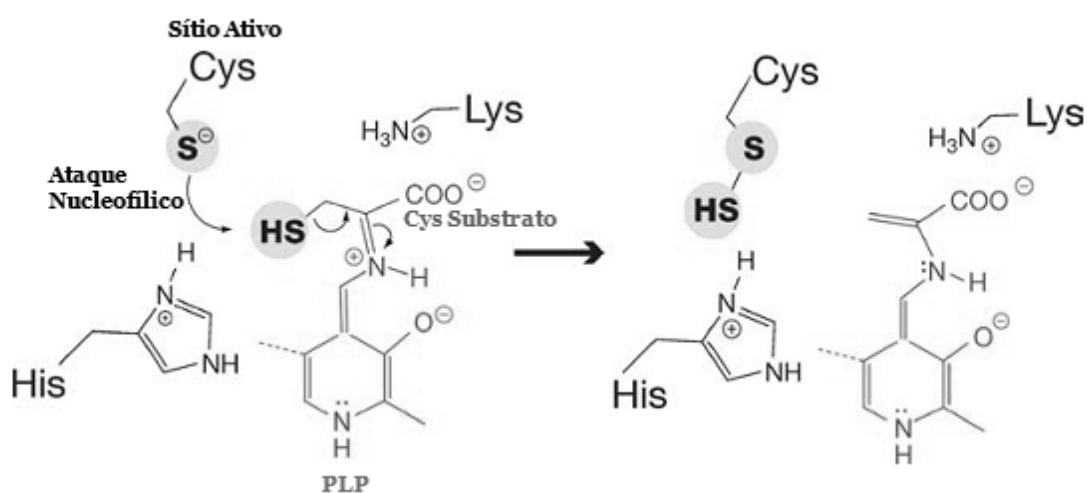


Figura 7. Mecanismo de ação da cisteína desulfurase. Esquema da captura de enxofre pela ação de uma cisteína desulfurase. Os aminoácidos histidina e lisina ancoram o cofator PLP enquanto que a cisteína do sítio ativo promove ataque nucleofílico ao enxofre do substrato. (Adaptado de [3]).

As cisteína desulfurases apresentam distribuição variada entre os organismos, podendo apresentar de uma a três versões numa mesma célula. Em bactérias, organismos procariotos, são encontradas cisteína desulfurases com origem nos três sistemas descritos. Em *Escherichia coli* proteínas dos sistemas ISC e SUF são encontradas, em *Azotobacter vinelandii* dos sistemas ISC e NIF, em cianobactérias do sistema SUF e em *Pseudomonas* do grupo ISC [40]. Células eucarióticas não fotossintetizantes apresentam uma cisteína desulfurase homóloga ao grupo ISC em suas mitocôndrias, a qual está envolvida na maturação de proteínas Fe-S fora das organelas. A maior parte das células eucarióticas fotossintetizantes apresenta, da mesma forma, uma proteína homóloga ao grupo ISC nas mitocôndrias. Entretanto, outra proteína, homóloga ao sistema SUF, está localizada nos plastídeos [7, 49, 51, 62].

Recentemente, com o sequenciamento do genoma de *Chlamydomonas reinhardtii*, constatou-se que este organismo possui três sequências codificadoras de cisteína desulfurases. A primeira pertence ao sistema ISC, é chamada de NFS1 e homóloga a NFS1 mitocondrial de *A. thaliana*; a segunda pertence ao sistema SUF, é chamada de SUFS e é homóloga a NFS2 plastidial de *A. thaliana*; a terceira, e última, é chamada de CSD2 e não possui homólogo em *A. thaliana*, entretanto, tem similaridade com uma cisteína desulfurase de *Synechocystis* [22].

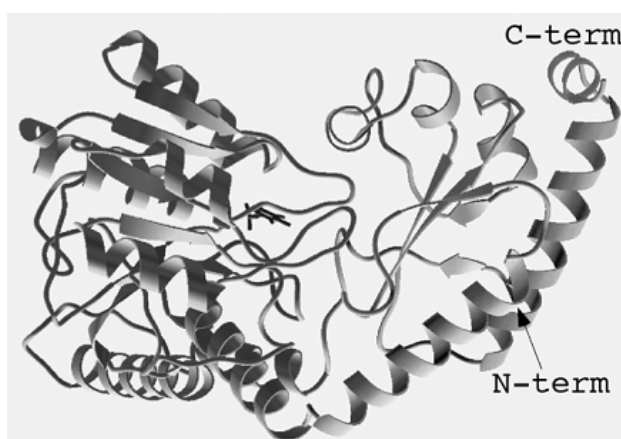


Figura 8. Estrutura do monômero de IscS de *Escherichia coli*. A estrutura cristalográfica mostra os domínios dessa proteína. Na parte escura, tem-se o domínio maior (resíduos 1-15 e 264-404) onde há a ligação ao cofator PLP; na parte clara, o domínio menor (resíduos 16-263), onde se localiza o sítio ativo. (Adaptado de [39]).

As enzimas que contêm PLP comumente usam aminoácidos como substratos. Este cofator tem como característica a capacidade de se ligar ao substrato e de captar elétrons. Através da purificação de proteína identificou-se que o PLP interage com a cisteína desulfurase atuando como cofator. Diversos estudos mostraram que é possível identificar *in vitro* atividade de desulfurase em espectrofotômetro na presença da enzima, de L-cisteína e do agente redutor ditioneitol (DTT). Não há adição de PLP na reação, pois a indução dessa enzima é feita na presença do cofator. O agente redutor faz com que o produto da reação seja L-alanina e sulfeto, ao invés de L-alanina e enxofre. A identificação da L-cisteína como substrato foi feita por diversos testes com outros aminoácidos, onde somente este foi possível de alterar o padrão de absorção no espectrofotômetro [8, 30].

1.2 Estresses Bióticos e Abióticos

O estresse é definido como um fator externo ao organismo que exerce influência desvantajosa para a planta. Alguns fatores externos podem ser provenientes do ambiente, chamados de fatores abióticos, ou então serem fatores bióticos, como patógenos e insetos predadores. Outro conceito importante é de tolerância ao estresse, que classifica a capacidade da planta em lidar com a situação desfavorável [63].

Alguns fatores são sabidamente essenciais para o correto desenvolvimento dos vegetais, tais como água, dióxido de carbono, luz, oxigênio e elementos minerais. Se algo estiver em falta no ambiente ou então em demasia (quantidade tóxicas), a planta pode ser submetida a estresses ou pode, eventualmente, morrer. Entretanto, as plantas têm se adaptado para sobreviver em condições de adversidade [64]. Algumas rotas do metabolismo vegetal são essenciais para o desenvolvimento. A fotossíntese é extremamente importante para a o crescimento vegetal, entretanto a taxa de fotossíntese não prediz a taxa de crescimento [65]. Sugere-se que a respiração celular seja um parâmetro mais eficiente para o crescimento das plantas [66].

Tanto na natureza quanto na agricultura, as plantas estão constantemente expostas a estresses ambientais. A característica do estresse determina o efeito que ele irá provocar no vegetal. Alguns são abióticos, como temperatura, seca e poluição do ar. Outros são bióticos, como doenças e parasitas [67]. Esses fatores se tornam estressantes para o vegetal em minutos a semanas, dependendo da natureza e severidade do estresse [68]. Se a variação dos parâmetros estiver dentro da faixa aceitável da planta, é possível haver tolerância. A ação desses estresses, a nível molecular, é a geração de radicais livres, como superóxido e peróxido de hidrogênio, que podem danificar moléculas de DNA e membranas. Metais pesados que possuam estados de valência também podem servir como doadores de elétrons [66].

Para estudar os efeitos desses estresses nas plantas, é possível reproduzi-los experimentalmente e analisar as consequências causadas ao vegetal. Tanto o arroz quanto a soja são culturas de grande importância econômica. O estudo da resposta destas espécies a estresses é fundamental para o melhor entendimento de mecanismos de tolerância.

1.2.1 Estresse por frio

Temperaturas de resfriamento encontram-se abaixo de temperaturas normais para o crescimento, mas não baixas o suficiente para promover o congelamento. Quando plantas que são cultivadas em climas quentes (entre 25 e 35°C) são resfriadas a 10°C, há dano por resfriamento. Estes danos podem ser: crescimento lento, descoloração das folhas, lesões nas folhas, aspecto umedecido. Caso as plantas sejam expostas a temperaturas baixas, porém não danosas, antes do resfriamento, há aumento na tolerância. O resfriamento gradual também aumenta a tolerância [63].

O frio encontra-se associado à redução no conteúdo de água e ao estresse osmótico. A estabilidade de várias membranas celulares é importante durante o estresse por frio e por congelamento. Nesse aspecto, o frio é capaz de promover perda de função das membranas, inibindo a fotossíntese, diminuindo as taxas respiratórias e inibindo a síntese protéica. A expressão de proteínas de choque térmico pode auxiliar na resposta a diversos estresses,

incluindo as baixas temperaturas [63]. Durante o estresse por frio há expressão de certos genes e síntese de proteínas específicas para resposta a este estresse [69]. Sabidamente, mais de 100 genes são totalmente regulados pelo frio, o qual está relacionado ao ácido abscísico e ao estresse osmótico [70].

A maior parte das cultivares de arroz sofre danos irreversíveis quando expostas a temperaturas inferiores a 10°C, principalmente quando plântulas. Um estudo comparou a sensibilidade de diferentes cultivares de arroz provenientes de duas subespécies, *japonica* e *indica*. Neste trabalho foi possível mostrar que as cultivares mais sensíveis apresentam 50% das plântulas com danos severos após 12 dias de exposição a 10°C [71].

A soja é capaz de crescer em diversos países que possuem climas bem diferenciados. Testes feitos com diferentes cultivares mostraram que a adaptação a temperaturas extremas pode variar, dependendo das condições nas quais essas plantas foram aclimatadas [72]. Entretanto, de maneira geral, a soja é susceptível ao estresse por frio, que resulta na alta perda de sementes, diminuindo a produtividade [73].

O excesso de luz, assim como o resfriamento, é capaz de promover o aumento da fotoinibição em cloroplastos. A fotoinibição do PSII requer apenas a luz, enquanto que o PSI requer luz e oxigênio. A principal causa deste processo é considerada a inativação dos agrupamentos [Fe-S] do PSI, os quais são sensíveis ao oxigênio [60]. A degradação dos cofatores no PSI leva a sua inativação e posterior degradação das proteínas [74, 75]. Desse modo, estima-se que a resposta a estresses, como o frio, necessitem de cofatores funcionais ou da perturbação destes.

1.2.2 Estresse por alumínio

Mundialmente, estima-se que 50% dos solos com potencial para plantio sejam ácidos, onde a toxicidade por alumínio é o principal fator, limitando a produtividade [76, 77]. Em solos com essa característica, as formas tóxicas de Al se tornam solúveis e se acumulam em concentrações muito altas. Essas substâncias, como o Al^{+3} , são capazes de

inibir o crescimento e as funções das raízes, fazendo com que o campo de cultivo possa ser perdido [78-81].

Os efeitos deletérios promovidos pelo alumínio nas plantas cultivadas acontecem por causa da interferência dessa molécula em diversos processos. O alumínio se acumula de maneira preferencial nas raízes; neste local, ele altera as características da parede celular e da membrana plasmática, aumenta a disponibilidade de ferro pela peroxidação lipídica e oxidação de proteínas [82], interfere nas vias de transdução de sinal [83] e, ainda, pode interagir diretamente com o DNA e o RNA [84]. Mesmo sendo acumulado em maior grau nas raízes, o alumínio promove uma comunicação com a parte aérea, tendo poder de toxicidade na planta como um todo [85]. Deste modo, o acúmulo do alumínio na parte aérea cresce em velocidade bem inferior ao visto em raízes, e quanto maior a concentração de alumínio a qual a planta está exposta, menor o crescimento das raízes [82].

Quando a planta é desafiada por uma alta concentração de alumínio, há indução de diversos genes em muitas espécies vegetais, tais como trigo, milho, cana-de-açúcar, tabaco e *Arabidopsis* [82]. O produto destes genes é, em grande parte, enzimas antioxidantes como glutathione S-transferase, peroxidase e superóxido dismutase [84, 86], mostrando que há correlação entre a toxicidade exercida pelo alumínio e o estresse oxidativo em plantas [87].

Alguns genótipos de arroz apresentam tolerância natural ao alumínio, sugerindo a existência de genes e/ou proteínas que confirmam essa característica a alguns indivíduos da espécie. Os dois mecanismos responsáveis por essa característica são: ou a exclusão do alumínio pelo ápice da raiz (mecanismo de exclusão) ou a tolerância de acúmulo dessa substância no simplasma (mecanismo interno de tolerância) [77]. Entretanto, tem sido mostrado que a interação de ácidos orgânicos com o alumínio previne a ligação da molécula tóxica aos componentes celulares, e é capaz de detoxificar o alumínio interna e externamente [88].

As plântulas de arroz apresentam na superfície de suas raízes uma estrutura formada por placas de ferro que é capaz de liberar oxigênio na rizosfera e, assim, oxidar

e/ou precipitar compostos que se encontram próximos. A presença de Fe(II)-EDTA na solução nutritiva pode induzir a formação dessas placas de ferro. A presença dessas placas funciona como sequestrador de alumínio nas raízes, fazendo com que não aja translocação para a parte aérea [89].

Foi descrito experimentalmente por análises proteômicas que plântulas de arroz tolerantes ao alumínio mostram aumento de expressão da enzima cisteína sintase durante o estresse, indicando esta como uma enzima chave no mecanismo de tolerância [79]. O aumento dessa enzima pode acarretar na maior produção de cisteína nas plantas tolerantes, aminoácido que funciona como substrato da enzima cisteína desulfurase.

1.2.3 Estresse por ácido salicílico

Quando as plantas são desafiadas por patógenos e/ou estresses abióticos, uma comunicação para alterar o metabolismo celular e ativar mecanismos de defesa é estabelecida. As moléculas envolvidas nesta sinalização são chamadas de transdutores de sinal e são representadas, entre outras, pelo íon cálcio, o etileno, o ácido jasmônico e o ácido salicílico (AS) [90].

O AS é um hormônio vegetal envolvido, principalmente, na resposta a patógenos e, também, na floração e termogênese [90, 91]. Em resposta a patógenos, o AS e sua forma metilada são fundamentais para o estabelecimento da resposta hipersensível e a resistência sistêmica adquirida [92].

Quando a célula vegetal é submetida a estresses, sejam eles bióticos ou abióticos, acontecem modificações na composição lipídica das membranas. Dependendo do grau de alteração provocado pelo estresse a planta pode se adaptar àquela condição, desencadear uma resposta ou então pode perder sua estrutura de membrana. Plântulas de soja tratadas com AS induzem estresse oxidativo e alteram propriedades respiratórias em plântulas de soja [93].

1.3 *Oryza sativa* (L.)

O arroz pertence à família das gramíneas (Poacea), e as espécies cultivadas pertencem ao gênero *Oryza*, o qual provavelmente teve origem há cerca de 130 milhões de anos [94]. Existem 21 espécies no gênero *Oryza* e, destas, nove das espécies nativas são tetraplóides, enquanto que as espécies cultivadas são diplóides [95]. Foi proposta a divisão em três grupos das espécies do gênero *Oryza*: (1) *O. sativa* e relacionados, (2) *O. officinalis* e relacionados, e (3) espécies com relação mais distante [96]. Atualmente, existem duas espécies de arroz que são cultivadas e estima-se que a domesticação tenha iniciado há nove mil anos [97]. *O. sativa*, ou arroz asiático, tem cultivo mundial, enquanto *O. glaberrima*, ou arroz africano, tem cultivo limitado à região oeste do continente [98].

Os cereais correspondem a mais de 60% da produção total da agricultura mundial, sendo o arroz, o trigo e o milho os três mais importantes [99]. A produção anual de cada um destes cereais chega a 500 milhões de toneladas. A Ásia é o local onde 90% da produção de arroz encontram-se concentrados. Em 1995, a China e a Índia tinham o controle de mais de 55,5% da produção deste cereal. A maior parte da produção de arroz é consumida pelos humanos e em torno de um-terço da população depende deste alimento para mais de 50% da sua ingestão calórica diária [98].

O. sativa, portanto, é um dos maiores suprimentos alimentares destinados à população mundial crescente, especialmente em países em desenvolvimento [100]. O cultivo do arroz tem distribuição mundial e, além da sua importância econômica global, ele é considerado um modelo para o estudo de plantas monocotiledôneas [79].

Devido ao seu cultivo ter sido feito em diversas áreas do globo, cultivares diferentes de arroz foram geradas. Estima-se que haja 120 mil variedades distintas no mundo, enquanto que a China possui 40 mil e a Índia em torno de 25 mil em seus bancos genéticos. As cultivares podem variar quanto ao tempo de crescimento, que pode ser desde 80 até 280 dias. Além disso, elas podem ser sensíveis ou não sensíveis ao fotoperíodo, podem variar quanto à tolerância ao frio, à seca e à salinidade [98]. Nesse aspecto,

recentemente um estudo abrangente sobre a resposta de cultivares das ssp. *japonica* e *indica* mostrou que a primeira possui maior resistência à exposição ao frio [71].

1.4 *Glycine max* (L.) Merrill

Diversos vegetais apresentaram duplicações em seus genomas [101, 102]. A soja (*Glycine max*) é considerada uma paleopoliplóide, e estudos demonstram vestígios de antigos eventos de poliploidia. Ainda, por intermédio de experimentos de hibridização, demonstrou-se que vários segmentos são suplicados e que há homologia entre cromossomos [103]. Análises filogenéticas usando 39 famílias de genes sugeriram que dois eventos de poliploidia ocorreram no genoma da soja. O primeiro evento deve ter ocorrido no ancestral comum de soja e *Medicago truncatula*, e, o segundo evento, relativamente recente, ocorreu em soja após a divergência das duas espécies [104].

A soja cultivada tem como origem o sudeste da Ásia e sua introdução no Brasil se deu no século XIX no estado da Bahia [105]. O crescimento ideal desta espécie se dá em torno de 30°C [63]. Devido ao seu alto conteúdo de proteína e de óleo, a soja tem se tornado uma cultura importante para a dieta humana, alimentação animal e produção de biodiesel. Por isso, a demanda por soja tem aumentado em todo mundo [106]. Além disso, seu papel medicinal tem sido investigado ultimamente, mostrando que a soja é benéfica no tratamento e prevenção de osteoporose e câncer [107]. O consumo adequado da soja traz benefícios à saúde devido ao conteúdo de isoflavonas, saponinas e composto fenólicos antioxidantes [108].

As leguminosas têm como característica a formação de nódulos nas raízes, interações endossimbióticas com bactérias diazotróficas que infectam este órgão [109]. A fixação de nitrogênio promovida por estas estruturas é fonte para formação de biomoléculas essenciais. O estado nutricional da planta inteira pode ser determinado pelo número e qualidade desses nódulos [106].

Em 2009, a produção de soja em grãos no Brasil em toneladas foi superior a 56 milhões, ficando logo após dos Estados Unidos (EUA) que produziram mais de 76 milhões. Estima-se que em 2010, no Brasil, a produção supere os 68 milhões, mostrando um crescimento de 20,3%. A área em hectares plantada em 2009 no Brasil era maior de 21 milhões, em 2010 houve um crescimento de 7,2%, chegando a mais de 23 milhões. Nos EUA essa área chegou em 2010 a mais de 77 milhões. Em 2008, o rendimento nos EUA gerou uma receita de US\$ 27,4 bilhões e rendeu, no Brasil, em torno de R\$ 18,4 bilhões (IBGE, 2010; USDA, 2010).

1.5 Regiões Promotoras

A regulação da expressão gênica é exercida por uma complexa rede molecular. Componentes importantes desta rede são os fatores de transcrição (FTs), moléculas capazes de se ligar ao DNA e interagir com outros FTs. A transcrição é controlada pela identificação de sequências e ligação de FTs à molécula de DNA em regiões específicas chamadas de *cis*-elementos. Os *cis*-elementos compreendem sequências de 5-25 pb e podem estar localizados na região promotora dos genes, e a interação com FTs leva à ativação ou à repressão da transcrição em resposta a fatores ambientais e de desenvolvimento [110, 111].

A região promotora de um gene é comumente descrita como a região próxima à montante do seu sítio de início de transcrição. Mesmo se estabelecendo um padrão de busca, a identificação exata da região promotora dos genes é algo complexo. Isso ocorre porque os promotores divergem bastante, mesmo os motivos mais conhecidos nem sempre se encontram conservados entre promotores. Cada gene possui uma combinação de *cis*-elementos única, fazendo com que o controle de transcrição temporal e espacial seja específico [110]. Como exemplo, o sequenciamento do genoma humano revelou que há 1850 FTs diferentes capazes de identificar motivos diferentes [112].

Outra metodologia que permite a identificação de *cis*-elementos e suas respectivas funções vêm sendo utilizada por meio da análise de bancos de dados de microarranjos. Os

genes são agrupados de acordo com o padrão de expressão em respeito a diferenças espaciais, temporais e de estímulos. Dessa maneira, buscam-se sítios de ligação a FTs que sejam comuns entre genes que possuam o mesmo padrão de expressão. Sendo assim, é possível inferir o envolvimento destes *cis*-elementos em um controle específico. Entretanto, tal metodologia tem certo grau de imprecisão uma vez que nem todos os genes co-regulados têm motivos em comum e que a combinação de motivos pode gerar padrões diferentes de expressão [110, 113]. Além disso, o mesmo *cis*-elemento pode aparecer uma vez em uma determinada região promotora e múltiplas vezes em outra [114].

1. 6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Caracterizar genes que codificam a enzima cisteína desulfurase em arroz (*Oryza sativa*) e soja (*Glycine max*) por meio da análise de expressão gênica e observar a relação destes com a resposta a estresses.

1.6.1.1 Objetivos específicos

- Determinar os genes que codificam as cisteína desulfurases em arroz e soja por meio da homologia com as sequências de nucleotídeo disponíveis de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar os genes que codificam a proteína ISD11 em soja por meio da homologia com sequências de *A. thaliana* e *Saccharomyces cerevisiae*.
- Caracterizar os genes *NFS1* e *NFS2* segundo seu nível de transcritos pelo método de RT-qPCR em diferentes órgãos e diferentes condições de estresses aplicados a plântulas de *O. sativa*.
- Caracterizar os genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* segundo seu nível de transcritos pelo método de RT-qPCR em diferentes órgãos e diferentes condições de estresses aplicados a plântulas de *G. max*.
- Análise dos *cis*-elementos presentes nas regiões promotoras dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* de *G. max*.

CAPÍTULO II

Análise da expressão diferencial dos genes codificadores de cisteína desulfurases de soja

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Identificação dos genes envolvidos na biossíntese de cofatores [Fe-S]

Um método de similaridade foi realizado para identificar os genes que codificam cisteína desulfurases na anotação Glyma1 do genoma da soja. Utilizou-se sequências de cisteína desulfurases conhecidas de *Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* sp. e *Escherichia coli* como modelo para busca no banco de dados do Phytozome [115]. Para confirmar a identidade proteica, as sequências foram submetidas a uma busca por domínios usando o programa Pfam [116]. Além disso, foi feita a busca por aminoácidos conservados, como a cisteína do sítio ativo e os aminoácidos responsáveis pela ancoragem do cofator. Outros genes que estão envolvidos nessa rota de biossíntese, como o *ISD11*, foram encontrados por meio da mesma metodologia descrita acima.

2.1.2 Análise filogenética

O alinhamento das sequências proteicas de cisteína desulfurases de diversas espécies foi feita com o programa ClustalX2 [117] usando os parâmetros padrão e foi visualizada com o programa GeneDoc [118]. A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versão 4.0 [119] pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando *pairwise deletion*. O teste de *bootstrap* foi realizado com 1000 replicações, e os valores superiores a 80% são mostrados como pontos pretos nos nós da árvore filogenética. As espécies e os respectivos números de acesso no banco de dados do Phytozome ou do NCBI são os seguintes: *Glycine max* (Glyma01g40510/ Glyma11g04800/ Glyma09g02450/ Glyma15g13350), *Ricinus communis* (XP_002531989/ XP_002523229), *Arabidopsis thaliana* (At5g65720/ At1g08490), *Zea mays* (ACF83040/ NP_001130656), *Oryza sativa* (NP_001062914/ EEC69110), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001695008/ XP_001701051/ Au9.Cre12.g525650), *Brachypodium distachyon* (Bradi4g28300), *Arabidopsis lyrata* (XP_002864976/ XP_002892460), *Sorghum bicolor* (Sb02g022360/ Sb05g001270), *Carica papaya* (supercontig_129.49/ supercontig_34.204),

Vitis vinifera (XP_002274517/ XP_002267920), *Medicago truncatula* (Medtr5g014960/ Medtr3g105250), *Populus trichocarpa* (XP_002310363/ XP_002314018), *Escherichia coli* (YP_001458463/ NP_289087), *Azotobacter vinelandii* (YP_002797401), *Synechococcus elongates* (NP_665776) e *Synechocystis* sp. (NP_442475).

2.1.3 Análise das sequências de DNA

Para a busca dos sítios de ligação de fatores de transcrição das regiões promotoras de cada gene de soja estudado, analisamos 1.500 pb à montante do sítio putativo de início de transcrição de cada gene anotado no Glyma1. Após isso, foi realizada a análise dessas regiões promotoras, usando o banco de dados PlantCARE (*Plant Cis-Acting Regulatory Elements*) [120]. A análise filogenética das regiões promotoras foi feita como descrito anteriormente, e os valores de *bootstrap* estão indicados nos nós.

2.1.4 Material vegetal e tratamentos

Para estudar a resposta dos genes de cisteína desulfurase sob estresse, foram feitos dois experimentos diferentes. Para os tratamentos com frio e ácido salicílico (AS), utilizou-se sementes de soja (*G. max*) cv. IAS-5 e cv. Conquista, respectivamente. Plantas foram crescidas em potes plásticos (três sementes por pote), preenchidos com vermiculita e solução de meio MS com metade da concentração [121], em uma câmara de cultivo controlada com fotoperíodo de 16/8 h dia/noite ($22,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após ambos os tratamentos, amostras de raiz e folha foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até posterior uso. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata biológica, sendo que cada uma continha, no mínimo, amostra de duas plantas distintas.

2.1.4.1 Tratamento de frio

Para o tratamento de frio, após 11 dias, as plântulas foram transferidas para potes plásticos, sob as mesmas condições, contendo apenas uma plântula. Quando atingiram 27 dias, as plantas foram submetidas ao estresse por frio a 4°C por 0, 5, 10 e 24 horas. O tempo zero, quando as plântulas ainda não tinham entrado em contato com o frio, foi considerado o controle.

2.1.4.2 Tratamento com ácido salicílico

Para o tratamento com AS, as plântulas foram mantidas em vermiculita por 14 dias e, então, transferidas para um meio hidropônico (meio MS com meia força) com adição de 2 mM de AS por 48 horas. As plântulas controle foram submetidas às mesmas condições sem a adição de AS.

2.1.5 Extração de RNA e RT-qPCR

Para estudar a expressão dos genes de cisteína desulfurase, amostras das plântulas controle e tratadas foram coletadas ($n = 4$ por grupo). O RNA total foi isolado dos tecidos congelados pela extração com Trizol (Invitrogen) conforme as instruções fornecidas pelo fabricante e a qualidade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Antes do RT-PCR, as amostras de RNA foram tratadas com *DNase* I (Promega) a 37°C por 30 minutos. A reação de transcrição reversa foi realizada usando a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) seguindo as instruções fornecidas.

A qPCR foi realizada no aparelho *ABI 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) com marcação de SYBR Green (Invitrogen) que permite detectar a presença de fitas duplas de cDNA. Dois genes foram utilizados com referência para os cálculos de normalização e expressão relativa dos genes estudados, são eles: *F-BOX* (proteína da família F-Box) e *MET* (uma metaloprotease). As reações foram feitas em 20 µL contendo 10 µL de amostra de cDNA, 0,1 X SYBR Green I (Invitrogen), 0,025 mM dNTP, 1 X Tampão de Reação de PCR, 3 mM MgCl₂, 0,25 U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e 200 nM de cada oligonucleotídeo anti-senso e senso. Para cada combinação

de oligonucleotídeos foi incluído um controle negativo sem a adição de cDNA. As sequências dos oligonucleotídeos e as características dos produtos de amplificação seguem descritas na Tabela 1. As condições da reação de amplificação estão listadas na Tabela 2. Quatro replicatas biológicas e quatro replicatas técnicas foram realizadas para cada replicata biológica.

Tabela 1 Sequência dos oligonucleotídeos e características dos produtos de amplificação de cada gene.

Gene	Oligonucleotídeo senso / anti-senso (5'- 3')	Tamanho do produto de amplificação (pb)	Locus^a
<i>NFS1_Chr01</i>	CGGAGCACAAGTGCGTCC / CCTCCCAATTCTCTCCATCGGT	200	Glyma01g40510
<i>NFS1_Chr11</i>	CGGAGCACAAGTGCGTCC / CCTCCCAATTTCTCCATGGGC	200	Glyma11g04800
<i>NFS2_Chr09</i>	GTCGAACGAGCTGCCCTTTG / CCCGTGCACTTGAGCTGACA	157	Glyma09g02450
<i>NFS2_Chr15</i>	GTCGAACGAGCTGCCCTTTG / CACGTGCACTTGAGCTGACG	157	Glyma15g13350
<i>ISD11_Chr08</i>	TCCACCGCCTTCGCCC / CGCTGCGGAGCGGAGAAT	91	Glyma08g26490
<i>ISD11_Chr18</i>	TCCACCGCCTTCGCCC / TTGCGGAGCGGAGGGG	89	Glyma18g49970
<i>F-BOX</i>	AGATAGGGAAATGTTGCAGGT/ CTAATGGCAATTGCAGCTCTC	93	CD397253
<i>MET</i>	ATGAATGACGGTTCCCATGTA/ GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT	114	AW310136

^aCódigo de acesso dos bancos de dados do NCBI ou Phytozome.

Tabela 2 Condições de amplificação das qPCRs.

	Tempo	Temperatura (°C)	Reação
40X	5 min	94	Ativação da enzima
	15 seg	94	Desnaturação
	10 seg	60	Anelamento
	15 seg	72	Extensão
	-	60 – 95	Curva de dissociação

2.1.6 Análise dos dados

Os parâmetros de análise dos dados de qPCR foram determinados usando o programa ABI 7500 Real-Time PCR SDS v2.0. Para a análise da expressão relativa dos mRNAs de cisteína desulfurases e dos genes de *ISD11*, nós usamos o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [122]. Para a comparação de diferença entre duas amostras, foi utilizado o Teste T de Student, assumindo uma distribuição bi-caudal e variância independente das amostras analisadas. Nos experimentos de cinética, o método estatístico aplicado foi a Análise de Variância (ANOVA) de uma via e o teste de Duncan como *post hoc* calculados no programa SPSS17. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

2.2 Resultados

2.2.1 Análise das sequências

A busca por genes que codificam cisteína desulfurases permitiu demonstrar que existem quatro genes em *G. max*, que correspondem aos *loci* Glyma01g40510, Glyma09g02450, Glyma11g04800 e Glyma15g13350. Essas proteínas podem ser classificadas em dois grupos distintos: o primeiro grupo é formado por enzimas IscS-like, que estão localizadas nas mitocôndrias, e são codificadas pelos genes localizados nos cromossomos 01 e 11 (*NFS1_Chr01* e *NFS1_Chr11*); o segundo grupo é formado pelas proteínas SufS-like, cisteína desulfurases que se encontram presentes em plastídeos, e são codificados pelos genes localizados nos cromossomos 09 e 15 (*NFS2_Chr09* e *NFS2_Chr15*). Os genes de soja que codificam ambas as enzimas apresentam um grau elevado de similaridade nucleotídica, 94 e 96%, e de identidade protéica, 98 e 97%, respectivamente. Quando se compara as sequências protéicas de soja com as de *A. thaliana*, a conservação dos aminoácidos varia de 76 a 77%. Todas as proteínas analisadas no Pfam apresentaram um domínio de aminotransferase de classe-V característico dessas enzimas. O alinhamento forneceu a localização do aminoácido cisteína do sítio ativo e dos aminoácidos histidina e lisina responsáveis pela ancoragem do cofator (Figuras 1 e 2). Os genes codificadores da proteína ISD11 foram buscados no genoma Glyma1 usando como molde as sequências de *S. cerevisiae* e *A. thaliana*. Foi possível identificar dois *loci* que codificam essa proteína, Glyma08g26490 e Glyma18g49970, e têm identidade protéica de 87% (Figura 3). Os genes de soja que codificam as três proteínas estudadas, NFS1, NFS2 e ISD11, apresentam perfil de genes duplicados em diferentes cromossomos [123].

```

#
Glycine_max_Ch01 : MTSKLIASNLRHQITKSAQNLR--QLLSTAAAPAVPEHDGNNNSNLGMLMKGVRIISGRPLYLDVQATSFVDPRVL : 74
Glycine_max_Ch11 : MTSKLIASNLRHQITKSAQNLR--QLLSTAAPVAVPEHDGNNNSNSGMLMKGVRIISGRPLYLDVQATSFVDPRVL : 74
Arabidopsis_thaliana : MASKVLSATLRRTLTRPHGTFSSCRYLSTAAAPTEVNYEDES-----LMMKGVRIISGRPLYLDVQATTFIDPRVF : 70
Escherichia_coli : -----LMMYGVYRAMKPIFYLLYSATTFVDPRVA : 28

Glycine_max_Ch01 : DAMLPEFYISR--YGNPFSRTHFYGWESDEAVDFARACQVASLIGASPKEIVFTSGATESNNISVKGVMHFYKDKKR : 147
Glycine_max_Ch11 : DAMLPEFYISR--YGNPFSRTHFYGWESDEAVDFARACQVASLIGASPKEIVFTSGATESNNISVKGVMHFYKDKKR : 147
Arabidopsis_thaliana : DAMNASQTHE--YGNPFSRTHFYGWDAENAVENARNQVAKLTASPKPEIVFTSGATEFNMMAVKGMHFYKDKKR : 143
Escherichia_coli : ERMMQIMTMDGHTGNEFASRSRSEFGWQADEAVDITARNQIALDLVGADPREIVFTSGATESDNLAIKGAANFYQRKGR : 103

# # #
Glycine_max_Ch01 : HVITTTTEHKCVLDSRHLQCEGFVYTYLQVESDGLIDLDLRAAIREPDTGLVSVMAVNNEIGVVQPMERIGRIC : 222
Glycine_max_Ch11 : HVITTTTEHKCVLDSRHLQCEGFVYTYLQVESDGLIDLDLRAAIREPDTGLVSVMAVNNEIGVVQPMERIGRIC : 222
Arabidopsis_thaliana : HVITTTTEHKCVLDSRHLQCEGFVYTYLQVETDGLVLDLRLAIREPDTGLVSIAMVNNEIGVVQPMERIGMIC : 218
Escherichia_coli : HIITTSREHKAVLDTCRQLEREQEFVYTYLAPRNGIIDIKELEAMRDTTLVSIAMVNNEIGVVQPMERIGMIC : 178

Glycine_max_Ch01 : KEENVFPHIDAAQALGKIPIDVWRWVSLMSLSGHKIYGPKGVGALYMRRRPRIRVPEQMNGGGQERGISRGTVE : 297
Glycine_max_Ch11 : KEENVFPHIDAAQALGKIPIDVWRWVSLMSLSGHKIYGPKGVGALYMRRRPRIRVPEQMNGGGQERGISRGTVE : 297
Arabidopsis_thaliana : KEENVFPHIDAAQALGKIPVDVWRWVSLMSLSGHKIYGPKGVGALYVRRRPRIRLEPMNGGGQERGLRSGTGA : 293
Escherichia_coli : RARGIIVPHIDATQSVGKLPIDLSQLRVDLMSLSGHKIYGPKGIGALYVRRRPRVRTEPMNGGGQERGMRSGLTE : 253
**

#
Glycine_max_Ch01 : TPIVVGNGSACEVARNEMEYDEKRIISALQQRLINGIREKLDGVVVNGSLERRVYVGNLNLSPAYVEGESLLMGLKE : 372
Glycine_max_Ch11 : TPIVVGNGSACEVARTEMEYDEKRIISALQQRLINGIREKLDGVVVNGSLERRVYVGNLNLSPAYVEGESLLMGLKE : 372
Arabidopsis_thaliana : TQCIVGEGSACELAMREMEYDEKRIKGLQERLINGVREKLDGVVVNGSMDSRVYVGNLNLSPAYVEGESLLMGLKE : 368
Escherichia_coli : VHCIVGEGSPEYRIARPEMATEMERLRGLRNRRLNGIKD-TEPVYLNGLLEHGAPNILLNVSFAVVEGESLLMGLKD : 327

Glycine_max_Ch01 : VAVSSGSACTSASLEPSYVLRALGVDEDMAHTSIRFVIGRFTTEPEIDRAVELTVQVVEKLRMSPLYEMVKEGI : 447
Glycine_max_Ch11 : VAVSSGSACTSASLEPSYVLRALGVDEDMAHTSIRFVIGRFTTEPEIDRAVELTVQVVEKLRMSPLYEMVKEGI : 447
Arabidopsis_thaliana : VAVSSGSACTSASLEPSYVLRALGVDEDMAHTSIRFVIGRFTTKPEIDRAVELTVQVVEKLRMSPLYEMVKEGI : 443
Escherichia_coli : LAVSSGSACTSASLEPSYVLRALGLNDELAAHSSIRFSLGRFTTEPEIDYTIELVRSISGRLELDLSPLEWEMVQGV : 402
*

Glycine_max_Ch01 : NIKDIQWAGH : 457
Glycine_max_Ch11 : NIKDIQWAGH : 457
Arabidopsis_thaliana : DIKNIQWAGH : 453
Escherichia_coli : DLNSIEWEPE : 412

```

Figura 1 Alinhamento das cisteína desulfurases de soja homólogas à proteína IscS de *E. coli*. * indica os resíduos do sítio ativo e do local de ligação do cofator. # indica os aminoácidos que diferem entre os genes duplicados de soja.

```

# #
Glycine_max_Chrom9 : MEVLLPKLFSFKFPSATYCCSITSRSSSYVRFGRFRVSVCASTVNETVAEPTVGSSTLGHSTRPHFFILHCEVNG : 75
Glycine_max_Chrom15 : MEVLLPKLFSFKFPSATYCCSITSRSSSYVRFGRFRVSVCASTVNEAVAEPIVGFSLTGHSTRPHFFILHCEVNG : 75
Arabidopsis_thaliana : MEGVAMKLESFPN----AISIGHRSFSSRVRCSSSLVCSAAAASSATISTDSESVSLGHRVVKDFRILHCEVNG : 70
Escherichia_coli : -----MTFSVDKVRADFFVLSREVNG : 21
Synechocystis_sp : --MVALQIE-----SIAATVRCQFEEILNCEING : 26

#
Glycine_max_Chrom9 : SKLVYLDNAATSQKFTTAVIKALQNYEAYNSVHRGIEHLSAKATDEVESARRKVASFINATDSFEIIFTRKASE : 150
Glycine_max_Chrom15 : SKLVYLDNAATSQKFTTAVIKALQNYEAYNSVHRGIEHLSAKATDEVESARRKVASFINATDSFEIIFTRKASE : 150
Arabidopsis_thaliana : SKLVYLDNAATSQKFAAVLDALQNYEAYNSVHRGIEHLSAKATDEVELARRKVASFINATDSFEIIFTRKASE : 145
Escherichia_coli : LFLVYLDNAATSQKFGQVIDEAEFYRHRGYAAVHRGIEHLSAKATEKMNVRKQASLFINARSABELVFRGITE : 96
Synechocystis_sp : HFLVYLDNAATSQKFRVIEKEMHYENDNANVHRGAECLSVRAITDAEAVRNKVAERFINARSPEIIVYTRNATE : 101

#
Glycine_max_Chrom9 : AINLVAYSWGLSNLKEFDDIILITVPEHHSATVPWQIVACKTGAVLNFDLNQDEIPDIDKLEKMLSRKTKIVVWH : 225
Glycine_max_Chrom15 : AINLVAYSWGLSNLKEFDDIILITVPEHHSATVPWQIVACKTGAVLNFDLNQDEIPDIDKLEKMLSRKTKIVVWH : 225
Arabidopsis_thaliana : AINLVAYSWGLSNLKEPDEVIIITVPEHHSATVPWQIVACKTGAVLNFDLNQDEIPDIDKLEKMLSRKTKIVVWH : 220
Escherichia_coli : GINLVANSWGNENVRAGDNIILITVPEHHSATVPWQIVACKTGAVLNFDLNQDEIPDIDKLEKMLSRKTKIVVWH : 171
Synechocystis_sp : AINLVAYSWGLSNLKEFDDIILITVPEHHSATVPWQIVACKTGAVLNFDLNQDEIPDIDKLEKMLSRKTKIVVWH : 176

#
Glycine_max_Chrom9 : HVSNVLASVLPFRDIAQWAHDVGAQVLDACQSVFHMVVDVQSLNADFIVASSHRMCGPTGIGLYGRIDLLSSM : 300
Glycine_max_Chrom15 : HVSNVLASVLPFRDIAQWAHDVGAQVLDACQSVFHMVVDVQSLNADFIVASSHRMCGPTGIGLYGRIDLLSSM : 300
Arabidopsis_thaliana : HVSNVLASVLPFRDIAQWAHDVGAQVLDACQSVFHMVVDVQSLNADFIVASSHRMCGPTGIGLYGRIDLLSSM : 295
Escherichia_coli : HVSNVLGENPFAEMITLAHQGAQVLDACQSVFHMVVDVQSLNADFIVASSHRMCGPTGIGLYGRIDLLSSM : 246
Synechocystis_sp : HISNITGCVNFAEEIACLAHQGAQVLDACQSAHYHLDVGLIICDNLVASSHRMCGPTGIGLYGRIDLLSSM : 251
**

Glycine_max_Chrom9 : PPFLLGGGEMISVYLDH-STYAEFFSRFEAGTFAIGEAIGLGAADYLSGIGMQTIHLYVEVELGRYLYERILLSVF : 374
Glycine_max_Chrom15 : PPFLLGGGEMISVYLDH-STYAEFFSRFEAGTFAIGEAIGLGAADYLSGIGMQTIHLYVEVELGRYLYERILLSVF : 374
Arabidopsis_thaliana : PPFLLGGGEMISVYLDH-STYAEFFSRFEAGTFAIGEAIGLGAADYLSGIGMQTIHLYVEVELGRYLYERILLSVF : 369
Escherichia_coli : PPFLLGGGEMISVYLDH-STYAEFFSRFEAGTFAIGEAIGLGAADYLSGIGMQTIHLYVEVELGRYLYERILLSVF : 321
Synechocystis_sp : PPFLLGGGEMISVYLDH-STYAEFFSRFEAGTFAIGEAIGLGAADYLSGIGMQTIHLYVEVELGRYLYERILLSVF : 325

Glycine_max_Chrom9 : NIRIYGFAPSEKVERAALCSFNVENIHPIDLAITLDCQHGVAIRSGHCAQPLHRYLGVSSSARASLYFYNTRED : 449
Glycine_max_Chrom15 : NIRIYGFAPSEKVERAALCSFNVENIHPIDLAITLDCQHGVAIRSGHCAQPLHRYLGVSSSARASLYFYNTRED : 449
Arabidopsis_thaliana : DNRHYGFAPSEKVERAALCSFNVENIHPIDLAITLDCQHGVAIRSGHCAQPLHRYLGVSSSARASLYFYNTRED : 444
Escherichia_coli : DILYGFAPSEKVERAALCSFNVENIHPIDLAITLDCQHGVAIRSGHCAQPLHRYLGVSSSARASLYFYNTRED : 390
Synechocystis_sp : QLRHYGFAPSEKVERAALCSFNVENIHPIDLAITLDCQHGVAIRSGHCAQPLHRYLGVSSSARASLYFYNTRED : 398
*

Glycine_max_Chrom9 : VDNIEHMLNDTVSFPN--SLM- : 468
Glycine_max_Chrom15 : VDNIEHMLNDTVSFPN--SLM- : 468
Arabidopsis_thaliana : VDAEIVMLADTVSFPN--SFK- : 463
Escherichia_coli : VDRIVTGLQRIHRLG----- : 406
Synechocystis_sp : IDLELQSLQATRFESDDDFTV : 420

```

Figura 2 Alinhamento das cisteína desulfurases de soja homólogas à proteína SufS de *E. coli*. * indica os resíduos do sítio ativo e do local de ligação do cofator. # indica os aminoácidos que diferem entre os genes duplicados de soja.

```

Glycine_max_Ch08      : MSAAASSSATPSAPQVLSLFRSLLRAAREFFDYNIREYTKERTLDSFRHNATLSDESCISTAFAHGRSQLEVVFR : 75
Glycine_max_Ch18     : MSALAASSATPSAPQGLSLFRSLLRAAREFFDYNIREYTKERTLDSFRHNATLSDENISISTAFAHGRSQLEVVFR : 75
Arabidopsis_thaliana : -----MYSSEVLSLGRALLRAGHGFEDYNIREYSKERTLDGFRMKNLTDPSKVIKAYAEARKQLEVAER : 66
Saccharomyces_cerevisiae : ---MPGFATPTRRQVLSLYREFIKNANQENNYNEREYFLSKTRTFRRNMNQDDEKVMNLIKKEAKNDLQVLR : 71

Glycine_max_Ch08      : QAVVMSIYDSPLRSVMELQQVFF : 98
Glycine_max_Ch18     : QAVVMSIYAPPLRNVMEIQCTFF : 98
Arabidopsis_thaliana : VLKVMLANPEKTKNIMENKIQ-- : 87
Saccharomyces_cerevisiae : QSVHSQMYTFDRLVVEELQGRKH : 94

```

Figura 3 Alinhamento das proteínas ISD11 de soja, *A. thaliana* e *S. cerevisiae*.

2.2.2 Análise filogenética

Uma análise da sequência de aminoácidos entre as proteínas IscS-like e entre as proteínas SufS-like de diferentes espécies de plantas e bactérias mostrou um grau de conservação de 54 a 98% e de 37 a 97%, respectivamente. A construção da árvore filogenética das cisteína desulfurases de diversos organismos mostrou a formação de três grupos distintos (Figura 4). O primeiro grupo é formado pelas sequências de cisteína desulfurase IscS-like e se encontram subdivididas em outros três subgrupos. Há um grupo de proteínas de bactérias e outro de plantas, dentro das proteínas de plantas há diferenciação entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. O segundo grupo é composto pela cisteína desulfurase de *Azotobacter vinelandii*, sendo representante do grupo NifS-like, uma bactéria fixadora de nitrogênio. O terceiro grupo é formado pelas sequências polipeptídicas SufS-like, e também apresentam uma subdivisão entre plantas monocotiledôneas, plantas dicotiledôneas e bactérias. Tanto no grupo IscS-like quanto no grupo SufS-like as proteínas de soja encontram-se agrupadas e próximas à sequência de *Medicago truncatula*. Dispostas de maneira diferente estão as sequências de *Chlamydomonas reinhardtii*, organismo onde recentemente foi descrita a presença de três cisteína desulfurases distintas [22]. Uma das proteínas se encontra no grupo IscS-like, estando presente na mitocôndria desta alga verde, as outras duas apresentam similaridades com outras cisteína desulfurases do grupo SufS-like, podendo estar presente no cloroplasto deste organismo. Algumas proteínas de bactérias estão agrupadas com as cisteína desulfurases localizadas na mitocôndria, e algumas sequências de bactéria e cianobactéria estão agrupada com as proteínas de plastídeo. Essa disposição está de acordo com a teoria

endossimbiótica, que estabelece uma relação entre o hospedeiro endossimbiótico e a bactéria ancestral [5].

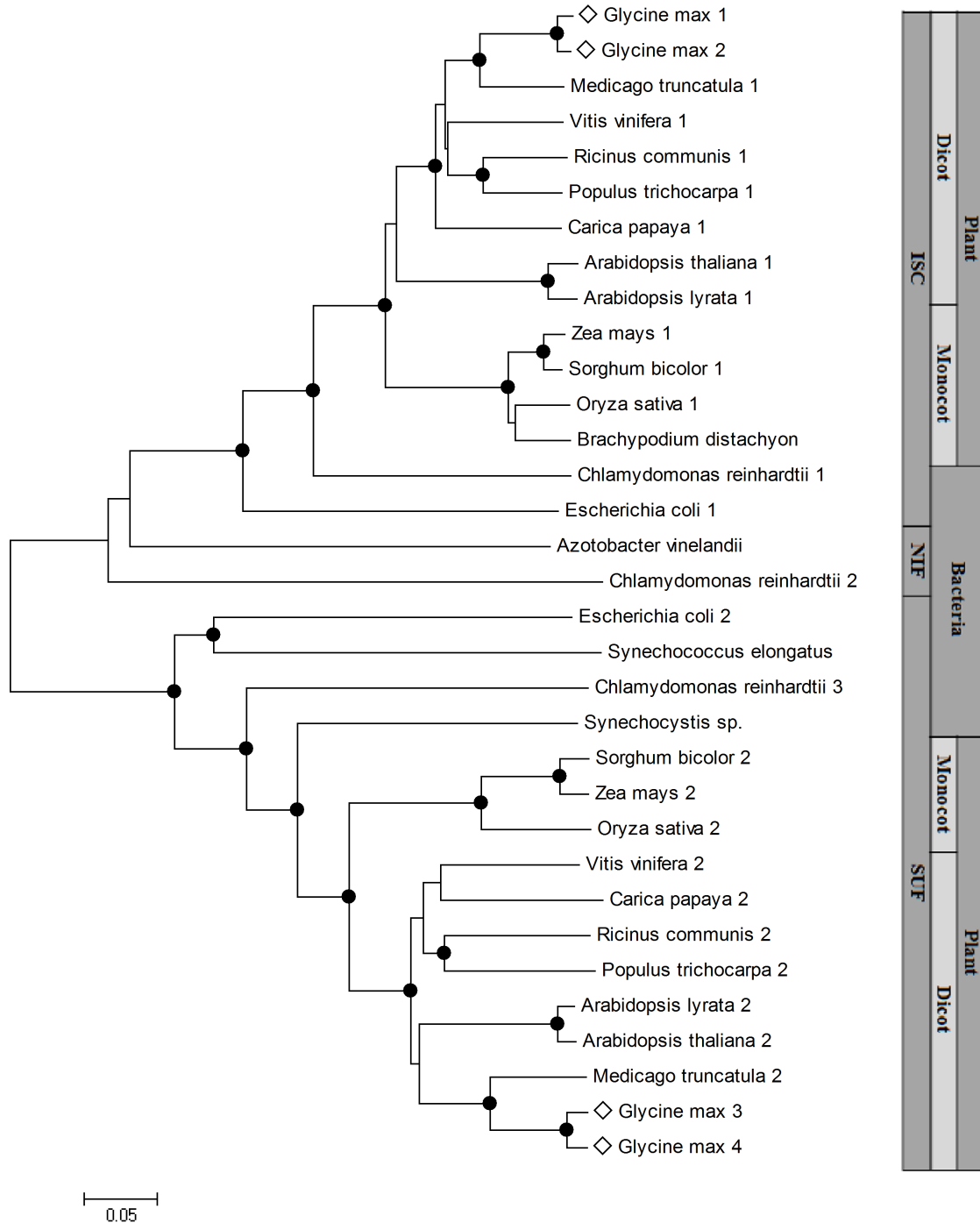


Figura 4 Análise filogenética das proteínas cisteína desulfurase. Encontra-se indicado de qual sistema de formação dos cofatores [Fe-S] a proteína é originária e se é uma sequência de planta ou bactéria. Os pontos pretos representam um valor de *bootstrap* maior que 80%.

2.2.3 Análise dos transcritos dos genes de cisteína desulfurase e ISD11 em soja

Para analisar o nível de transcritos dos genes codificadores de cisteína desulfurase e de ISD11, considerando que algumas proteínas Fe-S estão envolvidas em mecanismos de percepção das condições intra e extracelulares [5], foi realizado um qPCR. Oligonucleotídeos específicos para cada gene de cisteína desulfurase foram projetados (*NFS1_Chr01*, *NFS1_Chr11*, *NFS2_Chr09* e *NFS2_Chr15*) e analisou-se o padrão de expressão em raízes e folhas de plantas não tratadas e tratadas com AS e frio. Ainda, para estudar se o padrão de expressão dos genes *ISD11* tem relação com a expressão dos genes *NFS1*, a qPCR foi feita com plantas controle e plantas tratadas com frio. Para todos os experimentos, os resultados foram normalizados com a expressão dos genes *F-BOX* e *Metalloprotease* [124].

A análise de plantas controle permitiu identificar que os genes duplicados apresentam um padrão de expressão particular. Como há um alto grau de identidade protéica entre as cópias, decidiu-se analisar a soma dos transcritos como um dado de acúmulo total de mRNA no tecido. Em raiz, o gene *NFS1_Chr01* possui um nível de expressão mais elevado que o gene *NFS1_Chr11*, esse padrão é o oposto em folhas. Comparando entre os tecidos, o gene *NFS1_Chr01* tem maior expressão em raiz, enquanto que o gene *NFS1_Chr11* tem maior expressão em folhas. Por outro lado, a análise da soma mostrou que o maior acúmulo de transcritos ocorre na raiz (Figura 5a). Para os genes codificadores da cisteína desulfurase do grupo II, tanto em raiz quanto em folha, o gene *NFS2_Chr09* teve maior nível de expressão que o gene *NFS2_Chr15*. Entre os tecidos, *NFS2_Chr09* acumulou mais transcritos em raiz, e o gene *NFS2_Chr15*, em folha. A soma de transcritos não apresentou diferença significativa entre os dois tecidos estudados (Figura 5b). Para os genes codificadores das proteínas ISD11, em ambos os tecidos o gene *ISD11_Chr18* apresentou maior nível de transcritos. A soma de transcritos é mais elevada em raiz, tecido no qual os dois genes apresentam maior expressão (Figura 5c).

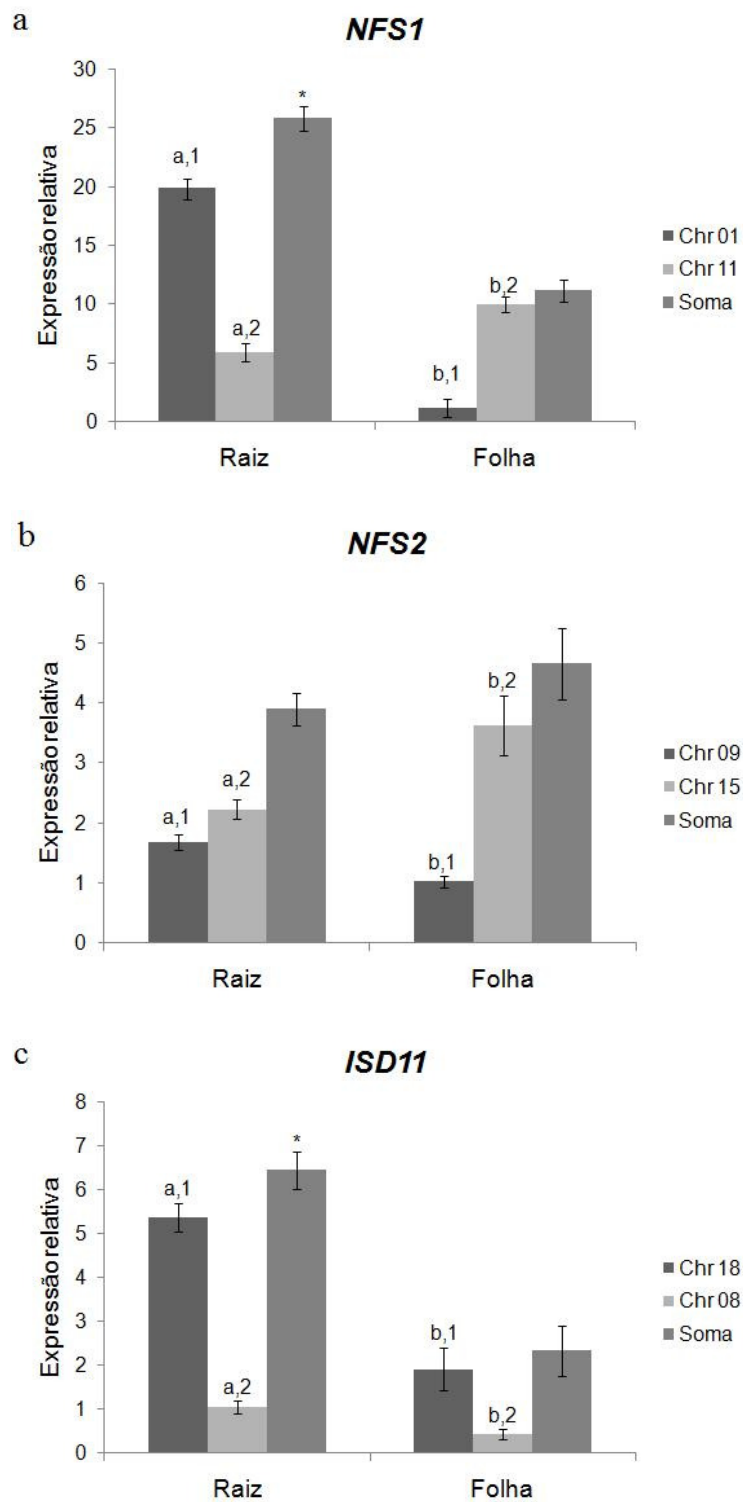
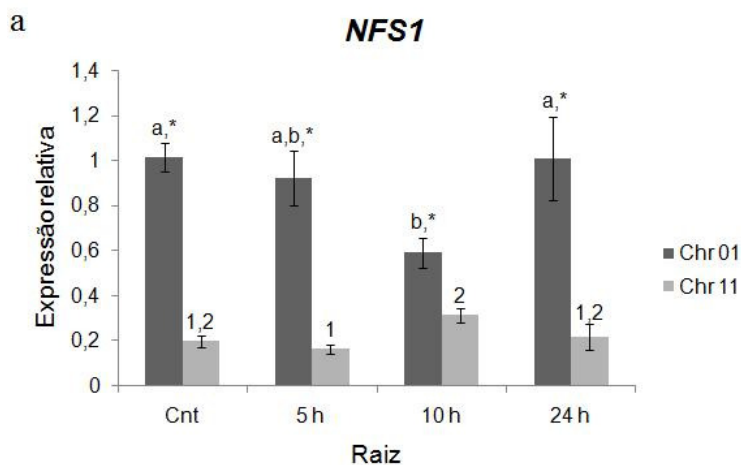
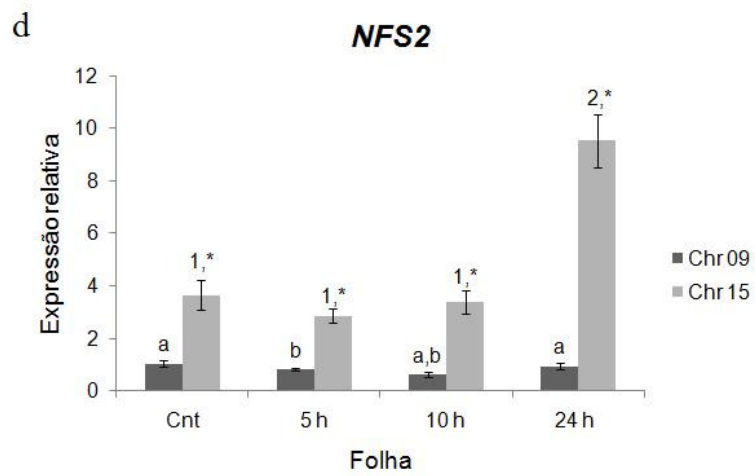
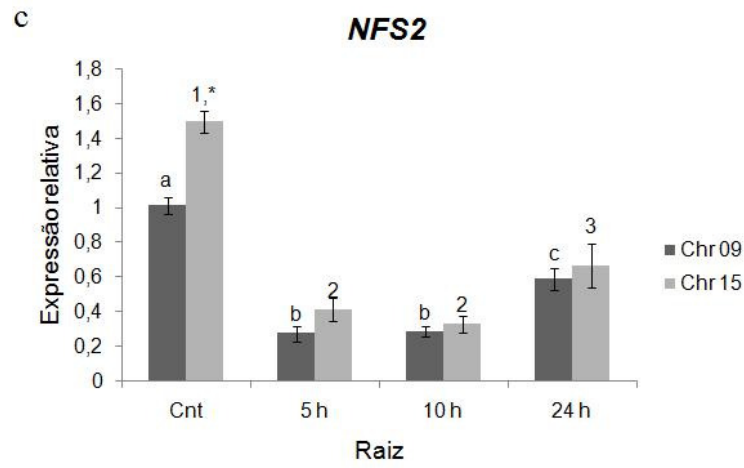
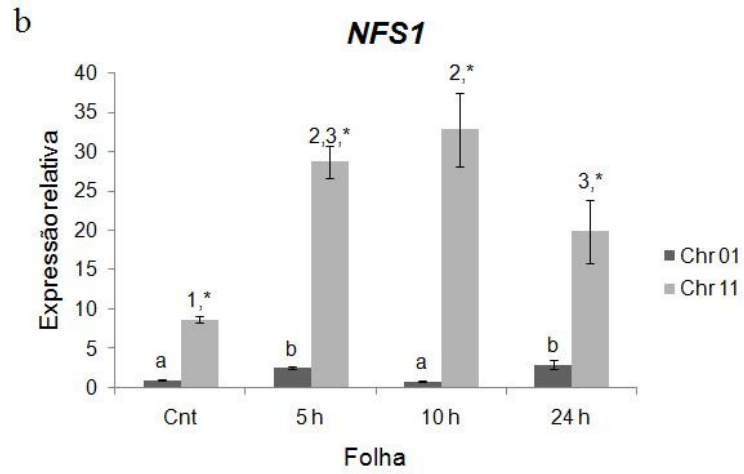


Figura 5 Expressão dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* em raiz e em folha. Análise por RT-qPCR dos genes (a) *NFS1*, (b) *NFS2* e (c) *ISD11* de RNA total de tecidos isolados de raiz e folha. A expressão relativa foi calculada pela qPCR em quatro replicatas biológicas e quatro replicatas técnicas para cada replicada biológica por tecido com o erro padrão demonstrado. Os valores foram normalizados contra a expressão dos genes *F-BOX* e *MET*. *a* e *b* indicam diferença entre os tecidos

de um mesmo gene. 1 e 2 indicam diferença entre dois genes no mesmo tecido. * indica diferença na soma de transcritos.

As plantas que foram tratadas com frio tiveram resposta diferente conforme o gene analisado e o tecido observado. Em raiz, o gene *NFS1_Chr01* reduziu sua expressão durante o tratamento e retornou aos níveis iniciais no último tempo analisado, enquanto que o gene *NFS1_Chr11* oscilou sua expressão e retornou aos níveis iniciais ao término do tratamento (Figura 6a). Já em folha o padrão de expressão é diferente, enquanto que *NFS1_Chr01* oscila sua expressão em níveis mais baixos, o *NFS1_Chr11* aumenta sua expressão durante todo o tratamento (Figura 6b). As análises de soma mostraram que na raiz a expressão dos genes não mostrou alterações, enquanto que um aumento significativo é visto em folha. Já os genes codificadores da proteína NFS2 tiveram seus níveis de transcritos diminuídos em raiz pelo tratamento com frio (Figura 6c). Deste modo, a análise da soma mostrou que o acúmulo total de transcritos também diminuiu. Em folha, o gene *NFS2_Chr09* reduziu a expressão em níveis baixos enquanto que *NFS2_Chr15* aumentou a expressão com o tratamento (Figura 6d), e a soma mostra um aumento de expressão. Em raiz, enquanto *ISD11_Chr18* aumenta sua expressão no tempo final de tratamento, *ISD11_Chr08* não altera seu nível de transcritos (Figura 6e). A soma mostra que houve uma redução na expressão e depois o retorno aos índices iniciais. Em folha, a soma dos transcritos aumenta, da mesma maneira é a resposta de ambos os genes nesse tecido (Figura 6f). Os resultados da soma são mostrados na Figura 7.





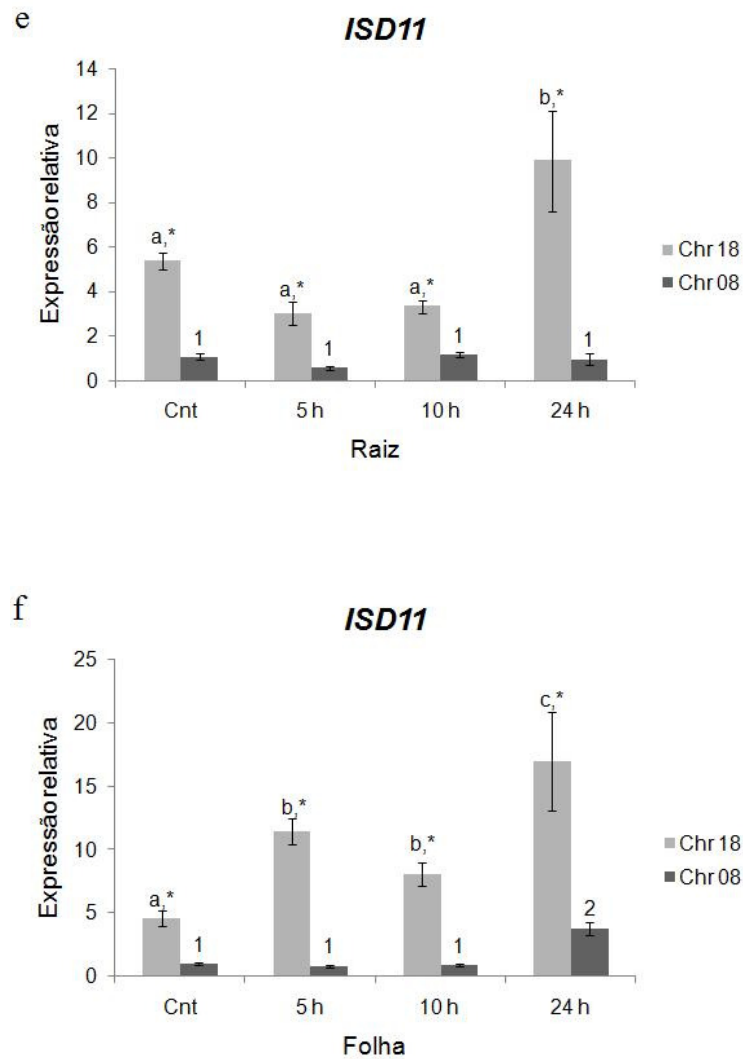
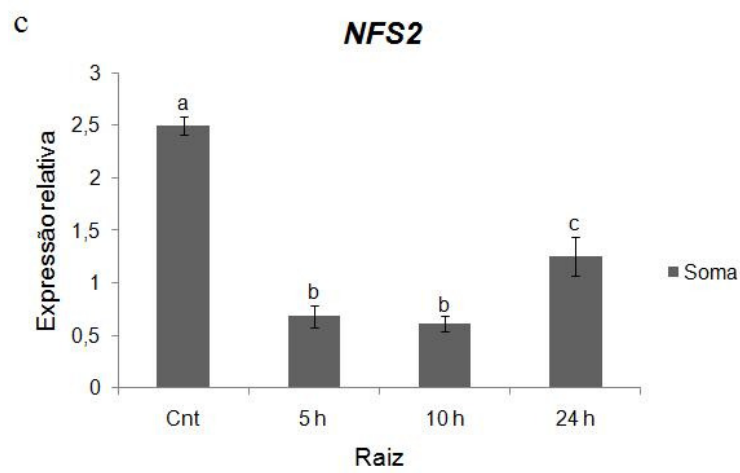
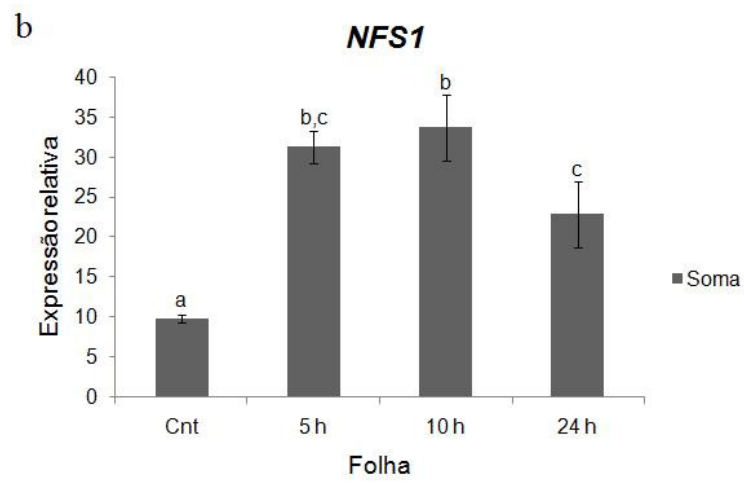
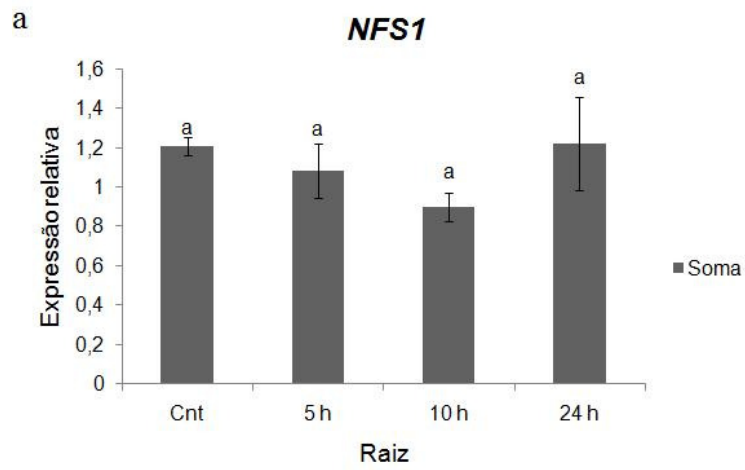


Figura 6 Expressão de *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* em plantas tratadas com frio. Análise por RT-qPCR da expressão de *NFS1* em (a) raiz e (b) folha, de *NFS2* em (c) raiz e (d) folha e de *ISD11* em (e) raiz e (f) folha. A expressão relativa foi calculada pela qPCR em quatro replicatas biológicas e quatro replicatas técnicas para cada replicada biológica por tecido com o erro padrão demonstrado. Os valores foram normalizados contra a expressão dos genes *F-BOX* e *MET*. Letra ou números indicam diferença no nível de transcritos entre os pontos analisados. * indica diferença de expressão entre a duplicação dos genes em um ponto.



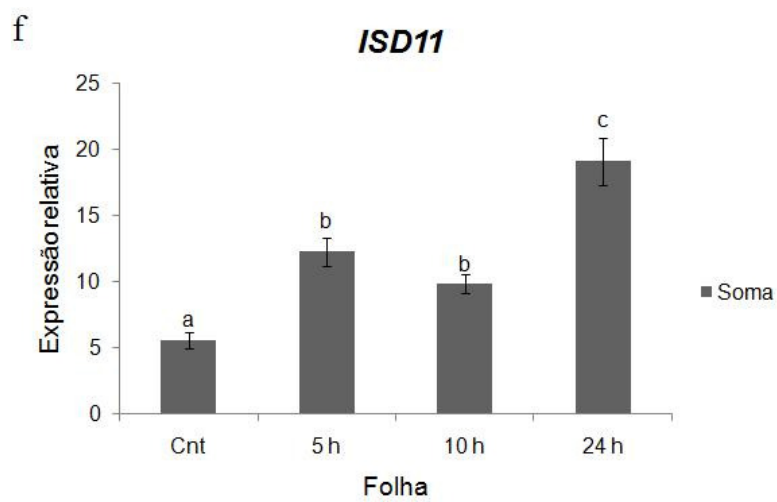
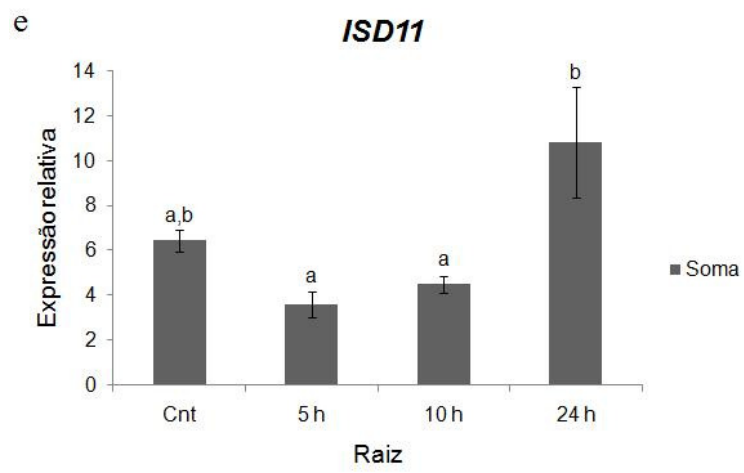
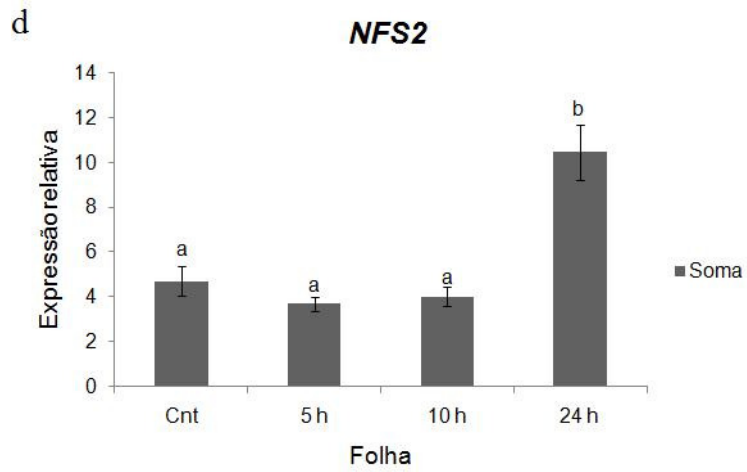
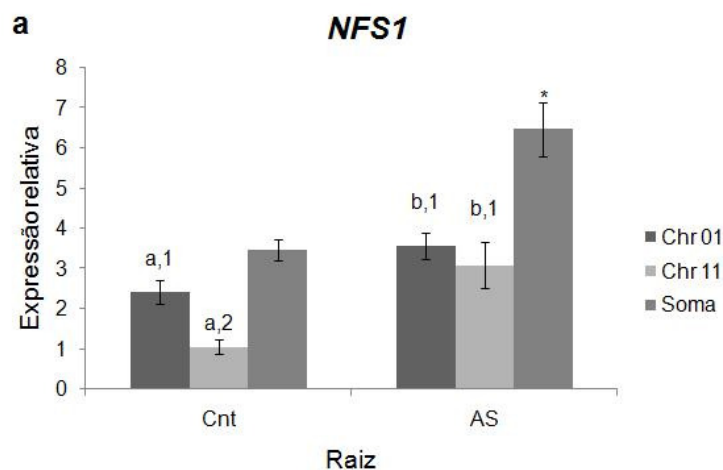


Figura 7 Expressão de mRNA total *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* em plantas tratadas com frio. Análise por RT-qPCR da expressão de *NFS1* em (a) raiz e (b) folha, de *NFS2* em (c) raiz e (d) folha e de *ISD11* em (e) raiz e (f) folha. A expressão relativa foi calculada pela qPCR em quatro replicatas biológicas e quatro replicatas técnicas para cada replicata biológica por tecido com o erro padrão demonstrado. Os valores foram normalizados contra a expressão dos genes *F-BOX* e *MET*. Letra ou números indicam diferença no nível de transcritos entre os pontos analisados. * indica diferença de expressão entre a duplicação dos genes em um ponto.

Quando as plântulas foram tratadas com 2 mM de AS, a resposta de expressão dos genes codificadores das cisteína desulfurases variou conforme gene e tecido analisado. Em raiz, ambos os genes de *NFS1* tiveram o seu nível de transcritos aumentado com o tratamento. Assim, a soma dos transcritos mostrou-se significativamente maior do que antes do tratamento (Figura 8a). Em folhas, o gene *NFS1_Chr01* diminuiu sua expressão, enquanto que o gene *NFS1_Chr11* não mostrou alterações. O acúmulo de mRNA total diminuiu devido ao tratamento com AS (Figura 8b). Os genes codificadores da proteína *NFS2* não alteraram sua expressão em raiz (Figura 8c). Em folha, houve uma diminuição significativa na expressão do gene *NFS2_Chr15*, enquanto que não houve diferença na expressão de *NFS2_Chr09*. Análise de soma mostrou que não houve diferença de expressão em folha (Figura 8d).



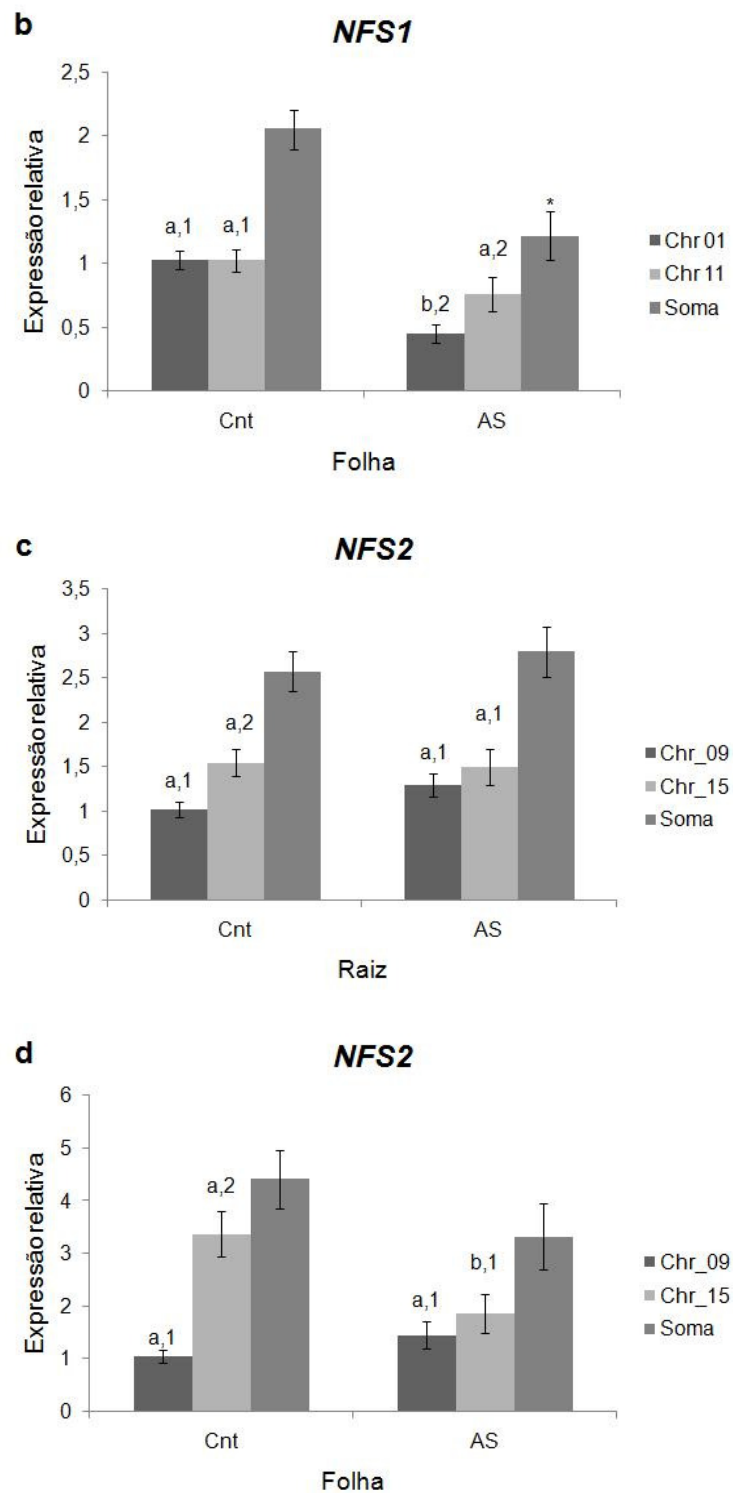


Figura 8 Expressão dos genes *NFS1* e *NFS2* em plântulas tratadas com AS. Análise por RT-qPCR da expressão de *NFS1* em (a) raiz e (b) folha e de *NFS2* em (c) raiz e (d) folha. A expressão relativa foi calculada pela qPCR em quatro replicatas biológicas e quatro replicatas técnicas para cada replicata biológica por tecido com o erro padrão demonstrado. Os valores foram normalizados contra a expressão dos genes *F-BOX* e *MET*. *a* e *b* indicam diferença entre os tecidos de um mesmo

gene. 1 e 2 indicam diferença entre dois genes no mesmo tecido. * indica diferença na soma de transcritos.

2.2.4 Busca por *cis*-elementos nas regiões promotoras

Para identificar os *cis*-elementos putativos presentes nas regiões promotoras dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11*, foi realizada uma busca nos 1500 pb à montante do sítio de início de transcrição de cada gene usando o banco de dados PlantCARE [120]. A análise identificou um total de 178, 168, 163, 151, 195 e 202 sítios putativos de ligação a fatores de transcrição em *NFS1_Chr01*, *NFS1_Chr11*, *NFS2_Chr09*, *NFS2_Chr15*, *ISD11_Chr08* e *ISD11_Chr18*, respectivamente (Tabela 3). Enquanto que alguns dos *cis*-elementos encontrados apareciam múltiplas vezes em cada região promotora, alguns ocorriam uma única vez. Todos os sítios putativos de ligação a fatores de transcrição encontrados estão listados na Tabela 4. Uma análise comparativa entre as regiões promotoras dos genes de cisteína desulfurase mostrou que a similaridade varia entre 8 e 66%, e que a porcentagem de *cis*-elementos compartilhados varia de 38,2 a 76,9%. Quando as regiões promotoras dos genes codificadores de NFS1 são comparadas com as regiões dos genes de ISD11, a similaridade varia de 11 a 66% e o compartilhamento de *cis*-elementos varia entre 44,1 a 76,9% (Tabela 5). Comparando os genes duplicados, eles têm um alto grau de similaridade nas regiões promotoras, e essas sequências divergem menos entre as duplicações de *NFS1* e *ISD11* do que entre as de *NFS2* (Figura 9).

Tabela 3 Número de sítios de ligação de fatores de transcrição e de motivos de ligação em cada 1.500 pb das regiões promotoras dos genes codificadores de cisteína desulfurases de soja analisados.

Gene	Quantidade de sítios de ligação	Quantidade de motivos diferentes
<i>NFS1_Chr01</i>	178	26
<i>NFS1_Chr11</i>	168	34
<i>NFS2_Chr09</i>	163	27
<i>NFS2_Chr15</i>	151	26
<i>ISD11_Chr08</i>	195	31
<i>ISD11_Chr18</i>	202	25

Tabela 4 Sítios putativos de ligação a fatores de transcrição nos promotores dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11*.

Cis-element and organism ^a	Function	<i>NFS1_Chrom1</i>	<i>NFS1_Chrom11</i>	<i>NFS2_Chrom9</i>	<i>NFS2_Chrom15</i>	<i>ISD11_Chrom8</i>	<i>ISD11_Chrom18</i>
3-AF1 binding site <i>Solanum tuberosum</i>	light responsive element			+1016 AAGAGATATTT			
5UTR Py-rich stretch <i>Lycopersicon esculentum</i>	cis-acting element conferring high transcription levels		-1486 TTTCTTCTCT		-551 TTTCTTCTCT	+44 TTTCTTCTCT	+376 TTTCTTCTCT
AAAC-motif <i>Spinacia oleracea</i>	light responsive element				+1342 CAATCAAAACCT		
AAGAA-motif <i>Avena sativa</i>		+1476 gGTAAAGAAA	-984 gGTAAAGAAA		+1273 GAAAGAA	+1126, -510 GAAAGAA	
ACE <i>Petroselinum crispum</i>	cis-acting element involved in light responsiveness	+885 AAAACGTTTA	+949 AAAACGTTTA				+727 AAAACGTTTA
AT-rich element <i>Glycine max</i>	binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)		-769 ATAGAAATCAA		-1409 ATAGAAATCAA		
AT-rich sequence <i>Pisum sativum</i>	element for maximal elicitor-mediated activation (2copies)			-1109 TAAAATACT			
AT1-motif <i>Solanum tuberosum</i>	part of a light responsive module			+1486, -1483 AATTATTTTTTATT	+1488 ATTAATTTTACA		
AE-box <i>Arabidopsis thaliana</i>	part of a module for light response	-694 AGAAACAA				+1103 AGAAACTT	
ARE <i>Zea mays</i>	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	-590 TGGTTT					+977 TGGTTT
BOX 4 <i>Petroselinum crispum</i>	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	+1494, +860, +659, +480 ATTAAT	+861, +696, +495 ATTAAT	+937, +538, +545 ATTAAT	+1463, +488, +542 ATTAAT	+1165, +980 ATTAAT	+1203, +996 ATTAAT
BOX I <i>Pisum sativum</i>	light responsive element	-607 TTTCAAA	-867 TTTCAAA	-1144, +875 TTTCAAA	+469 TTTCAAA	+897, +555 TTTCAAA	-928, +758 TTTCAAA
BOX II <i>Solanum tuberosum</i>	part of a light responsive element			-1029 TGGTAATAA			

BOX III <i>Pisum sativum</i>	protein binding site	+1027 CATTTACACT		+1086 CATTTACACT		+921 CATTTACACT	+356 atCATTTTCACt
BOX-W1 <i>Petroselinum crispum</i>	fungal elicitor responsive element			+500 TTGACC	+119 TTGACC		
CAAT-box (multiple organisms) <i>Glycine max</i>	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	41 hits -1041, +987, -935, +907, -906, +862, -837, -823, -1264 CAATT	31 hits +1409, -1408, +1362, -1235, -1146, +1141, -1080, +189, +5 CAATT	29 hits +1460, +1294, +1228, +1005, -631, -493, +403, +38 CAATT	47 hits +1482, +1465, -1430, -1323, -947, +898, -798, -759, +650, -464, -242, -112, -89, -36 CAATT	39 hits +1334, -1208, -1033, +915, +600, -599, +504, +346, -345, -295, +53 CAATT	28 hits +1377, +1341, -1024, -993, -951, -653, +362 CAATT
CAT-box <i>Arabidopsis thaliana</i>	cis-acting regulatory element related to meristem expression						-1323 GCCACT
CATT-motif <i>Zea mays</i>	part of a light responsive element		-627 GCATTC		+667, +85, -209 GCATTC		+397 CAACGG
CGTCA-motif <i>Hordeum vulgare</i>	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	+1354, +287 CGTCA	+963, +478, +65 CGTCA			-35 CGTCA	
ERE <i>Dianthus caryophyllus</i>	ethylene-responsive element		-867 ATTTCAAA			+556 ATTTCAAA	
G-box <i>Solanum tuberosum</i>	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness			-1161 CACATGG			+1351 CACATGG
GA-motif <i>Helianthus annuus</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	part of a light responsive element		-206, +105 AAAGATGA ATAGATAA	-893 AAAGATGA	-889 AAAGATGA		
GAG-motif <i>Hordeum vulgare</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	part of a light responsive element	-782 GGAGATG	-34 AGAGAGT			-742, -683, -699 GGAGATG AGAGAGT	-519 AGAGAGT
Gap-box <i>Arabidopsis thaliana</i>	part of a light responsive element					+163 AAATGGAGA	
GARE-motif <i>Brassica oleracea</i>	gibberellin-responsive element		-912, +794 AAACAGA		-1197, -382, -537 TCTGTTG, AAACAGA		+142 AAACAGA
GATA-motif <i>Solanum tuberosum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>							-1242, -142 AAGGATAAGG AAGATAAGATT
GT1-motif <i>Solanum tuberosum</i>	light responsive element	+1254, -955 AATCCACA				-839 GTGTGTGAA	-699 GTGTGTGAA

<i>Arabidopsis thaliana</i>		GGTTAA					
HSE <i>Brassica oleracea</i>	cis-acting element involved in heat stress responsiveness	+1376 AAAAAATTTTC		-1447 AAAAAATTTTC	+1193, -511 AGAAAATTCG, AAAAAATTTTC	+561 AAAAAATTTTC	
I-box <i>Helianthus annuus</i> <i>Glycine max</i> <i>Zea mays</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	part of a light responsive element					-1225, -205 atGATAAGGTC GATAAGATA	-1244, -118, +457, -1402, +1242, - 374 gGATAAGGTG aAGATAAGA CTCTTATGCT GATAAGATT
L-box <i>Lycopersicon esculentum</i>	part of a light responsive element						+1147 AAATTAACCAAC
LAMP- element <i>Pisum sativum</i>	part of a light responsive element		+202 CTTTATCA				+368 CTTTATCA
LS7 <i>Zea mays</i>					+163 CAGATTTATTTTAA		
LTR <i>Hordeum vulgare</i>	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness				-807 CCGAAA		
MBS <i>Arabidopsis thaliana</i>	MYB binding site involved in drought-inducibility	+1347, -1087, +1210 CAACTG	-1284, -503 CAACTG, TAACTG	+26 TAACTG	+1037, -705 CAACTG	-132 CAACTG	
MBSI <i>Petunia hybrida</i>	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation		+509 TTTTTACGGTTA				
MBSII <i>Petunia hybrida</i>	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation		-1048 AAAAGTTAGTTA				
MNF1 <i>Zea mays</i>	light responsive element					-1374 GTGCCC(A/T)(A/T)	
MRE <i>Petroselinum crispum</i>	MYB binding site involved in light responsiveness		-129 AACCTAA				
O2-site <i>Zea mays</i>	cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation			-1135 GATGACATGG		-1223, +670 GATGATATGG	

OBP-1 site <i>Arabidopsis thaliana</i>	cis-acting regulatory element					+490 TACACTTTTGG	
P-box <i>Oryza sativa</i>	gibberellin-responsive element			+1147 CCTTTTG			
Skn-1_motif <i>Oryza sativa</i>	cis-acting regulatory element required for endosperm expression	-1057, +48 GTCAT	-1178 GTCAT	-1492, -626, +1131, +1373, -683 GTCAT	-294, -237 GTCAT	-1254 GTCAT	-1286 GTCAT
Sp1 <i>Zea mays</i>	light responsive element		+15 CC(G/A)CCC	+4 CC(G/A)CCC	+1171, +1163, +1167, +1159, +1169, +1161, +1165, +1042, +1170, +1162, +1166, +1160, +1168, +1164 CC(G/A)CCC	+926 CC(G/A)CCC	
TATA-box (multiple organisms) <i>Glycine max</i>	core promoter element around - 30 of transcription start	98 hits -1495, +1492, - 1322, -940, -685, -513, -490, +478, -469, +460, -329, +308, -271, -225, +216, +213 TAATA	95 hits +1274, -1085, - 1051, -887, -729, -706, +694, +634, -612, -499, -496, - 462, +452, +449, +107 TAATA	96 hits +1367, -1312, - 1028, -938, -935, +868, -839, -752, +612, -556, -539, - 512, -414, -124 TAATA	54 hits +1497, +1494, +1318, -1097, - 1094, -966, +753, - 538, +453, +387, +246, +223, +137 TAATA	115 hits -1490, +1410, -1166, +1163, +978, +905, - 826, +534, +429, +426, -413, +364, - 326, -308, -214 TAATA	141 hits -1204, +1201, - 940, -553, +285, +282, -277, -235, +218, -202, -107 TAATA
TATCCAT/C-motif <i>Oryza sativa</i>					-409 TATCCAT		
TC-rich repeats <i>Nicotiana tabacum</i>	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness	-1083, -338 ATTTTCTCCA ATTTTCTTCA	-1280, -166, -426 ATTTTCTCCA GTTTTCTTAC	+1444, -801 ATTTTCTCCA ATTTTCTTCA	-408 ATTTTCTCCA	-160 ATTTTCTCCA	
TCA-element <i>Brassica oleracea</i>	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness	+1390 CAGAAAAGGA	-1113 CCATCTTTTT				-121 GAGAAGAATA
TCT-motif <i>Arabidopsis thaliana</i>	part of a light responsive element		-426 TCTTAC	-181 TCTTAC	-578 TCTTAC	-1365 TCTTAC	+113 TCTTAC
TGA-element <i>Brassica oleracea</i>	auxin-responsive element	+19 AACGAC	+152 AACGAC				
TGACG-motif <i>Hordeum vulgare</i>	cis-acting regulatory element involved in the MeJA- responsiveness	-1354, -287 TGACG	-963, -65, -478 TGACG			+35 TGACG	
Unnamed__1 <i>Glycine max</i>		+1488, -1242 GAATTTAATTAA	-1449, -1442	-230		+659 GAATTTAATTAA	+1003 GAATTTAATTAA

<i>Zea mays</i>	60K protein binding site	CGTGG	CGTGG	CGTGG				
Unnamed_2 <i>Petroselinum hortense</i>			-127 AACCTAACCT				-399 ATTAAATTTTAAATT	
Unnamed_3 <i>Zea mays</i>		-1242 CGTGG	-1449, -1442 CGTGG	-230 CGTGG				
Unnamed_4 <i>Petroselinum hortense</i>		+1367, +779, - 1082 CTCC	-1279, +71, -391, +56, -1064, -165 CTCC	+298, -61, +247, +260, +211 CTCC	+1441, -763, +1041, -1121, +869 CTCC	+925, -6, -159, +739, - 10 CTCC		-1432, -847, - 1392, +564 CTCC
Unnamed_6 <i>Zea mays</i> <i>Glycine max</i>	SEF4 factor binding site	+1162, +587 taTAAATATct GCATTTTTATCA	-260, +787 taTAAATATct GCATTTTTATCA		+442 taTAAATATct		-1175, +211 taTAAATATct	
Unnamed_8 <i>Glycine max</i>				-158 CATTTTTGT				
W box <i>Arabidopsis thaliana</i>				+500 TTGACC	+119 TTGACC			
WUN-motif <i>Brassica oleracea</i>	wound-responsive element			-1449 AAATTCCT				
as-2-box <i>Nicotiana tabacum</i>	involved in shoot-specific expression and light responsiveness		-205 GATAatGATG		+918 GATAatGATG	+1186 GATAatGATG		
box S <i>Arabidopsis thaliana</i>				+6 AGCCACC				
chs-CMA2a <i>Petroselinum crispum</i>	part of a light responsive element	+775 TCACTTGA						
Circadian <i>Lycopersicon esculentum</i>	cis-acting regulatory element involved in circadian control	-1404, +69 CAANNNNATC	+276 CAANNNNATC			-125 CAANNNNATC	+98 CAANNNNATC	
dOCT <i>Arabidopsis thaliana</i>	cis-acting regulatory element related to meristem specific activation	+1241 CaCGGATC	+1441 CaCGGATC					

^a Organismo no qual o *cis*-elemento foi descrito, de acordo com o PlantCARE.

Tabela 5 Identidade de sequências (%) entre os 1.500 pb das regiões promotoras dos genes de soja (triângulo superior) e a percentagem de motivos compartilhados (triângulo inferior).

	<i>NFS1_Chr01</i>	<i>NFS1_Chr11</i>	<i>NFS2_Chr09</i>	<i>NFS2_Chr15</i>	<i>ISD11_Chr08</i>	<i>ISD11_Chr18</i>
<i>NFS1_Chr01</i>		66	14	8	18	15
<i>NFS1_Chr11</i>	58.8 / 76.9		9	11	17	11
<i>NFS2_Chr09</i>	44.4 / 46.2	48.1 / 38.2		27	16	12
<i>NFS2_Chr15</i>	42.3 / 42.3	69.2 / 52.9	57.7 / 55.5		11	9
<i>ISD11_Chr08</i>	61.3 / 73.1	67.7 / 61.7	45.2 / 51.7	48.4 / 57.7		59
<i>ISD11_Chr18</i>	56 / 53.8	60 / 44.1	40 / 37	40 / 38.5	60 / 48.4	

A percentagem de motivos compartilhados foi calculada a partir do total de motivos encontrados (Tabela 3) no gene da linha e a quantidade destes que aparecem no gene da coluna, e vice-versa.

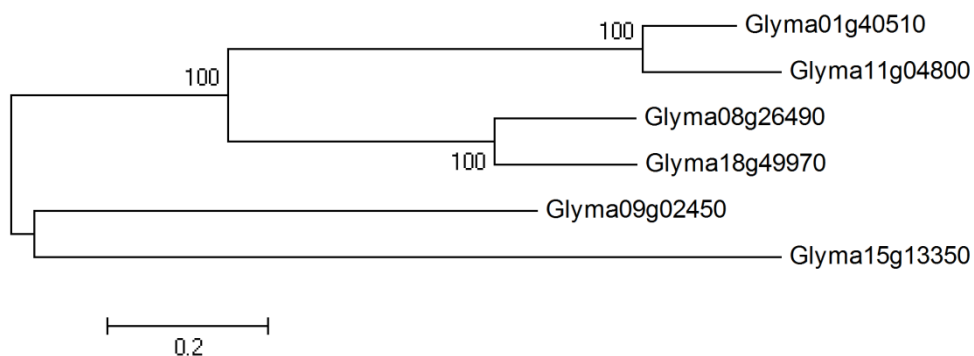


Figura 9 Análise filogenética das regiões promotoras dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11*. Os números indicam a percentagem dos valores de *bootstrap* provenientes de 1000 análises.

2.3 Discussão

A soja é considerada um paleopoliplóide cujo evento de poliploidização deve ter ocorrido no ancestral comum de soja e de *Medicago truncatula*, e se sugere que outro evento destes tenha ocorrido depois da divergência destas duas espécies [103, 104]. Os genes de soja codificadores de cisteína desulfurases analisados mostraram-se duplicados e apresentaram alto grau de conservação entre as cópias, genes *NFS1* compartilham 94% da sua sequência de aminoácidos, genes *NFS2* compartilham 96% e os genes *ISD11* compartilham 91%. De acordo com esses dados, esses genes apresentaram as características de genes duplicados em diferentes cromossomos [123]. Devido aos eventos de poliploidização, ocorreram mutações e rearranjos nos genes duplicados, o que resultou na diversificação da expressão gênica [114]. Neste capítulo, apresentamos a caracterização dos promotores dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11*, e mostramos os níveis de transcritos em diferentes tecidos e em resposta ao estresse dos genes codificadores das cisteína desulfurases e da proteína ISD11 envolvidos na biossíntese dos cofatores [Fe-S].

Três sistemas distintos responsáveis pela formação dos cofatores [Fe-S] foram descritos [3], e os genes envolvidos nessa rota parecem ser conservados em bactérias, fungos, animais e plantas [7, 27]. Foi feita uma análise filogenética com diversas sequências protéicas de cisteína desulfurases de diversas espécies provenientes dos três sistemas de formação descritos (Figura 4). Foi possível identificar os três conjuntos distintos, compostos por proteínas pertencentes aos sistemas ISC, NIF e SUF. Além da organização conforme o sistema, as proteínas se agruparam conforme a origem do organismo, formando grupos de bactérias e plantas. As plantas estão subdivididas em monocotiledôneas e dicotiledôneas, onde estão localizadas as sequências de *G. max*, apresentando proximidade com *M. truncatula*. Comparando nossa análise filogenética com os eventos de poliploidização descritos [104], é possível inferir que a duplicação dos genes codificadores de cisteína desulfurase foram duplicados após a divergência de soja e *M. truncatula*. Desse modo, a soja possui duas cópias desses genes, enquanto que o *M. truncatula* possui apenas uma (Figura 4). As sequências protéicas de *Chlamydomonas reinhardtii*, organismo cujo genoma foi sequenciado recentemente e que apresenta três

genes codificadores para cisteína desulfurases [22], apresentam uma distribuição particular na filogenia. A primeira proteína é encontrada em um ramo anexo ao grupo que concentra as proteínas IscS-like das plantas, a segunda sequência aparece sozinha, não estando vinculada aparentemente de forma direta à nenhuma outra sequência, uma vez que sua origem parece ser de um suposto ancestral comum entre proteínas do sistema ISC e NIF, e a terceira se encontra entre sequências de bactérias e cianobactérias do sistema SUF (Figura 4). Um padrão diferente foi visto nos genes de *ISD11*, onde ambas as espécies possuem os genes duplicados (Figura 10). Assim, esse evento de poliploidização que gerou essa duplicação pode ter ocorrido antes da divergência das espécies.

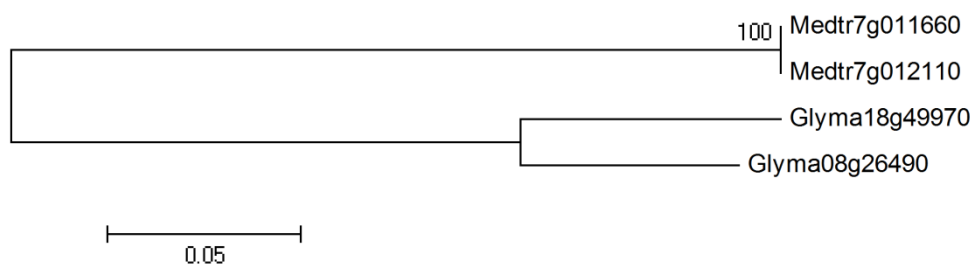


Figura 10 Análise filogenética das proteínas ISD11 de *G. max* e *M. truncatula*. Resultado de análise de *neighbor-joining* de 1.000 replicações.

Os presentes resultados permitem sugerir que os genes *NFS1* e *NFS2* de soja, que codificam proteínas envolvidas na assimilação de enxofre e biossíntese de cofatores [Fe-S] [8], podem estar envolvidos na resposta aos estresses provocados por frio e AS. O enxofre é um macronutriente essencial cuja assimilação compreende a formação de cisteína em uma das etapas [125, 126], a qual vai fazer parte da formação dos SDCs (componentes de defesa que contêm enxofre). Quando há exposição a estresses bióticos e/ou abióticos, a síntese de SDCs é induzida por diferentes sinais, mostrando seu envolvimento na defesa ao estresse. Há um aumento na demanda por cisteína como precursor, devido à síntese de SDCs; dessa maneira, a expressão de genes envolvidos na assimilação de enxofre é induzida [127]. Analisando as plantas tratadas com frio, é possível perceber que, em folhas, os transcritos de *NFS1* e *NFS2* aumentam (Figura 6), talvez devido à resposta ao estresse dos SDCs. Contrastando com o encontrado em folhas, onde foi encontrado um

aumento de expressão quando comparado com plantas controle, houve uma diminuição de acúmulo de transcritos de *NFS2* em raiz. Isso pode ter ocorrido, pois as folhas se encontram mais expostas à baixa temperatura do que as raízes, que estão envolvidas pelo solo. Quanto tratadas com AS, um simulador de estresse biótico, os genes *NFS1* mudaram seu padrão de expressão. No meio hidropônico, com adição de AS, o acúmulo de transcritos de *NFS1* aumentou em raízes, enquanto que diminuiu em folhas (Figura 8). Nos dois experimentos realizados, foi possível identificar um padrão de resposta: os órgãos que estabeleciam o contato primário com o estresse mostraram um aumento na expressão de cisteína desulfurases, enquanto que o menos exposto mostrou um decréscimo (Figura 6, 7 e 8). No tratamento com frio, as folhas ficaram mais expostas, pois as raízes estavam protegidas pelo solo, enquanto que o AS foi diluído no meio hidropônico, propiciando um contato inicial com as raízes. Esse perfil oposto pode ser devido a um mecanismo compensatório presente na resposta em curto prazo ao estresse, e esse perfil pode mudar se as plantas forem expostas a períodos mais longos de estresse.

Quando a célula vegetal é desafiada por estresses bióticos e/ou abióticos, algumas modificações na composição lipídica das membranas ocorrem [93]. Muitas proteínas envolvidas no processo de respiração, como os complexos I, II e III, são proteínas Fe-S [48]. Desse modo, modificações no perfil de expressão dos genes de cisteína desulfurase podem levar a alterações na biossíntese de cofatores [Fe-S] e, por consequência, promover mudanças no perfil de respiração celular. Nesse contexto, foi descrito que as mitocôndrias de soja apresentam modificações no seu conteúdo de lipídios em resposta à baixa temperatura [128], e que essa alteração pode alterar as propriedades respiratórias e a expressão gênica [129, 130]. Considerando que a mitocôndria tem um sistema de exportação que é essencial na maturação de diversas proteínas nucleares e citosólicas, a biossíntese dos cofatores [Fe-S] nessa organela tem uma ligação direta com a atividade de diversas proteínas, como aldeído oxidase e xantina desidrogenase [8, 131, 132]. O cloroplasto é extremamente sensível a estresses abióticos, tais como temperaturas extremas e aumento de espécies reativas de oxigênio. A glutathione está envolvida na defesa contra danos causados por estresse oxidativo no citosol e em outros compartimentos celulares desencadeados por estresses bióticos e abióticos. A síntese desse peptídeo depende da assimilação de enxofre e síntese de cisteína [125-127], como esse aminoácido é o substrato

da enzima cisteína desulfurase [21, 31], a mudança no conteúdo de cisteína pode levar a modificações na sua enzima catalítica.

O AS e sua forma metilada são envolvidos no desenvolvimento e também são fundamentais para a resposta hipersensitiva e para a resistência sistêmica adquirida sob estresse biótico [92, 133]. A formação de espécies reativas de oxigênio pode ser induzida por AS, e estas podem reagir com diversas moléculas celulares, como os lipídios. Como as organelas estão sendo expostas a estresse oxidativo, algumas enzimas antioxidantes devem ser expressas. Uma oxidase alternativa, que tem como função o escoamento de elétrons na cadeia respiratória, tem sido proposta como marcadora funcional para disfunção mitocondrial durante o estresse biótico, e essa enzima é aumentada em soja pelo tratamento com AS [93, 134]. Essa enzima é responsável pela transferência de elétrons da ubiquinona reduzida para o oxigênio molecular, passando pelos complexos III e IV [129], e o complexo III contém cofator [Fe-S] [48]. Ainda, plântulas de soja tratadas com AS alteraram a composição de ácidos graxos em suas mitocôndrias. Como essas organelas mostraram modificações nas suas membranas sob alto estresse oxidativo causado por AS, e ambos os processos envolvem proteínas Fe-S, a expressão de cisteína desulfurase pode ser alterada por estresse biótico.

Os resultados apresentados de RT-qPCR quantitativo mostraram uma relação entre o conteúdo de transcritos de *NFS1* e *ISD11* entre os órgãos analisados. Ambos os genes tiveram maior expressão em raízes do que em folhas, apresentando uma proporção transcricional similar (Figura 5). Ainda, para analisar se um aumento na expressão de *NFS1* desencadeia um aumento nos níveis de transcritos de *ISD11*, nós estudamos o perfil de expressão de *ISD11* sob o estresse por frio. Em raiz, o mRNA total de *ISD11* diminuiu durante o tratamento e recuperou os níveis iniciais no último tempo analisado, enquanto que o total de transcritos de *NFS1* não mudou. Em folhas, ambos os genes aumentaram o conteúdo total de mRNA acumulado (Figura 7). A similaridade no padrão de expressão encontrada entre esses genes pode ser explicada pelas funções de suas proteínas codificantes. *NFS1* é uma cisteína desulfurase envolvida na biossíntese de cofatores [Fe-S] na mitocôndria [7], enquanto que a *Isd11* foi recentemente identificada em leveduras como uma proteína responsável por formar um complexo estável com a *Nfs1* [135, 136]. Além

de interagir com a cisteína desulfurase, em humanos, a ISD11 mostrou um papel importante no controle da homeostase do ferro na mitocôndria e no citosol [137], função descrita como mediada pela NFS1 [138].

Foi demonstrado em soja que genes que apresentam alta similaridade dispõem de uma rede regulatória envolvida na expressão diferencial, incluindo a presença de *cis*-elementos nas regiões promotoras [114]. Por isso, analisou-se sequências de DNA na busca por sítios de ligação a fatores de transcrição localizados em 1.500 pb das regiões promotoras, com a finalidade de explicar os padrões de expressão. As regiões promotoras dos genes *NFS1*, *NFS2* e *ISD11* apresentam relação entre as cópias, como foi mostrado pela análise filogenética (Figura 9). Quando os *cis*-elementos são comparados, todos os genes compartilham elevado número de sítios de ligação comum (Tabela 5), sugerindo que os genes que codificam as cisteína desulfurases podem ter uma rede de controle compartilhada. Apesar dessa similaridade, foi mostrado que diferentes fatores ambientais podem levar a expressão desses genes (Figura 5, 6 e 8). Como uma complexa rede molecular está envolvida no controle da expressão gênica, e fatores de transcrição são componentes importantes que podem levar à ativação ou repressão da transcrição [110], as diferenças observadas podem ser devidas à disponibilidade desses fatores num órgão ou tecido específico. A análise de todos os sítios de ligação a fatores de transcrição nas regiões promotoras dos genes de cisteína desulfurase trouxe informações em relação aos dados de expressão, e *cis*-elementos relacionados aos experimentos de RT-PCR quantitativo estão listados na Tabela 6. O elemento *Py-rich* foi encontrado nos genes *NFS1_Chr11* e *NFS2_Chr15*, que mostraram alto nível de transcritos em folhas e raízes, respectivamente. O elemento *ARE* foi encontrado no gene *NFS1_Chr01*, o qual apresenta maior expressão em raízes do que em folhas, enquanto que o elemento *as-2-box* foi detectado nos genes com maior expressão em folhas. *TCA-element*, relacionado com a resposta ao AS, foi encontrado somente nos genes *NFS1* que mudaram seu padrão de expressão, quando submetidos a esse tratamento. Além disso, todos os genes apresentaram *cis*-elementos relacionados à defesa e ao estresse (*TC-rich*) e à seca (*MBS*), e alguns genes são induzidos por seca e por frio, o que indica um compartilhamento de sinalização entre esses dois estresses [139].

Tabela 6 Relação entre *cis*-elementos e qPCR. Sítios putativos de ligação a fatores de transcrição nos promotores dos genes *NFS1* e *NFS2* que mostraram correlação com dados resultantes de qPCR.

<i>Cis</i> -elemento e organismo ^a	Função	Gene	Correlação
5UTR Py-rich stretch <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Cis</i> -elemento que confere alto nível de expressão	<i>NFS1_Chr11</i> , <i>NFS2_Chr15</i>	<i>NFS2_Chr15</i> é altamente expresso em raízes e folhas. <i>NFS1_Chr11</i> é altamente expresso em folhas.
ARE <i>Zea mays</i>	<i>Cis</i> -elemento essencial na indução anaeróbica	<i>NFS1_Chr01</i>	É altamente expresso em raízes, onde a disponibilidade de O ₂ é baixa.
MBS <i>Arabidopsis thaliana</i>	Sítio de ligação MYB envolvido na indução por seca	Todos	Os efeitos do estresse por seca estão relacionados aos efeitos do frio. Todos os genes respondem ao frio.
TC-rich repeats <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Cis</i> -elemento envolvido em defesa e resposta ao estresse	Todos	Todos os genes respondem ao frio.
TCA-element <i>Brassica oleracea</i>	<i>Cis</i> -elementos envolvido na resposta ao ácido salicílico.	Genes <i>NFS1</i>	Análise da soma de transcritos mostrou que os níveis de <i>NFS1</i> variam no tratamento com AS.
as-2-box <i>Nicotiana tabacum</i>	Envolvido na expressão específica da parte aérea e em resposta à luz.	<i>NFS1_Chr11</i> , <i>NFS2_Chr15</i>	Ambos os genes são altamente expressos em folhas.

^a Organismo no qual o *cis*-elemento foi descrito, de acordo com o PlantCARE.

2.4 Conclusões

No presente estudo, uma análise dos genes codificadores de cisteína desulfurase de soja envolvidos na biossíntese de cofatores [Fe-S] foi desenvolvida. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que os genes *NFS1* e *NFS2* estejam envolvidos na resposta ao estresse, e que sua expressão diferencial seja devida a presença de *cis*-elementos diferentes (Figura

11). Ainda, *ISD11* mostrou um padrão de expressão similar aos genes *NFS1*, o que suporta a correlação positiva entre suas atividades. Nossos resultados representam as primeiras evidências sobre expressão diferencial de genes duplicados envolvidos na rota dos cofatores [Fe-S], porém mais pesquisa é necessária para determinar se esse padrão se mantém em outros genes envolvidos na biogênese de cofatores [Fe-S].

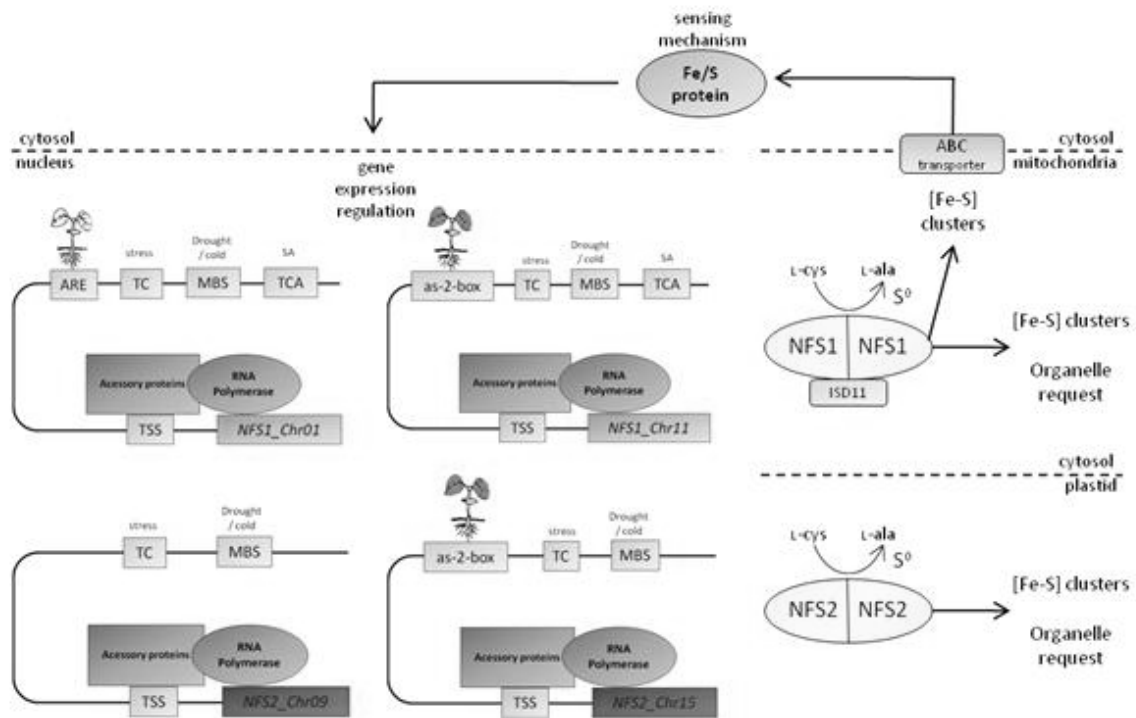


Figura 11 Visão geral do controle da expressão dos genes *NFS1* e *NFS2*. Os *cis*-elementos encontrados nas regiões promotoras dos genes de cisteína desulfurase estão representados pelas caixas verdes e vermelhas. De acordo com os resultados da expressão gênica por qPCR e das análises *in silico*, os genes possuem desencadeadores de expressão diferentes, indicados acima dos *cis*-elementos (caixas azuis). *NFS1_Ch01* é modulado por estresses, como frio e AS, e induzido em raízes. *NFS1_Ch11* é modulado pelos mesmos estímulos, mas induzido em folhas. *NFS2_Ch09* é modulado pelo frio, enquanto que *NFS2_Ch15* é modulado pelo mesmo estresse e induzido em folhas. Em plastídeos (embaixo), a cisteína desulfurase catalisa a liberação de enxofre da cisteína para biogênese dos cofatores [Fe-S] para suprir as necessidades da organela. Na mitocôndria (em cima), o mesmo processo ocorre para prover cofatores para a organela e citosol/núcleo, sendo estimulado por uma pequena proteína chamada ISD11 (caixa verde claro). Um sistema de exportação, que inclui um transportador ABC, é envolvido na maturação de proteínas Fe-S fora da mitocôndria. Algumas proteínas Fe-S no citosol e núcleo são envolvidas em percepção das condições celulares, controlando a expressão gênica.

CAPÍTULO III

Avaliação dos genes de *Oryza sativa* codificadores de cisteína desulfurases em resposta a estresses abióticos

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Material vegetal

Sementes de arroz (*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare e *O. sativa* ssp. *indica* cv. Taim) foram esterilizadas superficialmente utilizando-se, em sequência, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos e 5 lavagens com água destilada estéril. As sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido estéril, em B.O.D. a 30°C, por um período de 48 horas no escuro. Após a germinação, as placas foram submetidas ao fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas escuro a 25°C, sendo transferidas após 5 dias para meio hidropônico contendo solução modificada de Baier [140].

3.1.2 Tratamentos

3.1.2.1 Tratamento de frio

Quando as plantas atingiram 14 dias, elas foram divididas em dois grupos. Um grupo foi submetido ao tratamento de frio e outro grupo controle permaneceu pelo mesmo período nas condições normais. Esse tratamento consistiu na exposição do grupo tratado à temperatura de 4°C pelo período de 24 horas e foi realizado nas subespécies *japonica* e *indica*, compondo, então, quatro grupos experimentais. Foram analisadas 4 amostras por grupo, sendo que cada amostra foi composta por três plantas que foram coletadas para posterior extração de RNA total. Após a coleta, as raízes foram separadas das partes aéreas, e ambas foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido.

3.1.2.2 Tratamento de alumínio

Plantas com 14 dias da subespécie *japonica* foram divididas em três grupos, um grupo controle e dois grupos tratados. O grupo controle não teve nada adicionado ao meio

hidropônico, enquanto que os grupos submetidos ao tratamento tiveram adição de cloreto de alumínio (AlCl_3) nas concentrações de 150 μM e 450 μM . Após 8 horas do início do tratamento, foi feita a coleta de 4 amostras para cada grupo experimental. O experimento foi realizado em triplicata biológica e as raízes e partes aéreas foram separadas e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total.

3.1.3 Extração de RNA total

Até o momento da extração, as amostras coletadas ficaram armazenadas em freezer -80°C . Os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido para completa pulverização. Em torno de 100 mg do tecido pulverizado foi incubado e misturado com 1 mL do reagente Trizol® em microtubos por 5 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 250 μL de clorofórmio à amostra e incubado por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após, centrifugação refrigerada (4°C) a 14.000 rpm por 15 minutos; 500 μL de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e misturados numa relação de 1/1 (v/v) com isopropanol e com 150 μL de cloreto de sódio (NaCl) 5 M e centrifugados a 4°C , a 10.000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μL etanol 75% e centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos. O precipitado formado foi secado a vácuo por aproximadamente 8 minutos e ressuspensionado em 50 μL de água MilliQ autoclavada. Para facilitar a ressuspensão, as amostras de RNA extraídas foram incubadas a 65°C por 10 minutos. A qualidade e quantificação das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE 1X (Tris 4 mM, ácido bórico 2 mM e EDTA 0,1 mM) e por espectrofotometria (leituras a 260 nm e 280 nm).

3.1.4 Síntese de cDNA a partir de RNA total

A reação de síntese da primeira fita de cDNA, a partir de RNA total, foi realizada utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase da Invitrogen (200 U/ μL), o respectivo tampão de reação (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,01 % v/v NP-40; 50% glicerol v/v), 5 mM de desoxirribonucleosídeos

trifosfatados (dNTPs), 10 pmol de oligo-dT. A síntese foi realizada com uma temperatura inicial de 65°C por 5 minutos e então as amostras permaneceram no gelo por aproximadamente 5 minutos, a 37°C por 2 horas e inativação a 70°C por 15 minutos. Uma reação de síntese de cDNA foi realizada para cada amostra.

3.1.5 RT-qPCR em tempo real

As amostras de cDNA foram diluídas 100 vezes em água MilliQ autoclavada para posterior análise. Em todos os experimentos de qPCR foram utilizadas as mesmas alíquotas, triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais. As reações foram efetuadas no equipamento ABI Prism 7500 Detection System (Applied Biosystems) seguindo-se estas condições: 5 minutos a 94°C; 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 15 segundos; e 60°C por 35 segundos. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 0,2 µM dos oligonucleotídeos gene-específicos, 0,1 mM de dNTPs, 1,5 µM de MgCl₂, 0,25 U da enzima DNA polimerase Platinum Taq (5 U/µL, Invitrogen), tampão da enzima 10X, SYBR Green 10X e 10 µL dos cDNAs 1:100. O ponto de corte C_T (*threshold cycles*) e a especificidade das amplificações foram determinados utilizando-se o programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems). A normalização dos dados de expressão dos genes de interesse foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen [122]. A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada a partir das eficiências das reações e do desvio do C_T das amostras-alvo *versus* as amostras-controle. Para a normalização dos dados foi utilizado como gene constitutivo o gene do fator de alongação alfa 1 (*OseFlα*) e o gene da formaldeído desidrogenase (*OsFDH*). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o teste T, considerando variância desigual das amostras e distribuição bi-caudal, e ao nível de 5% de significância.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão das cisteína desulfurases de arroz por qPCR.

Nomenclatura do gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5' para 3')
OsNFS1 F	CGCCTCTTGTTGTTGGATTT
OsNFS1 R	TTACCAGGGTACCGATGCTC
OsNFS2 F	GTGTGGCCCTACAGGCG
OsNFS2 R	CGCAGGTGTTCCAGCTTCA

3.1.6 Análise de bioinformática

A busca das sequências das cisteína desulfurases de *O. sativa* foi feita no banco de dados do *Rice Genome Annotation* e do *Phytozome*. Para confirmar a identidade das sequências de aminoácidos encontradas, foi realizado um BLASTp disponível na página do NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) e uma busca por domínio no Pfam [116]. Sequências de proteínas de outras espécies foram retiradas do banco de dados do NCBI e do *Phytozome*. As espécies e seus códigos de acesso são os seguintes: *Glycine max* (Glyma01g40510/ Glyma11g04800/ Glyma09g02450/ Glyma15g13350), *Ricinus communis* (XP_002531989/ XP_002523229), *Arabidopsis thaliana* (At5g65720/ At1g08490), *Zea mays* (ACF83040/ NP_001130656), *O. sativa* (NP_001062914/ EEC69110), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001695008/ XP_001701051/ Au9.Cre12.g525650), *Brachypodium distachyon* (Bradi4g28300), *Arabidopsis lyrata* (XP_002864976/ XP_002892460), *Sorghum bicolor* (Sb02g022360/ Sb05g001270), *Carica papaya* (supercontig_129.49/ supercontig_34.204), *Vitis vinifera* (XP_002274517/ XP_002267920), *Medicago truncatula* (Medtr5g014960/ Medtr3g105250), *Populus trichocarpa* (XP_002310363/ XP_002314018), *Escherichia coli* (YP_001458463/ NP_289087), *Azotobacter vinelandii* (YP_002797401), *Synechococcus elongates* (NP_665776) e *Synechocystis* sp. (NP_442475). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa ClustalX2 [117] usando a configuração padrão, seguido da visualização no programa GeneDoc [118]. A análise filogenética foi feita com o *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versão 4.0 [119], utilizando o método de *Neighbor-Joining*. As diferenças entre as sequências foram analisadas pelo método de

pairwise deletion. A distância molecular das sequências alinhadas foi calculada com o programa MEGA 4.0, de acordo com o parâmetro de *p-distance* e o teste de *bootstrap* foi realizado com 1000 replicatas.

3.2 Resultados

3.2.1 Análise das sequências

Análise comparativa de proteínas mostrou que dois *loci* do genoma de arroz codificam cisteína desulfurases, Os09g16910 e Os12g18900. Essas proteínas pertencem a dois grupos: o primeiro é composto por proteínas *IscS-like*, cisteína desulfurases localizadas na mitocôndria, e codificada pelo gene do cromossomo 09 (*NFS1*); o segundo grupo é composto por proteínas *SufS-like*, cisteína desulfurases localizadas nos plastídeos, e codificada pelo gene do cromossomo 12 (*NFS2*). As proteínas codificadas pelos genes *NFS1* e *NFS2* possuem alta identidade com as proteínas de *Arabidopsis thaliana*, 70 e 65%, respectivamente, mostrando o alto grau de conservação entre espécies. As análises realizadas no Pfam mostraram que ambas as sequências possuem um domínio *aminotransferase Class-V* característico dessas enzimas, e alinhamentos mostraram a conservação dos aminoácidos do sítio ativo e do local de ligação ao cofator (Figura 1).

3.2.2 Análise filogenética

A análise comparativa de aminoácidos entre as proteínas *IscS-like* e entre as proteínas *SufS-like* de diferentes espécies de plantas e bactérias mostrou que a identidade protéica variou de 54 a 98% e de 37 a 97%, respectivamente. Com base na análise filogenética foi possível revelar que as cisteína desulfurases formaram três grupos distintos, agrupando-se de acordo com o sistema de formação dos cofatores [Fe-S] ao qual elas são homólogas. Sendo assim, a árvore apresenta uma subdivisão entre os sistemas ISC, SUF e NIF, tendo as sequências de plantas presentes nos dois primeiros. Dentro desses grupos há divisão entre plantas e bactérias, e dentro de plantas há subdivisão de

dicotiledôneas e monocotiledôneas, onde se encontram as sequências de *O. sativa* (Figura 2). As proteínas presentes na mitocôndria se localizam juntamente com a sequência de IscS de *Escherichia coli* e as presentes no plastídeo, com a sequência de SufS de *Escherichia coli*. Esses resultados estão de acordo com os estudos de endossimbiose, que estabelecem a relação entre o hospedeiro endossimbiótico e a bactéria ancestral [5].

```
A_thaliana_NFS1      : -----MASKVISATIRRTLT---KPHGTFRCRYLSTAAAATEVNYEDESIMMKGV : 48
Escherichia_coli_IscS : -----MK-- : 2
Criza_sativa_Os09g16910 : -----MALSRLLPPLLRRGSTPFLSPPARALSTAAVTADAPAAAAAEEEEAMTKGV : 53
A_thaliana_NFS2      : ---MEGVAMKLPSPFNALSIGHRSFSRVRCSLSS-VCSAAAASSATISTDS----ESVSLGHRVRKDFRILHQE : 67
Criza_sativa_Os12g18900 : MVSAAAAASSLRCFP--PSLGNRGPGAATARGGLVRLSSRRARSTAGVAAPSREAESAASLGDLTRVDFPILDQE : 73
Escherichia_coli_SUF : -----MTFVDR-----VRADFFVLSRE : 18
```

```
A_thaliana_NFS1      : RISGRFLYDMQATTIPDPRVFDAMNASQIHE--YGNPFSRDLYGWENAVENARNQVRLTFS--PREIVFV : 120
Escherichia_coli_IscS : ---LPIYLDYSATIPVDPRVAERMMQMTMDGTGFPASRSRFRGWQEEAVDIARNQIADLVGAD--PREIVFT : 72
Criza_sativa_Os09g16910 : RISGRFLYDMQATTIPDPRVLDAMLFYLSR--YGNPFSRDLYGWESDAVDEPARVAISLVGAD--PREIVFT : 125
A_thaliana_NFS2      : VNGSKLVYLDSAATSQKPAAYLDAIQNYEFY--NSVVRGDFYLSAKTDEFELARKKVRFINASDSREIVFT : 140
Criza_sativa_Os12g18900 : FDGSKLVYFDNGATSQKPSQWMTLDMYRFY--NSVVRGDFVLSAKTDAYESARTKVAIFVNAANSREIVFT : 146
Escherichia_coli_SUF : VNGLPLAYLDSAAQCKPGQVIDAEAEYRHH--YAAVVRGDFYLSAQTEKMNVRKQASLFINARSABELVFT : 91
```

```
A_thaliana_NFS1      : SCATBANNMVAKGVMHFYKDKKKEVITITQTEHKCVLDSCHLQCGEFTVTLPLKRTDGLVLEMLREARLRFDTG : 194
Escherichia_coli_IscS : SCATBNDNAIKGAANFYCKKKEIITQTEHKRAVLDTCRQLEREGEFTVTLDPQRNGIILKLEAAMRDDTI : 146
Criza_sativa_Os09g16910 : SCATBENNAIKGVMRFYDRRRRVVITITQTEHKCVLDSCHLQCGEFTVTLPLKRTDGLVLEMLREARLRFDTG : 199
A_thaliana_NFS2      : RNATBAINLVAYSWGLSNLPGDBVITVPEHHSVIFVWQIVSQKTGAVLKKVITNELVYPIINLRELISPKTR : 215
Criza_sativa_Os12g18900 : RNATBAINLVAYSWGMNSNLKQDEIVLITVPEHHSVIFVWQIVSQKTGATLKVVGITKEGVPIIEQLKGLSNKTK : 221
Escherichia_coli_SUF : RGTTEGINLVANSWGNNSVNRAGDITITISQHEHANTVFPWQMLCARVGAELRVIPINPDTLLETLPILFDEKR : 166
```

```

                                     ##
A_thaliana_NFS1      : LVSIMAVNNEIGVVQPEEIGMICEKNVPHFTDPAQELGKLEVDVKKWVALMSAPHKINGFRGVGALVRRR : 269
Escherichia_coli_IscS : LVSIMAVNNEIGVVQPEEIGEMCRARCIYHYVDIQCWGLHIDISQKVDLMSFSCHKINGFRGIGALVRRR : 221
Criza_sativa_Os09g16910 : LVSIMAVNNEIGVVQPEEIGRICKEKGVPHFTDPAQELGKLEIDVQNGIGLMSLSPHKINGFRGVGALVRRR : 274
A_thaliana_NFS2      : LVVVEHVSNVLSLSSIPDEEIVVWAHDVCAKVLMDACQSVPHVVDVQRNADFLVASSHKMGGFRGIGFLGRSD : 290
Criza_sativa_Os12g18900 : LVVVEHVSNVLSLSEDEIVVWNSNRICARVLMDACQSVPHVVDVQRGADFLVASSHKMGGFRGIGFLGRSD : 296
Escherichia_coli_SUF : LVAITHEVSNVLETENPEAEMITLHAHQCAKVLMDGCAVMHHDVVDVQALDCDFYVESCHKLNGFRGIGILVKEA : 241
```

```
A_thaliana_NFS1      : PRIRLEFLVNGGGQERCIRSGTGATQQIVFGGAACELAMKEMEYDEKWKICLQERLNGVREKLDGVVVNGSMD : 344
Escherichia_coli_IscS : PRVREACVHGGGHERGMRSGTLFVHQIVGMGEAYRIAKEEMATEMERLRGLRNRLWNGIKD-IEEVYLNGLDEH : 295
Criza_sativa_Os09g16910 : PRIRVEEQVSGGGQERCIRSGTVTPPLVVFGGAACEIAAKEMDYDHRRASVLCQRLLDTRGQVDDIVINGSMEH : 349
A_thaliana_NFS2      : LLHSMFFPLGGGE---MISDVFLDH-STYAEPPSRFEAGTPAIGEAIALCAAVDYLSGIGMPKIHVEVEIGKY : 360
Criza_sativa_Os12g18900 : LLSSVEFLGGGE---MIADVFDQK-STYAEPPSRFEAGTPAIGEAIGLTAIDYLSQIGMCKIHVEVENELATY : 366
Escherichia_coli_SUF : LLQEMFFWEGGGS---MIATVSLSEGTWTWPAKWRFEAGTPNTGGIIGLCAALEYSAIIGLNNTAEYEQNLNHY : 312
```

```

                                     *
A_thaliana_NFS1      : RYVGNLNSFAYVBCESLLMGKKEVAVSSGSACTSASLDPSSVLRALGVDEDMHTSIRFGIGRFTTEEBVDKAV : 419
Escherichia_coli_IscS : GAPNLLNSFNVYBGESLIMAKDLAVSSGSACTSASLDPSSVLRALGLENDBLHSSIRFSLGRFTTEEBVITYI : 370
Criza_sativa_Os09g16910 : RYVGNLNSFAYVBCESLLMGKKEVAVSSGSACTSASLDPSSVLRALGVDEDMHTSIRFGIGRFTTEEBVDRAI : 424
A_thaliana_NFS2      : LYKLSSEFDVRIKCPRPSEVHRGAPICS---FNVEGHPETDIAELDQCHGVAIRSGHCAQPLHRYLIGNVASA : 432
Criza_sativa_Os12g18900 : LYESLIANENVRINGPAPCQTVHRAPICS---FNVENVHETDIAEILDQCHGVAIRSGHCAQILHRTLGINASA : 438
Escherichia_coli_SUF : ALSQLESVPDLTLNGPQ----NRLGIA---FNLGKHHAYDVGSLFDN-YCIAVRVIGHHCAMPLMAYYNVAPMC : 378
```

```
A_thaliana_NFS1      : ELTVKQVEKLRMSFLYEMVKEGIDIKNIQWSQH : 453
Escherichia_coli_IscS : ELVRRSIGRLRDISPLWEMYKCGDINSIEWAHH : 404
Criza_sativa_Os09g16910 : ELTVHQVKKLRDMSFLYEMAKAGIDLKSIQWACH : 458
A_thaliana_NFS2      : RASLYFYNTKDDVDAFIVALADTISFFNSFK--- : 463
Criza_sativa_Os12g18900 : RASLHFYNTKEEVDVFDALSDTIDFLTSEH--- : 469
Escherichia_coli_SUF : RASLAMYNTHEEVDRLVIGLQRIHRLLG----- : 406
```

Figura 1 Alinhamento das cisteína desulfurases de *O. sativa*, *E. coli* e *A. thaliana*. # indica a histidina e a lisina responsáveis pela ligação ao cofator. * indica a cisteína do sítio ativo.

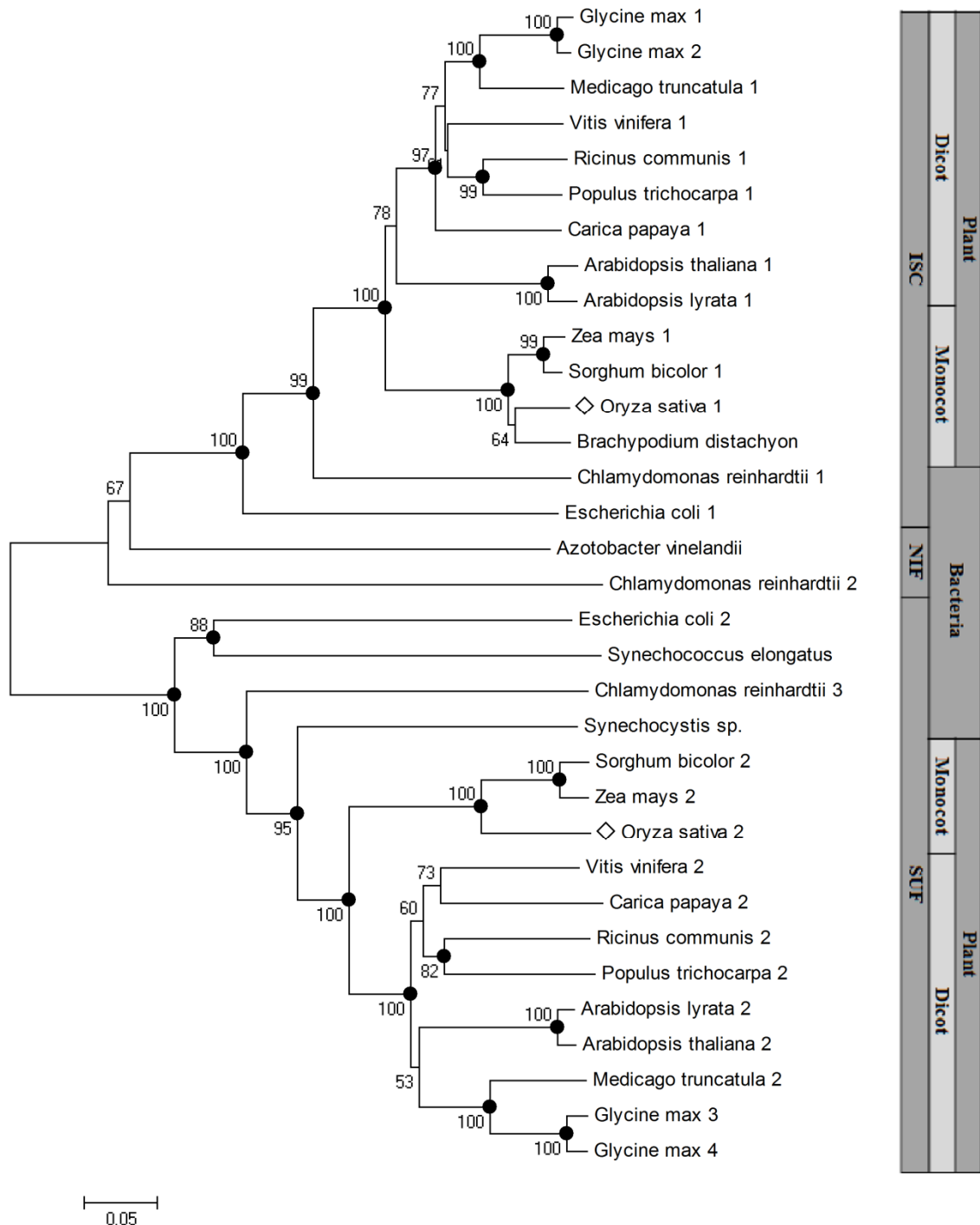
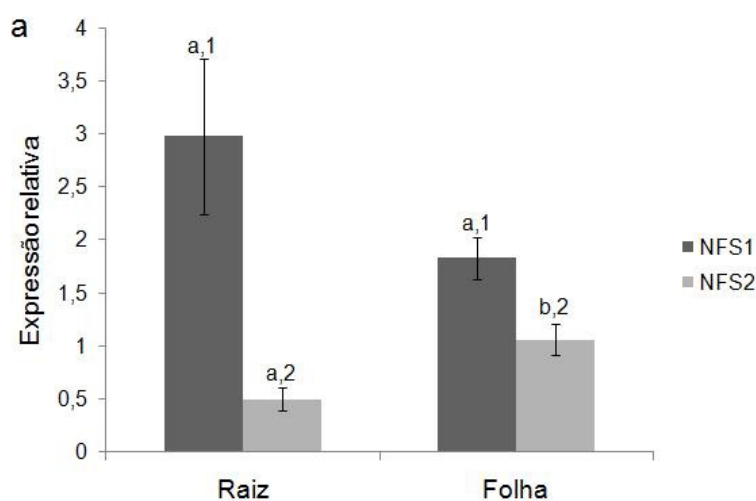


Figura 2 Árvore filogenética construída para avaliar a relação entre as cisteína desulfurases participantes da rota de formação dos cofatores [Fe-S]. A árvore foi gerada usando o alinhamento de proteínas de diferentes espécies feito no programa Mega 4.0. Os pontos pretos indicam valores de *bootstrap* superiores a 80. As proteínas de arroz encontram-se destacadas.

3.2.3 Análise dos transcritos das cisteína desulfurases

Para estudar o padrão de expressão das cisteína desulfurases em *O. sativa*, considerando que as proteínas Fe-S estão envolvidas na resposta a estímulos ambientais [5], foi feito qPCR. Oligonucleotídeos específicos para os genes *NFS1* e *NFS2* foram projetados, e o padrão de expressão em folhas e raízes de plântulas controle e tratadas, com frio e alumínio, foi analisado. Os dados de expressão foram normalizados contra a expressão de dois genes constitutivos, *OseF1 α* e *OsFDH*.

A análise de plantas controle permitiu definir o padrão de expressão dos genes estudados entre os tecidos nas duas subespécies. Para *O. sativa* ssp. *japonica*, tanto em raiz, quanto em folha, o gene *NFS1* apresentou maior nível de expressão. Esse gene possuiu igual distribuição de transcritos em raiz e folha, enquanto que o gene *NFS2* apresentou maior expressão em folha (Figura 3a). *O. sativa* ssp. *indica*, também, que teve maior expressão do gene *NFS1* nos dois tecidos, tendo maior nível em raiz do que em folha. O gene *NFS2* foi transcrito em nível menor e teve maior expressão em folha do que em raiz (Figura 3b).



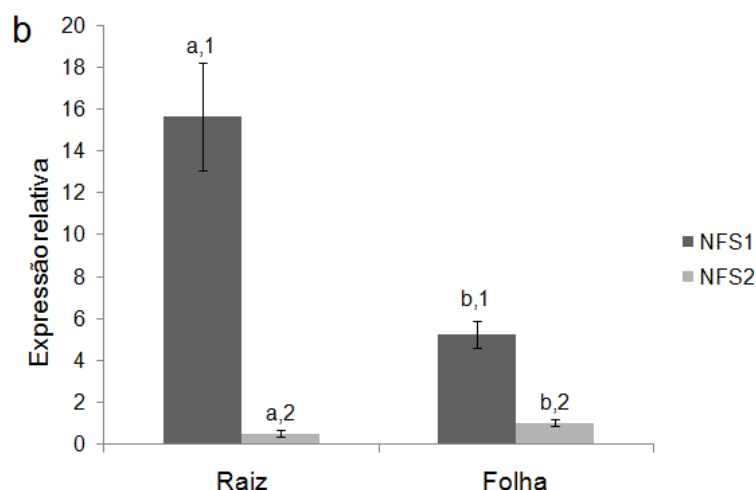
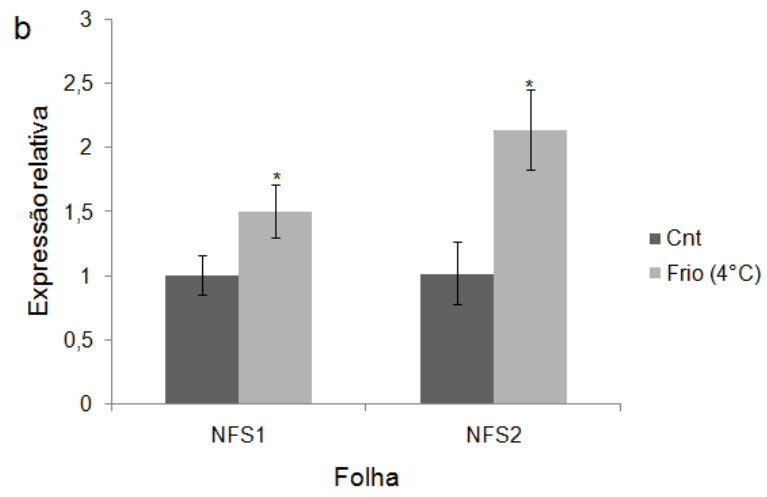
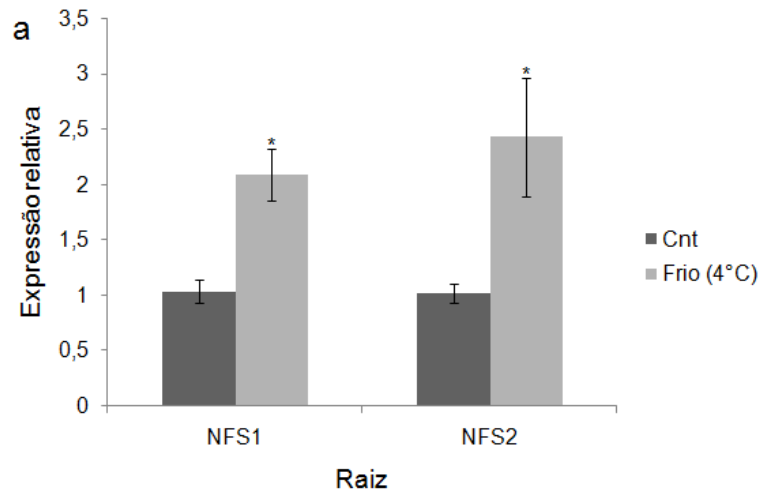


Figura 3 Análise por qPCR da expressão relativa dos genes *NFS1* e *NFS2* envolvidos na biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] em *O. sativa* ssp. *japonica* (a) e ssp. *indica* (b). Para normalização do padrão de expressão relativa dos genes foram utilizados os genes constitutivos *OseF1a* e *OsFDH*. As letras indicam diferença significativa do nível de expressão de um gene entre os tecidos e os números indicam a diferença dentro do próprio tecido entre os dois genes ($P \leq 0.05$).

Quando submetidas ao estresse por frio por 24 h a 4°C, plântulas de arroz ssp. *japonica* mostraram um aumento nos níveis de transcritos dos genes *NFS1* e *NFS2*, tanto em folha quanto em raiz (Figura 4a e 4b). O padrão de resposta desses genes na ssp. *indica* foi diferente; em raiz, não houve alteração na expressão de ambos os genes (Figura 4c). Em folha, o gene *NFS1* teve sua expressão reduzida significativamente com o tratamento, enquanto o gene *NFS2* aumentou o nível de transcritos (Figura 4d). No tratamento de alumínio com *O. sativa* ssp. *japonica*, a expressão dos genes de cisteína desulfurases não mostrou alteração na folha (Figura 5b), mas ambos os genes, em ambas as concentrações testadas, reduziram a expressão em raiz (Figura 5a).



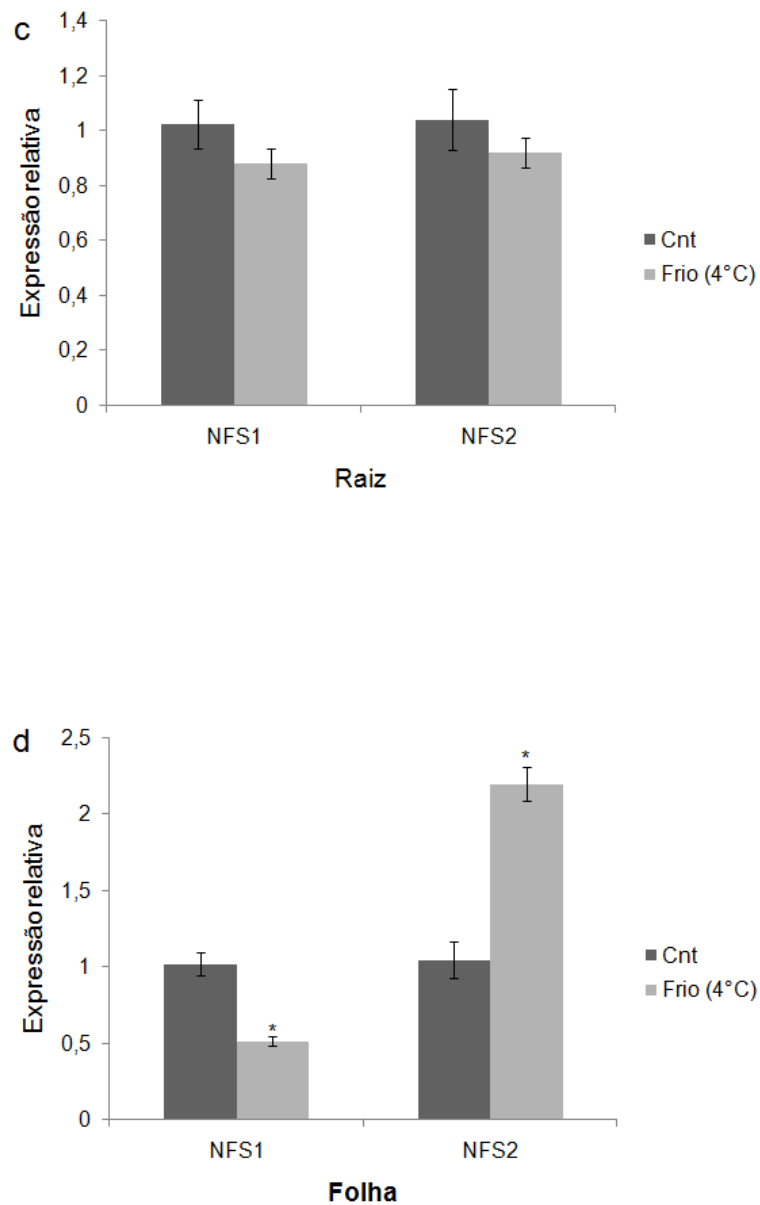


Figura 4 Análise por qPCR da expressão relativa dos genes *NFS1* e *NFS2* envolvidos na biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] em *O. sativa* ssp. *japonica* (a, b) e ssp. *indica* (c, d) no tratamento de frio. Para normalização do padrão de expressão relativa dos genes foram utilizados os genes constitutivos *OseF1a* e *OsFDH*. * indica diferença significativa do nível de expressão de um gene entre as plântulas controle e tratadas ($P \leq 0.05$).

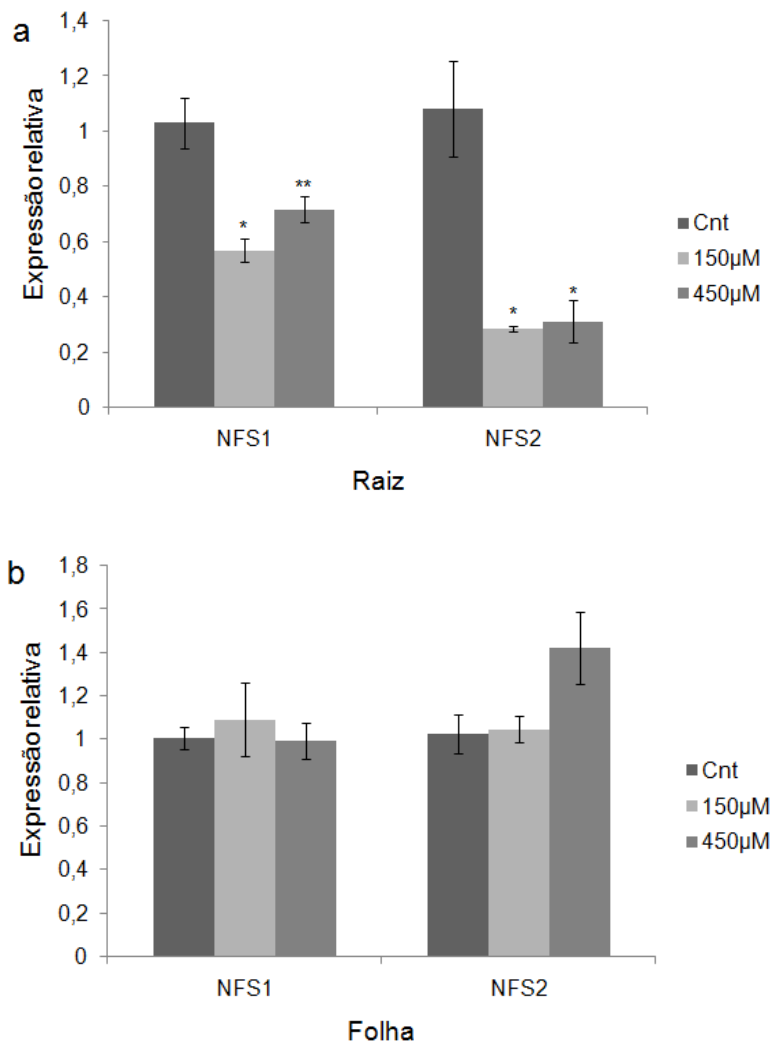


Figura 5 Análise por qPCR da expressão relativa dos genes *NFS1* e *NFS2* envolvidos na biossíntese dos agrupamentos [Fe-S] em *O. sativa* ssp. *japonica* (a, b) no tratamento com alumínio. Para normalização do padrão de expressão relativa dos genes foram utilizados os genes constitutivos *OseFla* e *OsFDH*. * ou ** indicam diferença significativa do nível de expressão de um gene entre as plântulas controle e tratadas ($P \leq 0.05$).

3.3 Discussão

O arroz, além de ser uma cultura mundialmente distribuída, é considerado um modelo de estudo de monocotiledôneas [79], sendo importante o estudo dos genes envolvidos na biossíntese dos cofatores [Fe-S] nessa espécie. A cisteína desulfurase, enzima responsável pela captura do enxofre através da conversão de L-cisteína em L-alanina [30, 31], é um componente essencial nessa rota, estando presente, juntamente com proteínas de ancoragem, nas três maquinarias descritas [3]. A análise filogenética de sequências protéicas provenientes de diversas espécies mostrou que há formação de três grupos distintos (Figura 2). O primeiro grupo reúne enzimas homólogas ao sistema ISC, *IscS-like* de bactérias e plantas. O segundo, reúne enzimas bacterianas NifS, do sistema NIF. Por final estão agrupadas as enzimas *SufS-like* de bactérias, cianobactérias e plantas. No primeiro e no último grupo as proteínas de plantas estão divididas em dicotiledôneas e monocotiledôneas, onde se encontram as proteínas de arroz. Essa organização corrobora com a teoria da endossimbiose, que descreve que ao longo da evolução a maquinaria bacteriana ISC foi transferida para a mitocôndria [6, 48], enquanto que a maquinaria SUF, presente em cianobactérias, foi transferida para o plastídeo [7, 141].

O enxofre é um macronutriente essencial e, durante seu processo de assimilação, ele é transformado em cisteína. Esse aminoácido é o componente central na formação de metabólitos que contêm enxofre reduzido [125, 126], incluindo os componentes de defesa que contêm enxofre (SDCs). A síntese dos SDCs é induzida por diferentes sinais, e esses compostos estão envolvidos na resposta a estresses bióticos e/ou abióticos [127]. A análise dos dados de qPCR sugere o envolvimento dos genes *NFS1* e *NFS2* de arroz, codificadores de proteínas descritas como envolvidas na assimilação de enxofre [8], na resposta ao estresse por frio e alumínio.

Quando plântulas de arroz da *ssp. japonica* têm seu perfil de expressão analisado, é possível descrever um aumento na expressão de *NFS1* e *NFS2* em ambos os tecidos estudados. Enquanto a resposta da *ssp. japonica* é de indução, a *ssp. indica* não apresenta o mesmo padrão; há aumento de expressão apenas de *NFS2* e somente em folha (Figura 4).

O aumento da expressão dos genes codificadores das cisteína desulfurases pode estar ligado ao aumento dos SDCs. Como esses compostos fazem parte da resposta ao estresse, o que inclui enzimas antioxidantes [127], plântulas que respondem de maneira mais eficiente a esse fator deveriam aumentar seus SDCs. Dentro dessa perspectiva, era de se esperar que plântulas da *ssp. japonica* fossem mais tolerantes ao frio que as da *ssp. indica*. Um estudo que acompanhou a resposta dessas duas subespécies ao frio mostrou que cultivares da subespécie *japonica* se mostram mais adaptadas ao frio do que cultivares da subespécie *indica*. Ainda, viu-se que a resposta primária a esse estresse seria desencadeada por sinais oxidativos [71].

Estima-se que 30 % do solo mundial seja ácido e que isso corresponda a 50 % do solo com potencial para plantio. Em solos ácidos, com pH igual ou inferior a 5.5, a toxicidade por alumínio é um dos maiores limitantes de produtividade [76, 77]. Quando o pH encontra-se baixo, as formas tóxicas de alumínio são encontradas solubilizadas no solo e acabam inibindo o crescimento e as funções das raízes, diminuindo o crescimento da cultura e podendo acarretar na perda da lavoura [79]. Nosso tratamento com alumínio mostrou que os genes *NFS1* e *NFS2* apresentaram redução de expressão em raiz, enquanto que não houve alteração em folha (Figura 5). Estudos anteriores mostraram que, durante tratamento que simula a toxicidade exercida pelo alumínio presente no solo, o maior acúmulo desse elemento na planta encontra-se na raiz, sendo pouco transportado para a parte aérea [82]. Esse pode ser o motivo pelo qual foi encontrada uma resposta tecido específica.

3.4 Conclusões

Nesse estudo, é mostrada a análise das cisteína desulfurases de arroz, que estão envolvidas na biossíntese dos cofatores [Fe-S]. Os resultados sugeriram o envolvimento dos genes *NFS1* e *NFS2* na resposta ao estresse por frio e alumínio. Ainda no frio, o aumento da expressão dos genes pode estar relacionado ao maior grau de tolerância a esse estresse.

Referências Bibliográficas – Capítulos I, II e III

1. Beinert H, Holm RH, Munck E: **Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures.** *Science* 1997, **277**(5326):653-659.
2. Beinert H: **Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2000, **5**(1):2-15.
3. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK: **Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters.** *Annual Review of Biochemistry* 2005, **74**:247-281.
4. Meyer J: **Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2008, **13**(2):157-170.
5. Lill R: **Function and biogenesis of iron-sulphur proteins.** *Nature* 2009, **460**(7257):831-838.
6. Lill R, Muhlenhoff U: **Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: Components and mechanisms.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2006, **22**:457-486.
7. Balk J, Lobreaux S: **Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants.** *Trends in Plant Science* 2005, **10**(7):324-331.
8. Frazzon APG, Ramirez MV, Warek U, Balk J, Frazzon J, Dean DR, Winkel BSJ: **Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly.** *Plant Molecular Biology* 2007, **64**(3):225-240.
9. Volbeda A, Fontecilla-Camps JC: **Structural bases for the catalytic mechanism of Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases.** *Dalton Transactions* 2005(21):3443-3450.
10. Rees DC: **Great metalloclusters in enzymology.** *Annual Review of Biochemistry* 2002, **71**:221-246.
11. Sazanov LA, Hinchliffe P: **Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*.** *Science* 2006, **311**(5766):1430-1436.
12. Adman ET, Sieker LC, Jensen LH: **Structure of a Bacterial Ferredoxin.** *Journal of Biological Chemistry* 1973, **248**(11):3987-3996.

13. Liu LJ, Nogi T, Kobayashi M, Nozawa T, Miki K: **Ultrahigh-resolution structure of high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum***. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2002, **58**:1085-1091.
14. Tagawa K, Arnon DI: **Ferredoxins as Electron Carriers in Photosynthesis and in Biological Production and Consumption of Hydrogen Gas**. *Nature* 1962, **195**(4841):537-&.
15. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC: **Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism**. *Cell* 2004, **117**(3):285-297.
16. Beinert H, Kiley P: **Fe-S proteins in sensing and regulatory functions**. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999, **3**:152-157.
17. Khoroshilova N, Popescu C, Münck E, Beinert H, Kiley P: **Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity**. *PNAS* 1997, **94**:6087-6092.
18. Lazazzera BA, Beinert H, Khoroshilova N, Kennedy MC, Kiley P: **DNA Binding and Dimerization of the Fe-S-containing FNR Protein from *Escherichia coli* Are Regulated by Oxygen**. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:2762-2768.
19. Hidalgo E, Ding H, Demple B: **Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator**. *Trends in Biochemical Sciences* 1997, **22**(6):207-210.
20. Malkin R, Rabinowicz J: **Reconstitution of Clostridial Ferredoxin**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1966, **23**(6):822-&.
21. Mihara H, Esaki N: **Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, **60**(1-2):12-23.
22. Godman J, Balk J: **Genome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the existence of multiple, compartmentalized iron-sulfur protein assembly machineries of different evolutionary origins**. *Genetics* 2008, **179**(1):59-68.
23. Balk J, Lill R: **The cell's cookbook for iron-sulfur clusters: Recipes for fool's gold?** *Chembiochem* 2004, **5**(8):1044-1049.
24. Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR: **Biochemical and Genetic-Analysis of the Nifusvwzm Cluster from *Azotobacter-Vinelandii***. *Molecular & General Genetics* 1989, **219**(1-2):49-57.

25. Frazzon J, Schrank IS: **Sequencing and complementation analysis of the nifUSV genes from *Azospirillum brasilense***. *Fems Microbiology Letters* 1998, **159**(2):151-158.
26. Frazzon J, Fick JR, Dean DR: **Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process**. *Biochemical Society Transactions* 2002, **30**:680-685.
27. Frazzon J, Dean DR: **Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry**. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003, **7**(2):166-173.
28. Jacobson MR, Brigle KE, Bennett LT, Setterquist RA, Wilson MS, Cash VL, Beynon J, Newton WE, Dean DR: **Physical and Genetic-Map of the Major Nif Gene-Cluster from *Azotobacter-Vinelandii***. *Journal of Bacteriology* 1989, **171**(2):1017-1027.
29. Dixon R, Kahn D: **Genetic regulation o biological nitrogen fixation**. *Nature Reviews Microbiology* 2004, **2**:621-631.
30. Zheng LM, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR: **Cysteine Desulfurase Activity Indicates a Role for Nifs in Metallocluster Biosynthesis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(7):2754-2758.
31. Zheng LM, White RH, Cash VL, Dean DR: **Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the Nifs Gene-Product**. *Biochemistry* 1994, **33**(15):4714-4720.
32. Agar JN, Yuvaniyama P, JAck RF, Cash VL, Smith AD, Dean DR, Johnson MK: **Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein**. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2000, **5**(2):167-177.
33. Dos Santos PC, Smith AD, Frazzon J, Cash VL, Johnson MK, Dean DR: **Iron-sulfur cluster assembly - NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein**. *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(19):19705-19711.
34. Zheng LM, Cash VL, Flint DH, Dean DR: **Assembly of iron-sulfur clusters - Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii***. *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(21):13264-13272.

35. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, ColladoVides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF *et al*: **The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.** *Science* 1997, **277**(5331):1453-&.
36. Hwang DM, Dempsey A, Tan KT, Liew CC: **A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution.** *Journal of Molecular Evolution* 1996, **43**(5):536-540.
37. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R: **The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins.** *Embo Journal* 1999, **18**(14):3981-3989.
38. Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E: **Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of Saccharomyces cerevisiae.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(18):10206-10211.
39. Cupp-Vickery JR, Urbina H, Vickery LE: **Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from Escherichia coli.** *Journal of Molecular Biology* 2003, **330**(5):1049-1059.
40. Lill R, Mühlhoff U: **Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes.** *Trends Biochem Sci* 2005, **30**:133-141.
41. Lill R, Kispal G: **Maturation of cellular Fe/S proteins: the essential function of mitochondria.** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**:352-356.
42. Takahashi Y, Tokumoto U: **A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(32):28380-28383.
43. Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW: **Fe-s cluster assembly pathways in bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2008, **72**(1):110-+.
44. Fernández AP, Strand A: **Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses.** *Current Opinion in Plant Biology* 2008, **11**:509-513.
45. Nishio K, Nakai M: **Transfer of iron-sulfur cluster from NifU to apoferredoxin.** *FEBS Lett* 2000, **433**:22615-22618.
46. Yabe T, Morimoto K, Kikuchi S, Nishio K, Terashima I, Nakai M: **The Arabidopsis Chloroplastic NifU-Like Protein CnfU, Which Can Act as an**

- Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein, Is Required for Biogenesis of Ferredoxin and Photosystem I.** *The Plant Cell* 2004, **16**:993-1007.
47. Kessler D, Papenbrock J: **Iron-sulfur cluster biosynthesis in photosynthetic organisms.** *Photosynthesis Research* 2005, **86**(3):391-407.
48. Lill R, Muhlenhoff U: **Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases.** *Annual Review of Biochemistry* 2008, **77**:669-700.
49. Pilon M, Abdel-Ghany S, Van Hoewyk D, Ye H, Pilon-Smits E: **Biogenesis of Iron-Sulfur Cluster Proteins in Plastids.** *Genetic Engineering* 2006, **27**:101-117.
50. Bowyer JR, Edwards CA, Trumpower BL: **Involvement of the Iron-Sulfur Protein of the Mitochondrial Cytochrome-B-C1 Complex in the Oxidant-Induced Reduction of Cytochrome-B.** *Febs Letters* 1981, **126**(1):93-97.
51. Muhlenhoff U, Lill R: **Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 2000, **1459**(2-3):370-382.
52. Rudolf J, Makrantonis V, Ingledew WJ, Stark MJR, White MF: **The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains.** *Molecular Cell* 2006, **23**(6):801-808.
53. Amann K, Lezhneva L, Wanner G, Herrmann RG, Meurer J: **Accumulation of Photosystem one 1, a member of a novel gene family, is required for accumulation of [4Fe-4S] cluster-containing chloroplast complexes and antenna proteins.** *Plant Cell* 2004, **16**(11):3084-3097.
54. Schwenkert S, Netz DJA, Frazzon J, Pierik AJ, Bill E, Gross J, Lill R, Meurer J: **Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for [4Fe-4S] cluster assembly.** *Biochemical Journal* 2010, **425**:207-214.
55. Ye H, Pilon M, Pilon-Smits EAH: **CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts.** *New Phytologist* 2006, **171**(2):285-292.
56. Caliebe A, Grimm R, Kaiser G, Lubeck J, Soll J, Heins L: **The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein.** *Embo Journal* 1997, **16**(24):7342-7350.

57. Madueno F, Napier JA, Cejudo FJ, Gray JC: **Import and Processing of the Precursor of the Rieske Fes Protein of Tobacco Chloroplasts.** *Plant Molecular Biology* 1992, **20**(2):289-299.
58. Malkin R: **Redox Properties of the Dbmib-Rieske Iron-Sulfur Complex in Spinach Chloroplast Membranes.** *Febs Letters* 1981, **131**(1):169-172.
59. Steppuhn J, Rother C, Hermans J, Jansen T, Salnikow J, Hauska G, Herrmann RG: **The Complete Amino-Acid-Sequence of the Rieske Fes-Precursor Protein from Spinach-Chloroplasts Deduced from Cdna Analysis.** *Molecular & General Genetics* 1987, **210**(1):171-177.
60. Imsande J: **Iron-sulfur clusters: Formation, perturbation, and physiological functions.** *Plant Physiology and Biochemistry* 1999, **37**(2):87-97.
61. Inoue K, Sakurai H, Hiyama T: **Photoinactivation Sites of Photosystem-I in Isolated-Chloroplasts.** *Plant and Cell Physiology* 1986, **27**(6):961-968.
62. Pilon-Smits E, Van Hoewyk D, Cohu C, Pilon M: **The cysteine desulfurase CpNifS is essential for iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts.** *Photosynthesis Research* 2007, **91**(2-3):261-261.
63. Taiz L, Zeiger E: **Fisiologia Vegetal**, 3 edn. Porto Alegre: Artmed; 2004.
64. Grace J: **Plants and Microclimate - Jones,Hg.** *Journal of Ecology* 1984, **72**(3):1091-1092.
65. Nelson CJ: **Genetic Associations between Photosynthetic Characteristics and Yield - Review of the Evidence.** *Plant Physiology and Biochemistry* 1988, **26**(4):543-554.
66. Pessarakli M: **Handbook of plant and crop physiology**, 2nd ed. edn. Basel: Marcel Dekker; 2002.
67. Levitt J: **Responses of Plants to Environmental Stresses.** New York: Academic; 1972.
68. Boyer JS: **Plant productivity and environmental Science** 1982, **218**:443-448.
69. Tomashow M: **So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!** *Plant Physiol* 2001, **125**:89-93.
70. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways.** *Current Opinion in Plant Biology* 2000, **3**:217-223.

71. Yun KY, Park MR, Mohanty B, Herath V, Xu FY, Mauleon R, Wijaya E, Bajic VB, Bruskiwich R, de los Reyes BG: **Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress.** *Bmc Plant Biology* 2010, **10**:-
72. Hemming DJB, Monaco TA, Hansen LD, Smith BN: **Respiration as measured by scanning calorimetry reflects the temperature dependence of different soybean cultivars.** *Thermochimica Acta* 2000, **349**(1-2):131-134.
73. Toda K, Takahashi R, Iwashina T, Hajika M: **Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene.** *J Plant Res* 2010.
74. Sonoike K, Kamo M, Hihara Y, Hiyama T, Enami I: **The mechanism of degradation of PsaB protein, a reaction center subunit of photosystem I, upon photoinhibition.** *Plant Physiology* 1997, **114**(3):159-159.
75. Tjus SE, Moller BL, Scheller HV: **Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures.** *Plant Physiology* 1998, **116**(2):755-764.
76. Vonuexkull HR, Mutert E: **Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils.** *Plant and Soil* 1995, **171**(1):1-15.
77. Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA: **How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency.** *Annual Review of Plant Biology* 2004, **55**:459-493.
78. Wang JW, Kao CH: **Aluminum-inhibited root growth of rice seedlings is mediated through putrescine accumulation.** *Plant Soil* 2006, **288**:373-381.
79. Yang QS, Wang YQ, Zhang JJ, Shi WP, Qian CM, Peng XX: **Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response.** *Proteomics* 2007, **7**(5):737-749.
80. Kochian LV, Pineros MA, Hoekenga OA: **The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity.** *Plant and Soil* 2005, **274**(1-2):175-195.
81. Ma JF, Nagao S, Sato K, Ito H, Furukawa J, Tekeda K: **Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley.** *J Exp Bot* 2004, **55**:1335-1341.

82. Sharma P, Dubey RS: **Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum.** *Plant Cell Reports* 2007, **26**(11):2027-2038.
83. Arroyo-Serralta GA, Kú-González A, Hernández-Sotomayor SMT, Aguillar JJZ: **Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of Coffea Arabica.** *Plant Physiol Biochem* 2005, **43**:27-35.
84. Simonovicova M, Tamas L, Huttova J, Mistrík I: **Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots.** *Biol Plant* 2004, **48**:261-266.
85. Camak I, Horst WJ: **Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine max).** *Physiologia Plantarum* 1991, **83**:463-468.
86. Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Matsumoto H: **Expression of aluminium-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminium stress and and/or oxidative stress.** *Plant Physiol* 2000, **122**:657-665.
87. Watt DA: **Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress.** *J Exp Bot* 2004, **385**:1163-1174.
88. Ma JF, Nagao S, Huang CF, Nishimura M: **Isolation and Characterization of a Rice Mutant Hypersensitive to Al.** *Plant Cell Physiol* 2005, **46**(7):1054-1061.
89. Chen RF, Shen RF, Gu P, Dong XY, Du CW, Ma JF: **Response of Rice (Oryza sativa) with Root Surface Iron Plaque Under Aluminium Stress.** *Annals of Botany* 2006, **98**:389-395.
90. Klessig DF, Malamy J: **The salicylic acid signal in plants.** *Plant Molecular Biology* 1994, **26**.
91. Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB: **Influence of Salicylic Acid-Mediated Oxidative Damage Requires H₂O₂.** *Plant Physiol* 1997, **115**:137-149.
92. Durrant WE, Dong X: **Systemic acquired resistance.** *Annual Review of Phytopathology* 2004, **42**:185-209.
93. Matos AR, Mendes AT, Scotti-Campos P, Arrabaca JD: **Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using**

- the alternative oxidase as a stress-reporter protein.** *Physiologia Plantarum* 2009, **137**(4):485-497.
94. Chang TT: **The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices.** *Euphytica* 1976, **25**:435-444.
 95. Harland JR, De Wet MJ: **Towards rational classification of cultivated plants.** *Taxon* 1971, **20**:509-517.
 96. Morishima H, Oka HI: **The pattern of interspecific variation in the genus *Oryza*: Its quantitative representation by statistical methods.** *Evolution* 1960, **14**:153-165.
 97. Whyte RO: **The Gramineae. Wild and cultivated plants of monsoonal and equatorial Asia: 1. Southeast Asia.** *Asian Perspect* 1972, **15**:127-151.
 98. Khush GS: **Origin, dispersal, cultivation and variation of rice.** *Plant Molecular Biology* 1997, **35**:25-34.
 99. Harlan JR: **The Living Fields: Our Agricultural Heritage.** New York: Cambridge Univ. Press; 1995.
 100. Huang S, Taylor NL, Narsai R, Eubel H, Whelan J, Millar AH: **Experimental Analysis of the Rice Mitochondrial Proteome, Its Biogenesis, and Heterogeneity.** *Plant Physiol* 2009, **149**:719-734.
 101. Otto SP, Whitton J: **Polyploid incidence and evolution.** *Annual Review of Genetics* 2000, **34**:401-437.
 102. Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C *et al*: **The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla.** *Nature* 2007, **449**(7161):463-U465.
 103. Kim KD, Shin JH, Van K, Kim DH, Lee SH: **Dynamic Rearrangements Determine Genome Organization and Useful Traits in Soybean.** *Plant Physiology* 2009, **151**(3):1066-1076.
 104. Pfeil BE, Schlueter JA, Shoemaker RC, Doyle JJ: **Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: A phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families.** *Systematic Biology* 2005, **54**(3):441-454.
 105. Costa JA: **Cultura da soja.** Porto Alegre: Evangraf; 1996.

106. Phang TH, Shao GH, Lam HM: **Salt tolerance in soybean.** *Journal of Integrative Plant Biology* 2008, **50**(10):1196-1212.
107. Messina MJ: **Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects.** *American Journal of Clinical Nutrition* 1999, **70**(3):439s-450s.
108. Lee KG, Mitchell AE, Shibamoto T: **Determination of antioxidant properties of aroma extracts from various beans.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, **48**(10):4817-4820.
109. Marx J: **The roots of plant-microbe collaborations.** *Science* 2004, **304**(5668):234-236.
110. Qiu P: **Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, **309**(3):495-501.
111. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, Hannett NM, Harbison CT, Thompson CM, Simon I *et al*: **Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Science* 2002, **298**(5594):799-804.
112. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al*: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**(5507):1304-+.
113. Roth FP, Hughes JD, Estep PW, Church GM: **Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation.** *Nature Biotechnology* 1998, **16**(10):939-945.
114. Yi JX, Derynck MR, Chen L, Dhaubhadel S: **Differential expression of CHS7 and CHS8 genes in soybean.** *Planta* 2010, **231**(3):741-753.
115. **Phytozome** [<http://www.phytozome.net/>]
116. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coghill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K *et al*: **The Pfam protein families database.** *Nucleic Acids Research* 2010, **38**:D211-D222.
117. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R *et al*: **Clustal W and clustal X version 2.0.** *Bioinformatics* 2007, **23**(21):2947-2948.
118. **The GeneDoc Program** [<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>]

119. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution* 2007, **24**(8):1596-1599.
120. Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S: **PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences.** *Nucleic Acids Research* 2002, **30**(1):325-327.
121. Murashige T, Skoog F: **A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.** *Physiologia Plantarum* 1962, **15**(3):473-&.
122. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
123. Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP: **In silico Analysis of Transcription Factor Repertoire and Prediction of Stress Responsive Transcription Factors in Soybean.** *DNA Research* 2009, **16**(6):353-369.
124. Libault M, Thibivilliers S, Bilgin D, Radwan O, Benitez M, Clough S, Stacey G: **Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization.** *Plant Genome* 2008, **1**:44-54.
125. Saito K: **Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road.** *Plant Physiology* 2004, **136**(1):2443-2450.
126. Biswal B, Raval M, Biswal U, Joshi P: **Response of Photosynthetic Organelles to Abiotic Stress: Modulation by Sulfur Metabolism.** In: *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants.* Berlin/Heidelberg: Springer; 2008: 167-191.
127. Rausch T, Wachter A: **Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations.** *Trends in Plant Science* 2005, **10**(10):503-509.
128. de Virville JD, Cantrel C, Bousquet AL, Hoffelt M, Tenreiro AM, Pinto VV, Arrabaca JD, Caiveau O, Moreau F, Zachowski A: **Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings.** *Plant Cell and Environment* 2002, **25**(10):1289-1297.
129. Matos AR, Hourton-Cabassa C, Cicek D, Reze N, Arrabaca JD, Zachowski A, Moreau F: **Alternative oxidase involvement in cold stress response of**

- Arabidopsis thaliana fad2 and FAD3+ cell suspensions altered in membrane lipid composition.** *Plant and Cell Physiology* 2007, **48**(6):856-865.
130. Caiveau O, Fortune D, Cantrel C, Zachowski A, Moreau F: **Consequences of omega-6-oleate desaturase deficiency on lipid dynamics and functional properties of mitochondrial membranes of Arabidopsis thaliana.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(8):5788-5794.
131. Mendel RR, Bittner F: **Cell biology of molybdenum.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, **1763**:621–635.
132. Teschner J, Lachmann N, Schulze J, Geisler M, Selbach K, Santamaria-Araujo J, Balk J, Mendel RR, Bittner F: **A Novel Role for Arabidopsis Mitochondrial ABC Transporter ATM3 in Molybdenum Cofactor Biosynthesis.** *The Plant Cell* 2010, **22**:468-480.
133. Dong XN: **NPR1, all things considered.** *Current Opinion in Plant Biology* 2004, **7**(5):547-552.
134. Amirsadeghi S, Robson CA, Vanlerberghe GC: **The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress.** *Physiologia Plantarum* 2007, **129**(1):253-266.
135. Wiedemann N, Urzica E, Guiard B, Muller H, Lohaus C, Meyer HE, Ryan MT, Meisinger C, Muhlenhoff U, Lill R *et al*: **Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins.** *Embo Journal* 2006, **25**(1):184-195.
136. Adam AC, Bornhovd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K: **The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria.** *Embo Journal* 2006, **25**(1):174-183.
137. Shi Y, Ghosh MC, Tong WH, Rouault TA: **Human ISD11 is essential for both iron–sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis.** *Human Molecular Genetics* 2009, **18**:3014-3025.
138. Rouault TA, Tong WH: **Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005, **6**(4):345-351.
139. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M: **Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses.** *Current Opinion in Plant Biology* 2003, **6**(5):410-417.

140. Baier AC, D. J. Somers, and J. P. Gustafson: **Aluminum tolerance in wheat: Correlating hydroponic evaluation with field and soil performances.** *Plant Breeding* 1995, **114**:291-296.
141. Xu XM, Moller SG: **Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Systems and their Crosstalk.** *Chembiochem* 2008, **9**(15):2355-2362.

ANEXO A

Differential expression of cysteine desulfurases in soybean.

(Artigo submetido à revista *BMC Plant Biology*)

Article title: Differential expression of cysteine desulfurases in soybean

MS ID : 1197447583482666

Authors : Marta D Heis, Ana Paula G Frazzon, Rogério Margis and Jeverson Frazzon

Journal : BMC Plant Biology

Dear Dr Frazzon

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1197447583482666_article.pdf (751K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1441480741482667_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to toeditorial@biomedcentral.com.

The submitting author can check on the status of the manuscript at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>