

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

Ferritina: silenciamento gênico, caracterização molecular de mutantes e expressão em plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv Nipponbare)

Aluno: Júlio César de Lima

Orientador: Dra. Janette Palma Fett

Co-Orientador: Dra. Márcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

Banca examinadora:

Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – PPGB - UFC - CE

Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGBM – UFRGS – RS

Dr. Arthur Germano Fett-Neto – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM – UFRGS – RS

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

Porto Alegre
Março de 2007

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a muitas pessoas que sempre estiveram prontas quando busquei apoio em momentos difíceis, mas creio que seja coerente resumir aqui os agradecimentos para algumas em especial.

Em primeiro lugar, à orientação e paciência das pesquisadoras Dra. Janette P. Fett e Dra. Márcia Margis. É relevante adjetivar “pesquisadoras”, pois como disse um dia um pesquisador e Reitor da Universidade Federal de Viçosa: “pesquisadores brasileiros não fazem ciência, fazem milagres por sua dedicação incansável e com poucos recursos”.

Aos órgãos de fomento pelo apoio e concessão da bolsa. Com esperança que este apoio possa ser maior e atingir futuros cientistas brasileiros e que possamos colaborar de alguma forma nas questões que são estratégicas para o desenvolvimento de nossa nação e País.

Aos pesquisadores membros da Comissão de Acompanhamento Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira e Dr. Rogério Margis, pelas dicas de ordem prática.

Agradecimento especial ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela oportunidade que tive de ministrar, como tutor, a disciplina de Biologia Molecular Básica para estudantes de graduação do Curso de Ciências Biológicas pelo PROIN (Programa de Integração Pós-Graduação e Graduação).

Agradecimento especial ao pesquisador Dr. Rogério Margis, pelo auxílio e por crer que haveremos de desenvolver ótimos trabalhos em um futuro bastante próximo.

A disponibilidade dos pesquisadores membros da banca avaliadora.

Agradecimentos especiais aos colegas dos laboratórios em que nos quais me fiz presente: Laboratório de Fisiologia Vegetal, Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas e Laboratório de Genômica e Genética de População de Plantas.

Agradecimentos especiais aos colegas Guilherme Leitão Duarte e Rafael Rauber. Que seus futuros sejam brilhantes!

Agradecimentos especiais às pesquisadoras M. Sc. Gecele Paggi e M. Sc. Clarisse Palma da Silva pela amizade.

A todos os colegas do PPGBCM, do PPGGBM, PPGB e da UFRGS.

Agradecimento especial à Silvia e ao Luciano da secretaria do PPGBCM, pela dedicação incansável.

Aos amigos inseparáveis da “Liga do X”: Adriano Silvério, Érica Duarte Silva, Paulo Roberto da Silva, Anderson Machado, Rafael Augusto Arenhart (mais novo integrante).

Aos eternamente amigos e cientistas Dr. Douglas Lau e Dra. Elene Yamazaki Lau, Dr. Miguel Angel Dita Rodrigues, Dr. Lucas da Ressurreição Garrido, Dr. Marcos Bottom (e a sua esposa Adri), Dr. Klaus Konrad Scheuermann, Dr. Jorge Pereira, M. Sc. Cláudio de Azevedo Nolasco, M. Sc. Valdir Lourenço Júnior, M. Sc. Jesus Rosemar Borges (e a sua esposa Ângela), M. Sc. Lindomar de Freitas Lopes (e a sua esposa Cristina). Aos demais amigos que me desculpando agora, esqueço.

Ao Dr. Sérgio Hermínio Brommonschenkel da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Luciano Ignaczak, pela amizade de mais de 20 anos.

À força da energia vital que move o Universo.

Sem exceção alguma, a todos de minha família. Que meu afastamento por razões pessoais, profissionais e científicas seja compreendido.

E acima de tudo, aos meus pais Osvaldo e Alda e a minha tia Ruth, que são meu espelho e uma de minhas grandes razões de luta nesta vida.

SUMÁRIO

Agradecimentos	2
SUMÁRIO.....	4
Lista de abreviaturas.....	6
Lista de Figuras	8
Lista de tabelas	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
Revisão de literatura	13
Ferro – absorção, transporte e homeostase em plantas	13
Ferritina – estrutura tridimensional e processo de acúmulo de ferro em sua cavidade interna.	18
Número de cópias e estrutura dos genes da ferritina em genomas de plantas.....	21
Ferritina – regulação da expressão em plantas.....	22
Aspectos biotecnológicos da ferritina em plantas.....	24
Análise de mutantes e silenciamento gênico como ferramentas na determinação da função gênica em plantas	25
Uso de mutantes na determinação da função de genes	25
Bancos de Mutantes.....	26
RNA interferente	28
CAPÍTULO I.....	30
(artigo a ser publicado em periódico científico indexado)	31
Posttranscriptional gene silencing of two ferritin genes in rice (<i>Oryza sativa</i> L. ssp. <i>japonica</i> cv. Nipponbare) using RNAi	32
Introduction	33
Materials and methods.....	34
Plant Material	34
Construct design and transformation of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain AGL1	34
Transformation of rice calli and regeneration of transgenic rice plants.....	36
Screening of positive transgenic rice plants.....	36
Quantification of ferritin expression in the transgenic rice lines by real time PCR and semi quantitative RT-PCR	36
Results	37
Discussion.....	38
Acknowledgments	41
References:	41
CAPÍTULO II.....	52
Análise in silico e molecular de mutantes de arroz Nipponbare por inserção do retroelemento TOS17	53
Objetivos.....	54
Material e métodos	54
Análise in silico de mutantes de arroz Nipponbare por inserção do retroelemento TOS17.....	54
Obtenção do material genético	55
Cultivo das plantas e coleta de material foliar para análise do DNA.....	55
Extração e análise qualitativa de DNA total	56

Análise molecular por PCR das linhagens mutantes	56
Resultados.....	58
Identificação in silico de linhagens mutantes TOS17 de arroz.....	58
Alinhamento da seqüência genômica de OsFer2 com as FSTs (Flanqing Sequence Tags) das linhagens mutantes.....	59
Análise molecular das linhagens mutantes TOS17 de arroz.....	60
Discussão.....	61
CAPÍTULO III.....	80
Análise de expressão dos genes de ferritina em plantas de arroz Nipponbare cultivadas sob excesso de ferro.	81
Objetivo.....	81
Material e métodos.....	82
Cultivo das plantas.....	82
Tratamentos.....	82
Extração de RNA total.....	82
Síntese de cDNA a partir de RNA total.....	83
Oligonucleotídeos utilizados e análise por RT-PCR.....	83
Resultados.....	84
Discussão.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
PERSPECTIVAS.....	<u>90</u>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<u>90</u>

Lista de abreviaturas

At = *Arabidopsis thaliana*

AttB = sítios para recombinação de DNA baseados no bacteriófago Lambda

ATPase = proteína enzimática que hidrolisa moléculas de ATP (Adenosina trifosfato)

°C = escala centígrada Celsius (Grau Celsius)

ccdB = gene que codifica uma proteína que inibe a proteína girase.

cDNA = DNA complementar

CTAB = cationic hexadecyltrimethyl ammonium bromide (detergente catiônico para extração de ácidos nucleicos)

dNTP = deoxyribonucleotides (desoxirribonucleotídeos)

dsRNAs = double stranded RNA (RNAs de fita dupla)

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilenoaminotetraacético)

eEF α 1 = eukaryotic elongation factor alfa 1 (Fator de elongação eucariótico alfa 1)

FDH = Formaldehyde dehydrogenase gene

Fer = ferritina

FRO = ferric reductase oxidase (Ferro redutase oxidase)

FST = flanking sequence tag (Etiqueta flanqueadora de seqüência)

Gateway system = sistema de recombinação de DNAs circulares (vetores) e DNAs lineares *in vitro*

GUS linker = pedaço do vetor de DNA pANDA que forma a alça do RNA em grampo quando o cassete é transcrito

Hairpin RNA = RNA em grampo formado por uma fita simples de RNA, composto por uma região de fita dupla e uma região em forma de alça

HPT = hygromycin phosphotransferase (higromicina fosfotransferase)

IRT = iron regulated transporter

LB = Luria Broth (meio de cultura universal para o cultivo de bactérias)

min = minutos

mRNA = messenger RNA (RNA mensageiro)

MS = Murashige Skoog (meio de cultura universal utilizado na cultura de tecidos vegetais)

NaCl = Cloreto de Sódio

ng = nanograma

NB = meio N6D básico

Os = *Oryza sativa*

PCR = polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Ps = *Pisum sativum*

PVP = polyvinilpyrrolidone (polivinilpirrolidona)

qRT-PCR =quantitave reverse transcriptase – polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

RISC = RNA interferene silencing complex (complexo de silenciamento por interferência de RNA)

s = segundos

T-DNA = parte do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*

Tris – HCl = Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride

Ubq = ubiquitina

Zm = *Zea mays*

ZRT = zinc regulated transporter

YS = yellow stripe

YSL = yellow stripe like

µg/ml = micrograma por mililitro

Lista de Figuras

Figura 1: Divisão em quatro principais classes de proteínas que formam complexos com o ferro	14
Figura 2: Estrutura tridimensional da subunidade da proteína ferritina	15
Figura 3: Estrutura tridimensional da proteína ferritina	17
Figura 4: Representação esquemática dos determinantes da homeostase de ferro em plantas	20
Figura 5: Estratégias de plantas gramíneas e não gramíneas para aquisição de ferro do solo	21
Figura 6: Resultado de uma busca no OryGenesDB	28
Figura 7 (Figura 1 do artigo): Electrophoretic analysis of a ferritin DNA PCR product and alignment of full length cDNA clones	47
Figura 8 (Figura 2 do artigo): Illustrative scheme of the construct within the T-DNA borders to silence <i>OsFer 1</i> and <i>2</i> of rice	48
Figura 9 (Figura 3 do artigo): Electrophoretic DNA analysis of PCR products in 1% agarose gel of bacterial clones containing the pANDAOsFERi	48
Figura 10 (Figura 4 do artigo): Electrophoretic analysis of PCR of transgenic plants for the T-DNA construct carrying the <i>hpt</i> gene	49
Figura 11 (Figura 5 do artigo): Electrophoretic analysis of RT-PCR products of <i>OsFer</i> and <i>OsAct1</i> in transgenic silenced lines for the ferritin genes of rice	49
Figura 12: Esquema das etapas da análise <i>in silico</i>	54
Figura 13: Esquema da estratégia utilizada para a análise por PCR para a caracterização molecular dos mutantes por inserção do TOS17	56
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de mutantes TOS17 para o gene <i>OsFer2</i>	60
Figura 15: Alinhamento da seqüência gênômica de <i>OsFer2</i> com as FSTs das respectivas linhagens mutantes ND4539, NF2003 e NG0250	74
Figura 16: Oligonucleotídeo para diferenciar indivíduos homocigotos de heterocigotos da linhagem mutante Tos17 ND4539 para o gene <i>OsFer2</i> somente	78
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da RT-PCR de <i>OsAct1</i> e <i>OsFer</i>	84
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da RT-PCR de <i>OsAct1</i> e <i>OsFer</i>	84

Lista de tabelas

- Tabela 1 (artigo):** List of oligonucleotídeos used in the qRT-PCR and semi-quantitative RT-PCR essays 50
- Tabela 2 (artigo):** Efficiency of ihpRNA, hpRNA, co-suppression and anti-sense constructs to silence genes in *Arabidopsis* and rice 50
- Tabela 3:** Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular das linhagens mutantes para o gene *OsFer2* 57
- Tabela 4:** Genes e respectivas linhagens mutantes encontradas no Banco de Mutantes por inserção do TOS17 58
- Tabela 5:** Oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão da ferritina por RT-PCR semi-quantitativo 83

RESUMO

O ferro é um micronutriente essencial em plantas, como também para praticamente todos os demais organismos. Porém, as formas livres de ferro intracelular podem ser extremamente danosas. A proteína ferritina tem papel crucial neste contexto, com a função de acumular ferro de uma forma segura e biodisponível. Cada proteína pode acumular aproximadamente 4500 átomos de ferro em sua cavidade interna. Em plantas, existe um número variado de cópias gênicas para ferritina e estas cópias têm expressão modulada por fatores bióticos e abióticos. No genoma do arroz foram caracterizadas duas cópias para o gene da ferritina. Como existem poucos estudos funcionais para ferritina em arroz, este trabalho teve como objetivos: (a) silenciar as duas cópias da ferritina da subespécie *japonica* variedade Nipponbare; (b) caracterizar, por PCR, mutantes para ferritina por inserção do retroelemento TOS17; (c) caracterizar a expressão da ferritina da subespécie de arroz *japonica*, variedade Nipponbare, em plantas cultivadas em meio hidropônico sob excesso de ferro.

Utilizando o sistema Gateway (Invitrogen) nós desenvolvemos uma construção que expressa um RNA em grampo projetado para silenciar ambas as cópias dos genes da ferritina de arroz. Baseando-se em um protocolo bem estabelecido de regeneração de plantas transgênicas de arroz, nós regeneramos plantas transgênicas silenciadas para os genes da ferritina. Foi obtido 75% de sucesso na geração das plantas silenciadas, o que está de acordo com a literatura. Os transformates primários (T0) não apresentaram anormalidades morfológicas evidentes. É possível que uma rota compensatória para armazenar ferro de forma segura seja ativada quando os níveis de ferritina são diminuídos. Além disso, as plantas produzidas neste trabalho são uma ferramenta potencial para estudar a relação ferro-planta. Baseando-se em análises *in silico* e por PCR, nós caracterizamos três linhagens mutantes contendo inserção do retroelemento TOS17 no gene *OsFer2*, entretanto, ainda não identificamos mutantes homozigotos. Em plantas de arroz crescidas em meio hidropônico, o aumento da concentração de ferro resultou em maiores níveis de expressão de ferritina, avaliados por RT-PCR semi-quantitativo, após 6 h e 12 h de exposição aos tratamentos de 50 e 500 ppm de FeSO₄ do que na condição controle (5,6 ppm).

ABSTRACT

Iron is an essential micronutrient for plants, as for virtually all organisms. However, free intracellular iron forms can be extremely dangerous. The ferritin protein has a crucial role in this context, storing iron in a safe and bioavailable form. Each protein molecule can accumulate about 4500 iron atoms in its internal cavity. In plants, there is a variable number of ferritin gene copies and their expression is modulated by biotic and abiotic factors. There are two copies of the ferritin gene in the rice genome. As there are few functional studies for the ferritin genes in rice, this work had the objectives of: (a) to silence both copies of the ferritin genes in the *japonica* Nipponbare variety; (b) to identify and characterize TOS17 insertional mutants for the ferritin genes using *in silico* and PCR essays; (c) to characterize the expression of ferritin in the *japonica* Nipponbare variety under iron stress conditions.

Using the Gateway system we generated a construct that expresses a hairpin RNA designed to silence both rice ferritin gene copies. Based on a well-established protocol to regenerate transgenic plants, we developed transgenic ferritin silenced lines. We obtained 75% success in generating rice silenced lines against ferritin. The primary transformants (T0) had no clear morphological abnormalities. It is possible that a compensatory pathway to store iron in a safe form can be induced when levels of ferritin are downregulated. Furthermore, the plants generated in this work are a potential tool to study iron-plant relations. Based on *in silico* and PCR essays we characterized three TOS17 insertional mutant lines for the *OsFer2* gene, but until now we could not identify TOS17 homozygous mutants. In rice plants grown in hydroponic culture, increasing iron concentrations resulted in higher expression levels of ferritin, evaluated by semi-quantitative RT-PCR, after 6h and 12h exposure to 50 and 500 ppm of FeSO₄, than in the control treatment (5,6 ppm).

INTRODUÇÃO

Revisão de literatura

Ferro – absorção, transporte e homeostase em plantas

O ferro é um micronutriente essencial, estando presente nos sítios ativos de enzimas e outras proteínas importantes (Messerschmidt et al, 2001). Em sistemas biológicos, complexos contendo ferro estão envolvidos nas seguintes funções: (1) estabilidade da estrutura terciária e quaternária de proteínas; (2) absorção e estoque de ferro; (3) reações de transferência de elétrons; (4) ativação de substratos pelo comportamento eletrofílico do ferro (Holm, 1996). Na figura 1 estão listadas algumas das principais proteínas que formam complexos com o ferro.

Apesar do ferro ser um micronutriente essencial, mecanismos celulares e moleculares devem regular sua absorção, transporte e acúmulo até a sua utilização nos mais variados processos metabólicos. A revisão publicada por Hell e Stephan (2003) descreve mecanismos de aquisição de ferro e alguns aspectos moleculares e fisiológicos envolvendo este elemento. Segundo os autores, as plantas têm dois problemas principais com o ferro: sua insolubilidade e sua toxidez. Portanto, para assegurar a absorção do solo e evitar o excesso de ferro, que é tóxico para as células, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos devem ser finamente regulados (Figura 2).

As plantas lidam com a insolubilidade do ferro utilizando sistemas moleculares para a redução e/ou secretam moléculas para quelar o ferro não reduzido. Dentro das células, a geração de radicais extremamente tóxicos é evitada por mecanismos que fazem com que o ferro se ligue a moléculas de uma forma segura. Ácidos orgânicos, especialmente a nicotianamina, e proteínas especializadas ligam-se ao ferro antes que ele possa desempenhar seu papel funcional na célula. A absorção e o transporte de ferro ao longo da planta são processos altamente integrados, envolvendo o transporte através de membranas e mudanças redox. Todos esses processos são comandados por demandas fisiológicas e metabólicas (Grusak et al., 1999).

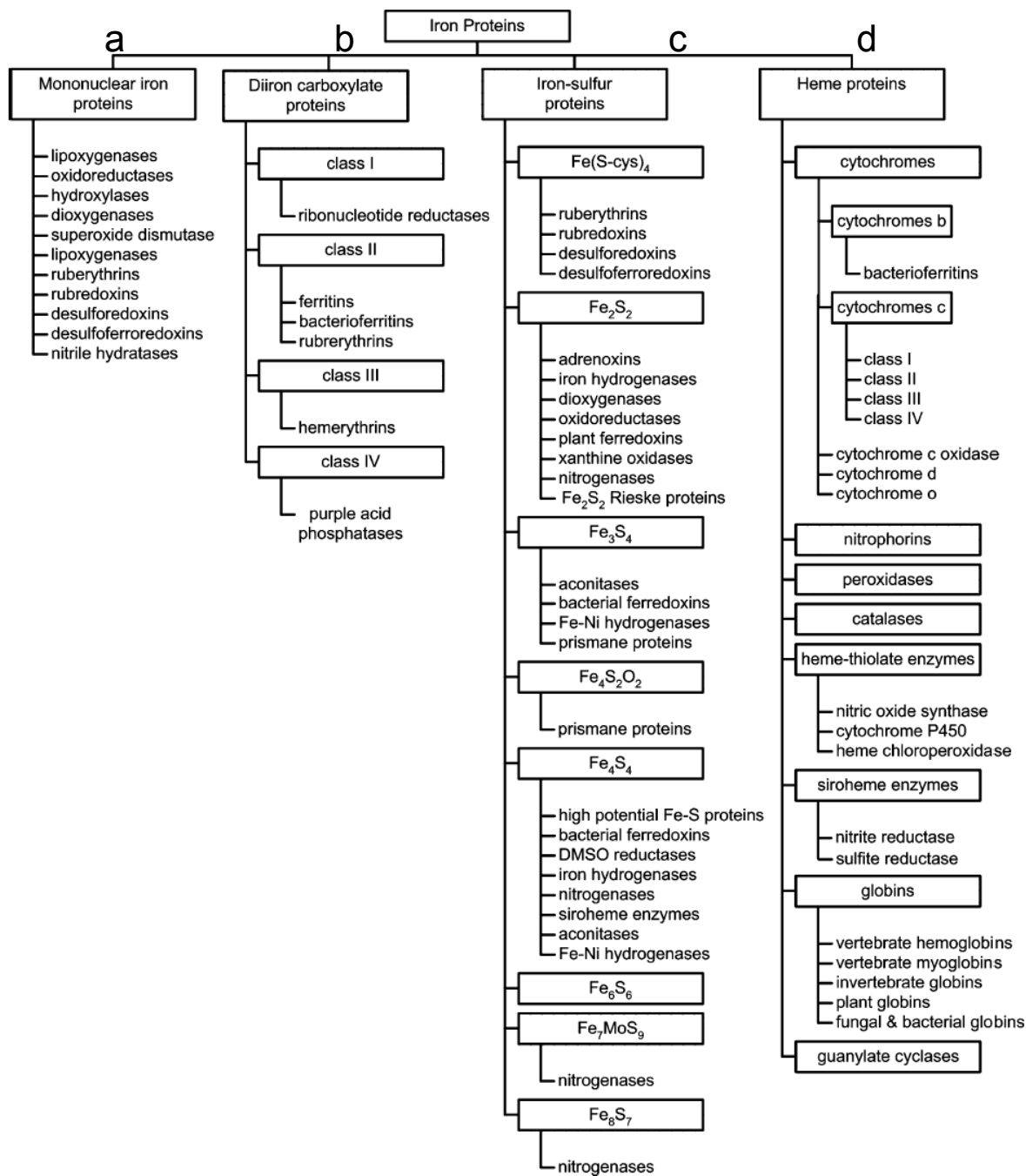


Figura 1. Divisão apresentando as quatro principais classes de proteínas que formam complexos com o ferro: (a) ferro-proteínas mononucleares; (b) diferro proteínas carboxiladas; (c) “clusters” ferro-enxofre; (d) proteínas com radical heme (Szacilowski et al., 2005).



Figura 2. Representação esquemática dos determinantes da homeostase de ferro em plantas. O crescimento e desenvolvimento normal das plantas são possíveis com um conteúdo adequado de ferro, evitando-se concentrações tóxicas e ou deficientes. A homeostase é geneticamente determinada ao nível de transporte, acúmulo e utilização de ferro. Estas três funções são profundamente influenciadas por fatores ambientais. Modificado de Briat (2006).

Em condições aeróbicas e pH neutro ou básico, o ferro é extremamente indisponível para absorção pelas plantas, formando complexos insolúveis no solo (Briat, 2006). As plantas desenvolveram duas estratégias (Figura 3) para assegurar a absorção de ferro, a partir das raízes, quando em condições de baixa disponibilidade de ferro (Römheld e Marschner 1986). As plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção das gramíneas, desenvolveram a estratégia I, que apresenta os seguintes passos: (i) excreção de prótons via ATPase tipo – P para acidificar o meio e aumentar a solubilidade do Fe III. A acidificação é, muito provavelmente, o resultado da ação de um ou mais membros da família das H⁺ ATPases existentes em plantas (Palmgren, 1998); (ii) redução do Fe III por uma quelato redutase para a forma de Fe II, que é mais solúvel; (iii) transporte do Fe II

por transportadores de ferro. Genes codificando Fe III quelato redutases foram clonados de *Arabidopsis* (*FRO2*; Robinson et al, 1999) e ervilha (*FRO1*; Waters et al., 2002). O gene para o transporte de ferro *IRT1* foi clonado de *Arabidopsis* (Eide et al., 1996) e seu ortólogo RIT1 clonado de ervilha e tomate (Cohen et al., 2004; Eckhardt et al., 2001). A proteína codificada pelo gene *IRT1* tem sido relatada como a principal proteína de transporte de ferro do solo em *Arabidopsis*. O mutante *IRT1* de *Arabidopsis* não é viável, a menos que ele seja resgatado com altas concentrações de ferro exógeno (Varotto et al., 2002; Vert et al., 2002). Plantas de arroz possuem dois genes similares ao *IRT1* de *Arabidopsis*, *OsIRT1* e *OsIRT2* (Gross et al., 2003).

A estratégia II evoluiu nas gramíneas, como arroz (*Oryza sativa*), o trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*) e milho (*Zea mays*). As raízes destas plantas liberam fitossideróforos que quelam o Fe III na rizosfera. Proteínas de transporte como as codificadas pelos genes da família Yellow Stripe transportam o complexo ferro-fitossideróforo para dentro da célula. A absorção de ferro ligado a fitossideróforos foi elucidada pela clonagem do alelo mutante *ys1* a partir de uma população de milho etiquetada com transposons mobilizados (Curie et al, 2001). O mutante *ys1* teve seu fenótipo revertido, transformando-se a planta mutante com o alelo selvagem. Além dessas estratégias, outras mudanças também são observadas como: alterações na morfologia das raízes para auxiliar na absorção de ferro e aumento na concentração de citrato no floema (Schmidt, 1999).

O transporte radial de micronutrientes pelo sistema radicular, especialmente o ferro, requer que o íon esteja complexado, porque cátions di e trivalentes podem ocasionar danos oxidativos às células da raiz quando interagem com oxigênio (Briat et al., 1995; Stephan et al., 1996). Tem sido bem documentado que ácidos orgânicos, especialmente o citrato, são os principais quelantes no xilema (Cataldo et al., 1988). Antes de atingir os vasos condutores do xilema, o íon ferroso é oxidado a íon férrico, possivelmente quando o Fe II atravessa as membranas do parênquima do xilema (Kochian, 1991). O ferro que atinge as partes aéreas da planta é conduzido via movimento apoplástico pelo xilema. Em nível subcelular, ele é direcionado e acumulado nas ferritinas do cloroplasto quando em excesso, como também pode estar localizado na mitocôndria e nos vacúolos (Briat et al., 1995; Grusak et al., 1999). Uma vez nas folhas, o complexo Fe⁺³-citrato é provavelmente reduzido por uma quelato redutase de folha, já que atividades enzimáticas sugerindo

reações redox foram descritas por Bruggemann et al. (1993) em mesófilos de folhas. Em folhas de ervilha foi detectada a expressão de FRO1, indicando que a proteína codificada pelo gene possa realmente estar envolvida em atividades de redução do ferro (Waters et al., 2002). Recentemente, AtYSL2, um dos homólogos de YS1 de milho foi caracterizado em *Arabidopsis*. Ele complementa o mutante *fet3fet4* de levedura, que é deficiente no transporte de baixa e alta afinidade por ferro. Porém, somente o íon Fe^{+3} complexado a nicotianamina, e não Fe^{+2} , é transportado pela proteína. O gene é expresso nas raízes e folhas, nas células associadas do xilema, e tem sua expressão inibida em condições de deficiência de ferro. Em arroz também foi identificado e caracterizado um homólogo de YS1 de milho, como sendo um transportador de ferro ligado à nicotianamina e expresso no floema. Provavelmente, a proteína YS2 de milho seja correspondente aos transportadores de ferro III ligado a nicotianamina em monocotiledôneas e dicotiledôneas (DiDonato et al., 2004; Koike et al., 2004).

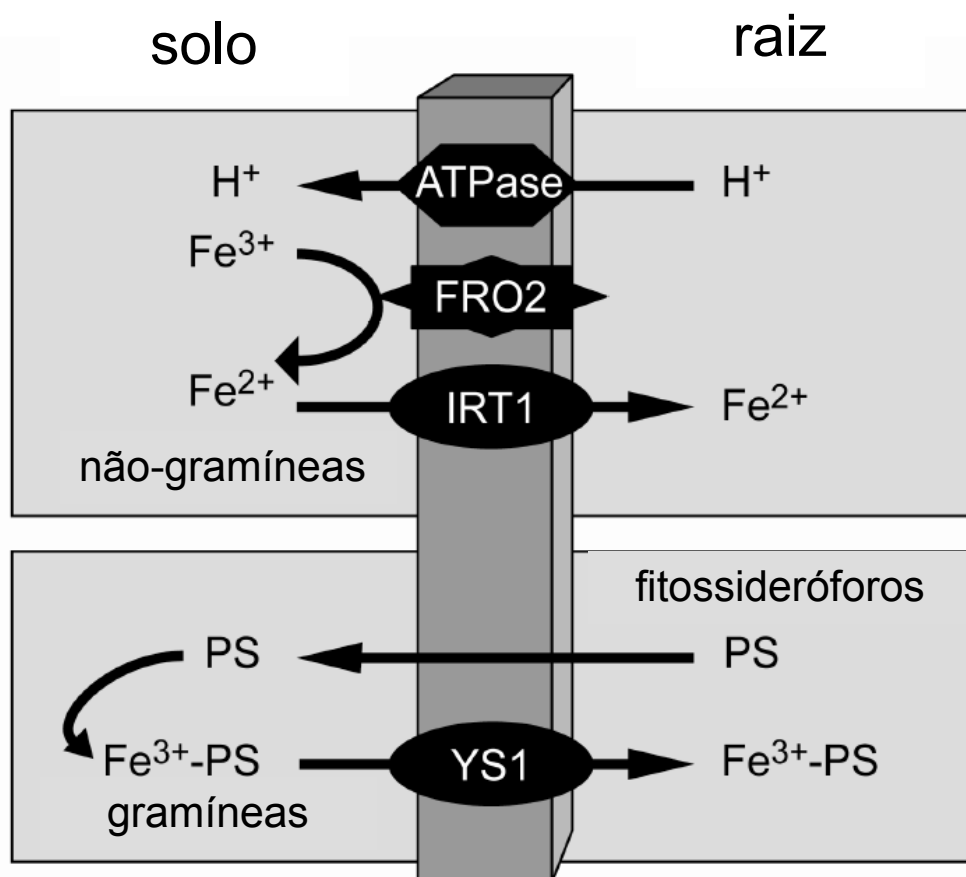


Figura 3. Estratégias de plantas gramíneas e não gramíneas para aquisição de ferro do solo. Plantas não-gramíneas acidificam a rizosfera em resposta a deficiência de ferro utilizando uma H^+ ATPase. Isto possibilita uma melhor solubilização do íon Fe^{+3} , que é reduzido por uma ferro quelato

redutase (FRO2 em *Arabidopsis*) pertencente à família NADPH oxidase. O íon ferroso resultante é transportado para dentro da célula por um transportador de raiz (*IRT1* em *Arabidopsis*) pertencente à família ZIP (ZRT: “Zinc Regulated Transporter”; IRT: “Iron Regulated Transporter”). Plantas gramíneas utilizam uma estratégia que envolve a “quelação”, ao contrário da estratégia da redução. Em condições de deficiência de ferro, fitossideróforos são sintetizados a partir de S-Adenosilmetionina, e secretados na rizosfera onde quelam o íon Fe^{+3} . O complexo é então transportado para dentro da célula por um transportador de raiz denominado Yellow Stripe 1 (YS1). Modificado de Briat (2006).

Os aspectos moleculares da homeostase de ferro são complexos e ainda serão objeto de estudos futuros. Não somente a regulação fina da absorção e do acúmulo de ferro é importante no metabolismo de minerais, mas também os aspectos moleculares que envolvem os estudos do transporte de ferro, por exemplo, desde a raiz até as partes aéreas das plantas, especialmente para as sementes (Qu et al., 2005).

Ferritina – estrutura tridimensional e processo de acúmulo de ferro em sua cavidade interna.

As ferritinas são proteínas conservadas desde bactérias até eucariotos superiores. Ao mesmo tempo em que estas proteínas têm função de reserva, elas também podem disponibilizar ferro quando necessário. Com isso, elas desempenham papel fundamental no metabolismo celular com a função de reservar ferro de uma forma segura e biodisponível. Pois, embora o ferro seja um micronutriente essencial às plantas, por vezes, passa a ser um elemento altamente nocivo aos sistemas biológicos, devido justamente às suas propriedades oxidorreduzivas. Isto ocorre quando há abundância da forma livre do mineral, pois os íons férrico e ferroso podem catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais ocasionam danos oxidativos às proteínas, ácidos nucleicos, membranas e outros constituintes celulares (Briat e Lobréaux, 1997).

Grossman et al. (1992) sequenciaram uma bacterioferritina de *Azotobacter vinelandii* e verificaram alta homologia com a ferritina de *Escherichia coli* e uma similaridade surpreendente com ferritinas eucarióticas. Nesse trabalho, os autores propuseram a unificação da família das ferritinas baseado na conservação de seqüências entre os organismos relatados. Barceló et al. (1997) caracterizaram a proteína ferritina a partir de sementes de alfafa (*Medicago sativa*) determinando que

a mesma é constituída da associação de subunidades protéicas de 28 a 26.5 kDa, resultando em uma proteína oligomérica nativa de 560 kDa. Outros autores descrevem que as ferritinas são uma classe de proteínas presentes em todos os organismos vivos, com a função de seqüestrar o ferro que é absorvido pelas células, mas que não é utilizado nos processos metabólicos. No momento em que o ferro é necessário, o que está armazenado na ferritina pode então ser liberado e prontamente utilizado pela célula. Desse modo, a proteína desempenha um papel tamponante, protegendo a célula do excesso prejudicial de ferro, como também liberando ferro quando necessário, já que ele é um micronutriente essencial (Laulhere et al., 1988).

As estruturas tridimensionais de ferritinas já caracterizadas são mais conservadas do que suas estruturas primárias. Cada subunidade é formada de quatro hélices longas (1 – 4), uma quinta hélice menor (5) e uma alça longa (Figura 4). As subunidades são arranjadas de tal forma que a configuração final seja uma “concha” com diâmetros externos e internos de 125 e 80 Angstroms, respectivamente (Harrison e Arosio, 1996). A proteína ferritina é formada de 24 subunidades do tipo alfa-hélice que se complexam para formar uma espécie de caixa que reserva ferro. A proteína madura pode acumular aproximadamente 4500 átomos de ferro (Lobréaux et al., 1992; Briat e Lobréaux (1997); (Figura 5).

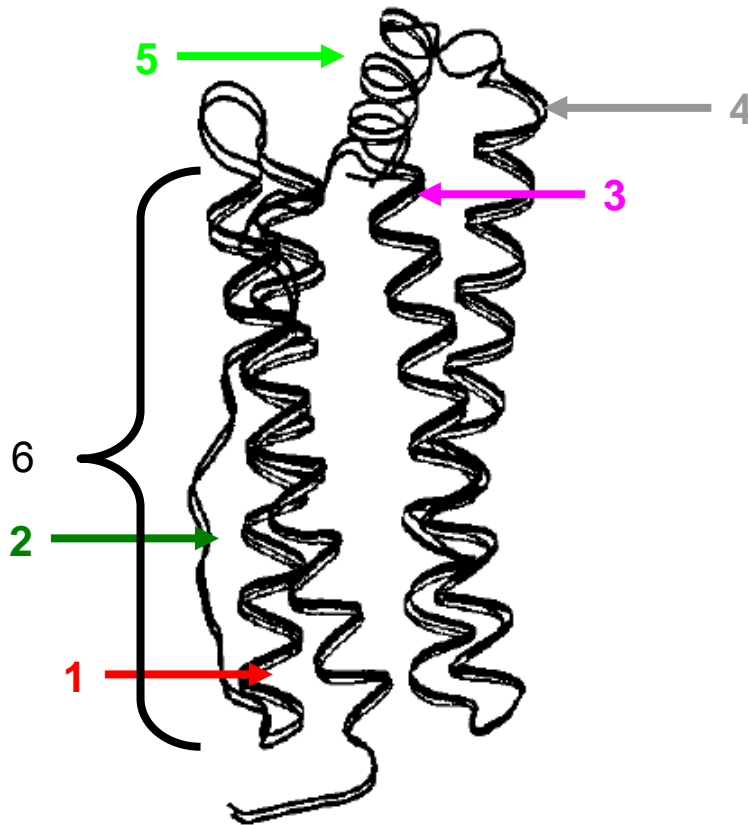


Figura 4. Estrutura tridimensional da subunidade da proteína ferritina. 1 – 5: alfa-hélices. 6: identifica a alça maior da subunidade. Adaptado de Harrison e Arosio (1996).

Como proposto originalmente, o processo de acúmulo e mineralização de ferro na cavidade interna da ferritina segue os seguintes passos: primeiro, o Fe (II) liga-se e é oxidado a Fe (III) nos centros catalíticos da proteína; em seguida, conjuntos de ferro (núcleos) são formados na cavidade interna gerando um mineral cristalino (ferrihidreto) e, por último, estes núcleos servem como uma superfície sobre a qual outros íons Fe (II) serão depositados e oxidados (Macara et al. 1972; Macara et al. 1973). É importante salientar que cada subunidade possui atividade catalítica para oxidar o íon Fe (II) para Fe (III).

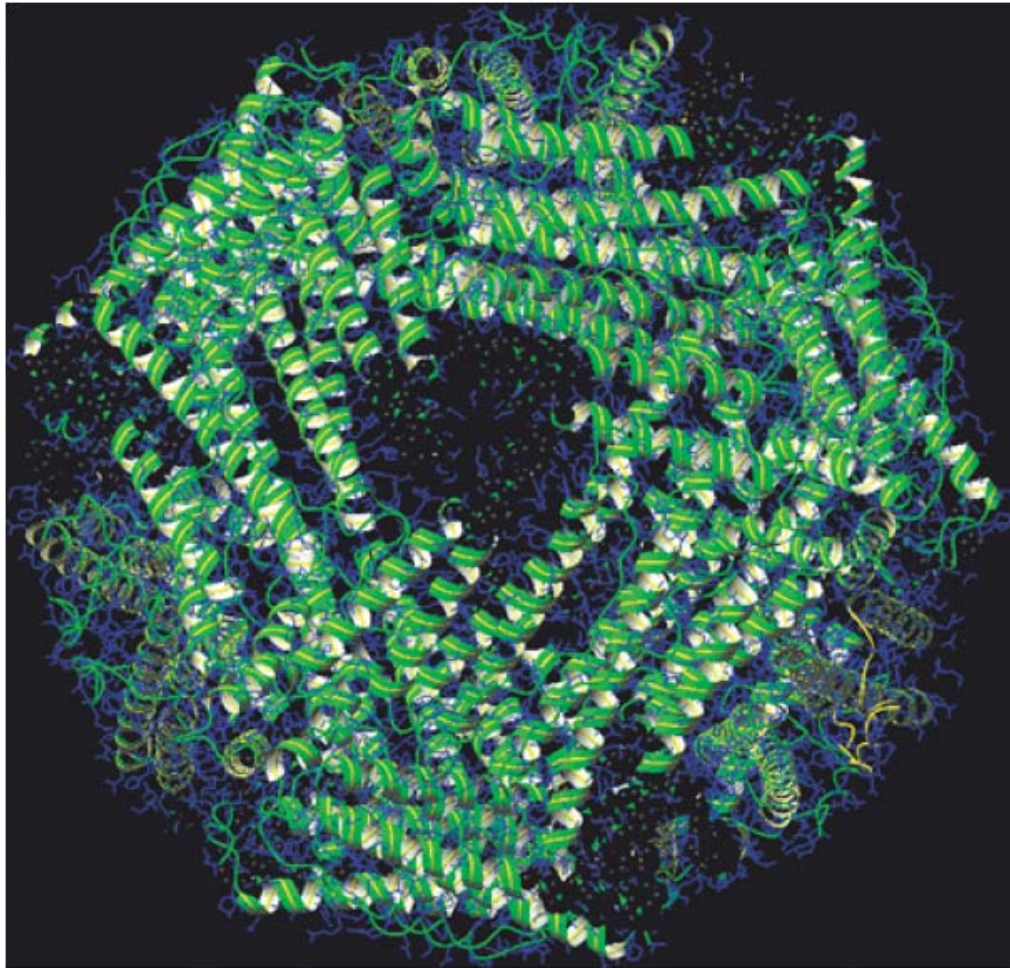


Figura 5. Estrutura tridimensional da proteína ferritina contendo as 24 subunidades componentes da proteína madura. O centro da proteína revela um poro pelo qual o ferro entra na espécie de caixa formada pelas subunidades. (Hintze e Theil, 2006).

Número de cópias e estrutura dos genes da ferritina em genomas de plantas

A proteína ferritina é conservada entre as plantas, porém o número de cópias de genes que a codificam varia entre as espécies. Em *Vigna unguiculata* foram encontrados três cDNAs diferentes para a ferritina. Oligonucleotídeos degenerados, projetados a partir de seqüências conservadas da ferritina de animais e vegetais, serviram para a identificação das três seqüências expressas originárias de uma biblioteca de cDNA de folhas de *Vigna unguiculata*. Estas foram as primeiras seqüências de nucleotídeos depositadas no GenBank para ferritina de plantas (Wicks e Entsch, 1993). Spence et al. (1991) caracterizaram uma seqüência

codificante de ferritina a partir de uma biblioteca de cDNA de *Phaseolus vulgaris*. Lobréaux et al. (1992) identificaram um clone de cDNA de ervilha (*Pisum sativum*) que codifica uma ferritina. Em milho (*Zea mays* L.) foram identificadas duas cópias de genes correspondentes à ferritina, sendo que há regulação diferencial na expressão dos dois genes (Fobis-Loisy et al. 1995). Em tabaco (*Nicotiana tabacum*) também foram identificadas duas cópias gênicas (Jiang, 2005). No trabalho publicado por Gross et al. (2003) foi descrita a identificação de dois genes codificando ferritina em arroz (*Oryza sativa* L.). Petit et al. (2001) identificaram quatro cópias do gene de ferritina no genoma de *Arabidopsis thaliana*, as quais são reguladas por diferentes moduladores. Em *Lupinus luteus* foram caracterizados três genes (Strozycki et al. 2003). Em plantas, as estruturas dos genes de ferritina são conservadas, sendo os mesmos constituídos de oito exons e sete introns; além disso, apresentam seqüências na região 5' UTR (untranslated region – região 5' não-traduzida) que são *cis*-elementos responsivos ao ferro e a outros fatores abióticos. Wei e Theil (2000) identificaram uma região no promotor da ferritina de soja como sendo responsiva a ferro. Essa região, denominada FRE não tem homologia com o gene de ferritina em animais.

Proudhon et al. (1996) descreveram que em ferritinas de plantas, o número de íntrons ($n = 7$) é maior do que em animais ($n = 3$), e que não há conservação da posição de íntrons quando as seqüências nucleotídicas de ferritinas de plantas são alinhadas com seqüências de animais. Por outro lado, entre os reinos animal e vegetal há conservação funcional dos genes.

Ferritina – regulação da expressão em plantas.

A localização subcelular da ferritina nos cloroplastos foi deduzida pela presença de um provável peptídeo de trânsito codificado por um cDNA de hipocótilo de soja. A seqüência de aminoácidos determinada a partir da de nucleotídeos revelou um peptídeo característico de proteínas codificadas por genes nucleares com destino cloroplástico (Ragland et al. 1990). A ferritina é expressa em diferentes tecidos de várias plantas, principalmente em células não associadas à fotossíntese ativa, tais como no fruto de maçã, na raiz de ervilha e feijão, em meristema de parte aérea e células do tecido condutor de *Atriplex*, *Acer pseudoplatanus*, *Salix fragilis*, tecidos secretores de *Passiflora* e em epitemas e

hidatódios de *Taraxacum* e *Saxifraga* (Crichton et al. 1978). Em ervilha, diferentes concentrações da proteína foram detectadas em diferentes órgãos da planta (Barceló et al 1997). Outros trabalhos confirmaram que o gene da ferritina é diferencialmente expresso na planta. Lescure et al. (1991) detectaram um aumento dos níveis de mRNA da ferritina em cultura de células de soja em resposta ao ferro acompanhado por um aumento similar no nível protéico, o que sugere uma regulação transcricional induzida por ferro. Lobréaux et al. (1992) também detectaram aumento da proteína ferritina, por imunodeteção, quando plantas de milho em cultura hidropônica foram tratadas com altas concentrações de Fe-EDTA e citrato de ferro. A regulação pós-transcricional da ferritina em nódulos de soja foi demonstrada por Kimata e Theil (1994). Nesse trabalho foi detectado o aumento da expressão do mRNA da ferritina e a diminuição do nível protéico em até cinco vezes nos nódulos da soja, o que sugere uma regulação autocatalítica para liberar o ferro acumulado na proteína. A degradação da ferritina ocorre em sementes de ervilha durante ou após a germinação, sugerindo a importância do acúmulo de ferro na semente via ferritina para uso no desenvolvimento inicial da planta (Lobréaux e Briat 1991). O ácido abscísico (ABA) que é um hormônio importante ao longo da ontogenia da planta, também está envolvido na regulação da ferritina em plantas. Um aumento na expressão de ferritina ao nível de mRNA foi detectado em plantas de milho cultivadas em meio hidropônico contendo ABA, indicando que ferro e ABA poderiam ter ação sinérgica na indução da expressão da ferritina (Lobréaux et al. 1993). Na análise de microarranjo, foi verificado que a expressão de ferritina diminuiu em plantas de *Arabidopsis* cultivadas em condições de deficiência de ferro (Thimm et al., 2001). Em arroz, análises de microarranjo demonstraram o aumento da expressão de ferritina em plantas cultivadas sob condições de seca, frio e excesso de sal (Rabani et al., 2003). O aumento da expressão de ferritina durante a senescência foi também demonstrado pelo isolamento de cDNAs em uma biblioteca subtrativa gerada a partir de folhas senescentes de *Brassica napus*. O aumento de expressão de ferritina sugere um provável acúmulo de ferro destinado a re-alocação para outras partes da planta durante a senescência (Buchanan-Wollaston, 1997). O acúmulo de mRNA do gene *AtFer1* foi observado por Murgia et al. (2004) em culturas de células de *Arabidopsis* tratadas com óxido nítrico. Murgia et al. (2002) já haviam observado aumento na expressão de ferritina induzida por óxido nítrico. Arnaud et al. (2006) também observou que em *Arabidopsis* há um rápido acúmulo de

óxido nítrico em resposta ao tratamento com ferro e uma consequente degradação de um fator repressor da ferritina *AtFer1*, que tem por sua vez, a expressão aumentada. Sugere-se, desse modo, que o óxido nítrico tem um importante papel na indução da expressão de ferritina por ferro. Savino et al. (1997) relataram que a expressão da *ZmFer1* de milho é inibida em células tratadas com ferro e antioxidantes como N-acetilcisteína e glutathione. Os autores também caracterizaram a inibição da *ZmFer1* pela ação de inibidores de serina/ treonina fosfatase e o aumento da expressão desse gene em células tratadas com peróxido de hidrogênio.

Como já discutido anteriormente, uma vez dentro da célula, metais em excesso e não prontamente utilizados, precisam ser armazenados para prevenir sua toxicidade (Briat e Lebrun 1999). Portanto, as ferritinas de plantas provavelmente constituem um componente importante na resposta ao estresse oxidativo, e, provavelmente, participam na proteção dos plastídios contra espécies reativas de oxigênio armazenando ferro livre. Van Wuytswinkel et al. (1998) superexpressaram ferritina de soja sob o controle do promotor CaMV35S em tabaco. Foi observado que as plantas transgênicas tornaram-se mais tolerantes quando submetidas a uma condição de estresse ocasionada pelo herbicida paraquat. Porém, as plantas comportaram-se como deficientes em ferro pelo superacúmulo de ferro nas folhas. Isto sugere que há um ajuste fino na homeostase do metal. Resultados similares foram obtidos superexpressando uma ferritina de soja sob o controle de um promotor específico para a semente de arroz. As folhas das plantas transgênicas apresentaram um decréscimo no conteúdo de ferro quando comparadas com as não-transformadas, confirmando o papel das ferritinas na homeostase do ferro (Qu et al. 2005).

Aspectos biotecnológicos da ferritina em plantas

Alguns autores propuseram o uso da biotecnologia para se tentar aumentar o conteúdo de ferro nas sementes de plantas que servem de alimento para a população mundial. Plantas transgênicas de arroz contendo cDNA de ferritina de soja sob o controle do promotor da glutenina de arroz, que dirige a expressão do gene diretamente na semente, apresentaram um acúmulo de ferro nas sementes três vezes maior quando comparado às plantas não transformadas (Theil et al. 1997; Goto et al., 1999). Lucca et al. (2001) desenvolveram plantas de arroz

superexpressando na semente a ferritina de feijão. Uma questão relevante discutida pelos autores reside na presença do ácido fítico na semente, que dificulta a absorção de ferro. Para contornar isso, foi inserido outro cassete, contendo o gene para a enzima fitase, com o objetivo de degradar o ácido fítico. Foi usado o gene de uma fitase termotolerante de *Aspergillus fumigatus*. Porém, essa estratégia não obteve sucesso uma vez que a enzima foi degradada durante o cozimento dos grãos. Superexpressando o cDNA da ferritina de alfafa. Déak et al. (1999) desenvolveram plantas de tabaco que se tornaram mais tolerantes ao estresse oxidativo ocasionado pelo excesso de ferro e paraquat, e apresentaram resistência a patógenos. Com base nestes resultados, além da função de equilíbrio na homeostase de ferro, a proteína ferritina parece estar envolvida na resposta a fatores abióticos e bióticos, onde um aumento de quantidade da proteína pode ocasionar maior tolerância a esses estresses.

Análise de mutantes e silenciamento gênico como ferramentas na determinação da função gênica em plantas

Uso de mutantes na determinação da função de genes

O uso de mutantes é uma importante ferramenta para a identificação ou a confirmação da função de um gene. Duas abordagens em genética têm sido usadas com este objetivo: uma é a genética direta (“forward genetics”) e a outra é a genética reversa (“reverse genetics”). A genética direta consiste na geração de populações de sementes mutagenizadas com o objetivo da caracterização inicial dos fenótipos mutantes e posterior estudo e localização do loco ou locos gênicos mutados. Já a genética reversa busca elucidar a função de novos genes, cuja seqüência é conhecida, através da identificação de indivíduos com mutações no gene correspondente e observação do fenótipo resultante das mutações. Populações de mutantes contendo genes interrompidos por “etiquetas” (sequências de DNA conhecidas), inseridas ao acaso em diferentes locais no genoma, têm sido usadas tanto em estudos de genética direta quanto de genética reversa. Estas populações são produzidas com o uso de tecnologias modernas, como a geração de plantas transgênicas contendo inserções de DNA (T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*,

elementos Ac/Ds de milho) e ou plantas não transgênicas contendo inserções de DNA por retrotransposição (retroelemento TOS17 de arroz). O conhecimento das seqüências de DNA destes elementos de inserção torna fácil a caracterização da região de inserção por metodologias baseadas em PCR (PCR inversa, TAIL PCR) conjuntamente com metodologias baseadas em sequenciamento de DNA (Ostergaard and Yanofsky, 2004). Uma vez que a eficiência de obtenção de mutantes por recombinação homóloga em plantas é muito baixa (Terada et al., 2002), o uso de mutantes insercionais tem sido considerado como a alternativa disponível mais eficiente (Sallud et al., 2004).

Outra possibilidade é o uso da tecnologia baseada na interferência por RNA ou RNAi. Esta se caracteriza por ser diferente da do nocaute gênico, que consiste na geração de mutantes por uma interrupção física no DNA. Os genes podem ser silenciados ou ter sua expressão diminuída pelo RNA interferente (Fire et al., 1998; Hamilton and Baulcombe, 1999), o que permite a avaliação do fenótipo de indivíduos com silenciamento parcial de genes cujo nocaute seria letal.

Bancos de Mutantes

A disponibilidade de genomas inteiros depositados em bancos de dados demanda ferramentas que possam auxiliar na compreensão da função de cada gene. As duas plantas modelo, *Arabidopsis thaliana* (dicotiledônea) e *Oryza sativa* (monocotiledônea), que se caracterizam pela facilidade de transformação genética e regeneração em cultura de tecidos, tornaram possível a criação de mutantes por diversas metodologias. Determinados elementos de DNA podem ser inseridos em DNAs hospedeiros de forma estável e se constituírem numa ferramenta útil na determinação da função gênica. A utilização de mutantes gerados por inserção de T-DNA, transposons (como os elementos Ac/Ds de milho), retrotransposons (em especial o TOS17 de arroz) e ou mutantes induzidos por raios gama torna possível a análise funcional de cada gene constituinte dos genomas das plantas (Hirochika et al. 2004). Ostergaard e Yanofsky (2004) em seu artigo de revisão citam trabalhos sobre a utilização de linhagens mutantes para revelar a função gênica através da genética direta ou genética reversa. Existem algumas vantagens na utilização de bancos contendo linhagens mutantes: a disponibilidade, em bancos de dados, de seqüências de DNA que flanqueiam o elemento insercional (FST – Flanking

Sequence Tag); a preferência destes elementos insercionais por regiões ricas em genes; mutantes induzidos artificialmente são bons materiais experimentais devido ao “background” genético uniforme comparado com o tipo selvagem; a disponibilidade de vários bancos contendo centenas de linhagens mutantes (An et al., 2003; Miyao et al., 2003; Fu-zhen et al. 2005). Um exemplo é o desenvolvimento de uma coleção contendo mais de 20.000 linhagens de arroz etiquetadas com T-DNA. Apesar do número expressivo de linhagens geradas, dentre estas linhagens há uma probabilidade de 20% de se encontrar um gene etiquetado pelo T-DNA. Isto é, um maior número de linhagens deveria ser gerado para que esta probabilidade aumente (Jeon et al., 2000). Outro exemplo é o banco de mutantes por inserção do retroelemento TOS17, que conta com mais de 50.000 linhagens. Este banco disponibiliza além das FSTs, outros dados relevantes como mapeamento cromossômico da mutação, sugestão da seqüência de oligonucleotídeos para análise molecular por PCR da linhagem mutante, imagens revelando o fenótipo da linhagem mutante, protocolo da cultura de tecidos pelos quais os mutantes foram gerados (Miyao et al., 2006).

Recentemente, foi publicado um banco de dados, denominado OryGenesDB, (Figura 6) que procurou unificar e tornar mais otimizado o acesso às informações contidas nos bancos de mutantes. Esta base de dados congrega diferentes bancos de mutantes, contendo mais de 44.000 FSTs geradas pelos vários métodos de obtenção de mutantes para as espécies modelo do arroz e *Arabidopsis*. O usuário tem acesso a várias informações: mapeamento da FST, modelos de predição de genes baseados em ferramentas de bioinformática, seqüências de cDNAs, mapas baseados em marcadores moleculares e outras informações (Droc et al., 2006).

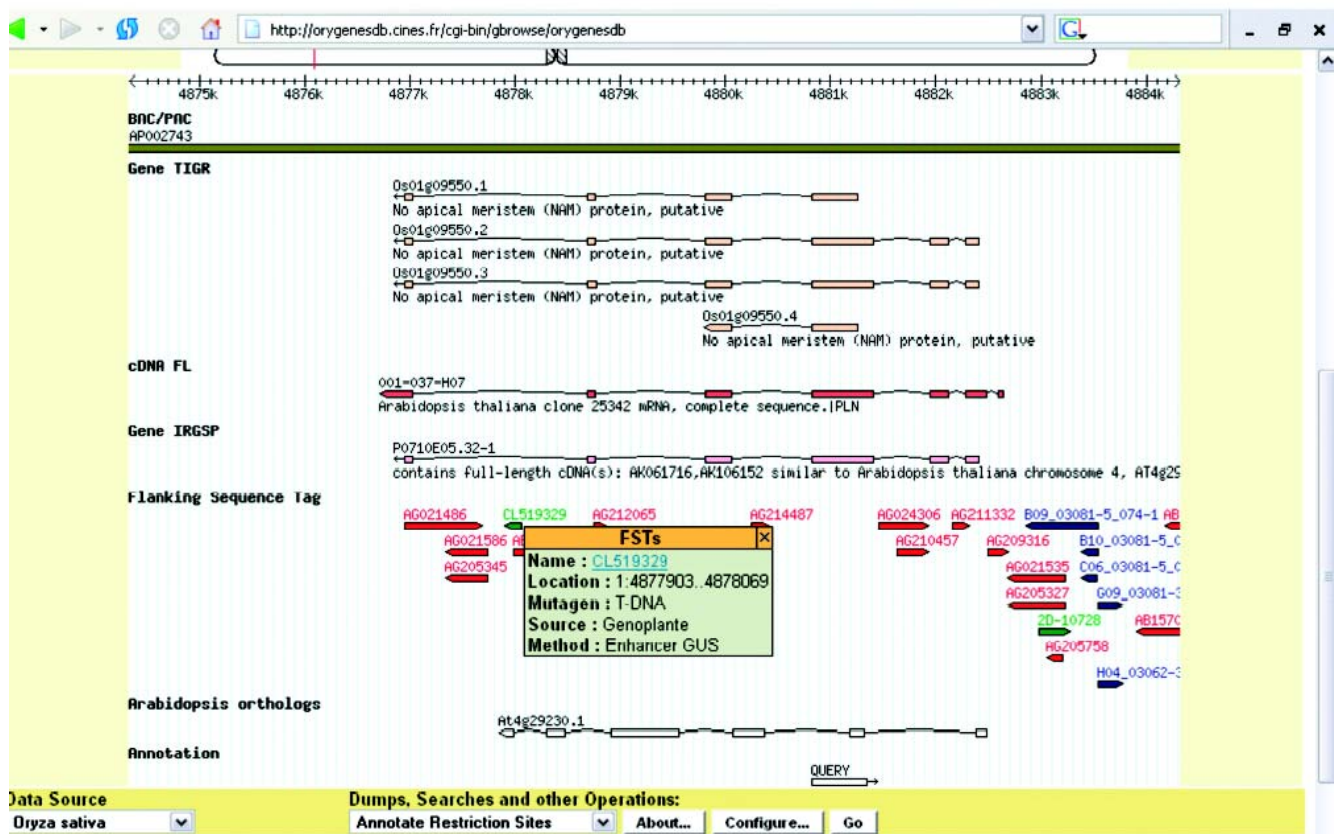


Figura 6. Resultado de uma busca no OryGenesDB. As setas em vermelho, verde e azul representam inserções TOS17, T-DNA e Ac/Ds, respectivamente. Modificado de Droc et al. (2006).

RNA interferente

Plantas transgênicas com expressão gênica silenciada pela utilização de RNAi (RNAs interferentes) também vêm sendo utilizadas amplamente como uma ferramenta na determinação da função gênica. O mecanismo básico reside na inserção de um transgene que, quando transcrito, gera um RNA em grampo (hairpin RNA) ou um RNA antisense complementar ao RNA senso endógeno. Estes RNAs formam dsRNAs (RNAs dupla fita), que são reconhecidos por uma enzima que os degrada (Rnases Tipo III – Dicer Like, Argonoute, Drosha). O produto de degradação gera pequenos RNAs de 20 – 25 nucleotídeos de tamanho que recrutam um complexo protéico (RISC – RNA Interference Silencing Complex) para o reconhecimento de mRNAs alvo, que são posteriormente clivados. Portanto, com base neste mecanismo, plantas transgênicas podem ser geradas para se silenciar qualquer gene alvo, desde que se conheça a seqüência do mesmo (Miyoshi et al. 2003; Chen et al. 2003; Ogita et al. 2004; Gilissen L J W J et al. 2005; Moritoh et al.

2005). A principal vantagem da geração de plantas transgênicas contendo inserções estáveis para silenciar genes reside no fato de que o fenótipo gerado pelo silenciamento pode ser transmitido às gerações seguintes (Kerschen et al. 2004).

CAPÍTULO I

**(artigo a ser publicado em periódico científico
indexado)**

Posttranscriptional gene silencing of two ferritin genes in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare) using RNAi

Júlio César de Lima, João Braga Abreu-Neto, Felipe Karan Teixeira, Márcia Margis-Pinheiro (corresponding author), Janette Palma Fett.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Centro de Biotecnologia

Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves 7500

Porto Alegre, RS, Brasil

PO Box 15005

+ 55 51 33087637

Fax: + 55 51 33087309

e-mail: marcia.margis@terra.com.br

Abstract In the plant iron interaction context the protein ferritin seems to play an important role since this protein can accumulate iron in a safe and biological available form. Besides, ferritin has its expression modulated by several biotic and abiotic factors. In the rice genome two copies of the encoding ferritin genes were identified. RNAi has been largely used to downregulate gene expression and study gene function. In order to understand the ferritin functional role in rice plants we made use of the RNAi methodology to develop stable transgenic rice lines silenced in both copies of the ferritin genes. This construct was used to generate five stable and independent transgenic lines. The Gateway system (Invitrogen) was used to obtain a construct designed to generate the hairpin transcript. Our results showed that we had a 75% success in generating rice silenced plants against ferritin. The primary transformants (T0) had no clear morphological abnormalities. We discuss if a compensatory pathway to store iron in a safe form could be occurring when levels of ferritin are downregulated. These transgenic lines represent an important tool to study further the physiology of rice in the iron-plant context.

Introduction

Iron is essential for virtually all living organisms. But if the ferrous (Fe^{+2}) and or ferric (Fe^{+3}) forms remain free in the cellular environment, it can react with oxygen species like H_2O_2 through Fenton reaction and generate hydroxyl radicals (a reactive oxygen species) that are extremely harmful. The protein ferritin has an important role in the iron homeostasis metabolism. This protein can accumulate up to 4500 iron atoms per molecule in a soluble, nontoxic and bioavailable form (Briat and Lobréaux, 1997). In plants, the ferritin protein localizes to the chloroplast (Seckbach, 1982) and there is evidence for its occurrence in the mitochondria (Zancani et al. 2004). The ferritin gene family is conserved from prokaryotic until complex eukaryotic organisms like mammals and plants. There are a different number of ferritin genes in plant genomes: *Arabidopsis thaliana* has four copies (Petit et al. 2001), *Vigna unguiculata* has three copies (Wicks and Entsch, 1993), *Zea mays*, *Nicotiana benthamiana* and *Oryza sativa* have two copies (Fobis-Loisy et al. 1995; Jiang 2005; Gross et al. 2003). Several studies indicate that the expression of ferritin genes are differentially regulated during stress response in plants (Kimata and Theil, 1994; Fobis-Loisy et al. 1995; Déak et al. 1999; Petit et al. 2001; Dellagi et al. 2005; Arnaud et al. 2006). These works reveal that these genes have their expression modulated in response to iron excess, abscisic acid, H_2O_2 , pathogens and nodule development in plants. However, in rice, there are few functional studies related to the differential expression of the ferritin genes in response to abiotic and biotic stresses (Rabani et al. 2003; Parker et al., 2006). Hence, functional genomic tools must be launched to study the role of these genes in the iron-plant context in rice.

With the discovery of the RNA silencing mechanism (Fire et al., 1998; Hamilton and Baulcombe, 1999), an additional genomic tool based on RNAi has been used to study gene function. According to Miki et al. (2005) RNA silencing can be used as a complement to existing tagged lines to suppress the expression of members of a gene family. Successful studies have been reported using RNA interference to block gene expression post-transcriptionally and characterize the resulting phenotype (Waterhouse et al, 1998; Chuang and Meyerowitz, 2000; Waterhouse and Helliwell, 2003; Ivanov et al, 2004; Moritoh et al, 2005; Watson et al. 2005).

Transgenic plants designed to generate hairpin RNAs and anti-sense RNAs have been developed to silence gene expression efficiently (Miyoshi et al. 2003; Chen et al. 2003; Ogita et al. 2004; Gilissen L J W J et al. 2005; Moritoh et al. 2005). According to Wesley et al (2001) intron hairpin RNAs are more effective than anti-sense constructs to silence a gene in transgenic silenced plants. They developed a construct based on a recombinase system, the gateway system, to generate the silencing vector that can be used in a high-throughput manner.

At present, there are few reports in the literature that used the RNAi approach to silence the ferritin gene (Ferreira et al. 2000; Cozzi et al. 2004). In plants, there are no reports of successful ferritin gene silencing until now. Here we describe the development of five stable transgenic silenced lines for the ferritin gene using the *japonica* rice Nipponbare variety.

Materials and methods

Plant Material

Rice embryogenic calli (*Oryza sativa* L. ssp *japonica* cv. Nipponbare) were induced from seeds and cultivated in NB media (Chu, 1975) at 25° C in the dark. Those calli were used in the transformation essays.

Transgenic and non-transgenic plants were cultivated in the SOLOMAX substrate in a greenhouse at a temperature of 25°C, 16 h light/8h dark, 70% of humidity.

Construct design and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1

A fragment of 290 bp corresponding to an exon region that is highly similar (Fig. 1) in both rice ferritin gene copies was amplified by PCR from a cDNA clone (GenBank Ac. No AF519570), using oligonucleotides containing part of the AttB site: AttB 1: 5'AAAAAGCAGGCTCCCATGCTTCCTCCTAGGGTTG3'; AttB 2: 5'AGAAAGCTGGGTCCTTGATCTGCTCGTTGATGG3'. PCR reaction mix: 2.5 µl of 10X PCR buffer (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0.75 µl of 50 mM MgCl₂, 0.5 µl of 10 mM dNTP mix, 0.5 µl of each oligonucleotide at 10 µM, 0.2 µl of Platinum Taq (5 U/µl) and 50 – 100 ng of genomic DNA in a 25 µl reaction. PCR amplification

protocol: 94°C for 5min; followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min; and a final extension temperature of 72° for 10 min. The PCR product was purified from an agarose gel using a purification kit (GE Healthcare). A second PCR reaction was done to complement the AttB sites with the oligonucleotides: AttB 3: 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT3' and AttB 4: 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT3'. PCR reaction was similar to the first amplification round. PCR protocol: 94°C for 5 min; followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 47°C for 1 min, 72°C for 1 min; and a final extension temperature of 72° for 10 min. The PCR fragment containing the complete AttB sites was purified using the same procedure mentioned above and 20 to 50 ng of this product was mixed with 50 to 100ng of the pENTR vector (BP recombination reaction). Competent *E. coli* XL1 blue were electroporated and seeded on Kanamycin (25µg/ml) LB agar plates.

The pANDA vector (Miki and Shimamoto, 2004) was used as the destination vector, to generate the final vector using the Gateway technology (Invitrogen). For that, 50 ng of pENTROsFERi vector was recombined (LR recombination reaction) with 100 ng of the pANDA vector to generate the pANDAOsFerRNAi vector. Competent *E. coli* XL1 blue were electroporated and seeded on hygromycin (50 µg/ml) LB agar plates. PCR was done to check the gateway cloning using oligonucleotides HPT 1: 5' GAGCCTGACCTATTGCATCTCC 3' and HPT 2: 5' GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG 3' for the hygromycin phosphotransferase gene ; oligonucleotides GUS Linker 1: 5' CATGAAGATGCGGACTTACG 3' and oligonucleotides GUS Linker 2: 5' ATCCACGCCGTATTCGG 3' for the GUS gene and oligonucleotide Fer1 and Fer2 for the ferritin gene. Transformation by heat shock of *A. tumefaciens* AGL1 strain was done using 500ng to 1 µg of the pANDAOsFerRNAi to 200 µl of competent cells: this mix was frozen for 5 min in liquid nitrogen and thawed at 37°C. Twenty-five min later, cells were transferred to a new tube containing 1 ml of LB medium and incubated at 28° C for 3 h at 300 rpm. Cells were centrifuged right after for 3 min at 8,000 rpm. The pellet was resuspended in 400 µl of LB medium and the resuspension was seeded on rifampicin (100 µg/ml), kanamycin (25 µg/ml) and hygromycin (50 µg/ml) LB agar plates. Plates were incubated for 3 to 5 days at 28 to 30° C. PCR was done to check the recombination efficiency using HPT, GUS linker and ferritin oligonucleotides before rice calli transformation.

Transformation of rice calli and regeneration of transgenic rice plants

Transgenic plants were obtained using a protocol based on Hiei et al. (1994) and Upadhyaya et al. (2000) with some modifications: *A. tumefaciens* containing the destination vector was incubated with rice embryogenic calli in 25 ml of liquid NB medium with 100 mM acetosyringone for 15 min. Rice calli were co-cultivated with *A. tumefaciens* for three days at 30° C in NB medium containing acetosyringone. After, rice calli were washed five times in sterilized water containing timentin (260mg/L). Calli were plated in NB media containing hygromycin (50 µg/ml), timentin (150 µg/ml) and claphoram (200 µg/ml) and incubated at 30° C for thirty days under dark. Healthy and grown calli were transferred to pre-regeneration media and grown at 30° C in the dark. After 14 days, calli were transferred to the regeneration media and incubated in a growth chamber with a photoperiod of 25± 1°C under fluorescent light at an intensity of 22.5 µEm⁻².s⁻¹ and 16 h light period for about thirty days. Well-rooted plantlets were selected in half strength MS media containing hygromycin (50 µg/ml) for 12 to 14 days. Healthy grown plants were transferred to vermiculite and covered with a plastic bag. After two weeks, plants were transferred to the soil.

Screening of positive transgenic rice plants

Total DNA from leaves was extracted using the CTAB reagent (2% CTAB; 20 mM EDTA pH 8.0; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 1% 40,000 PVP) and cold absolute isopropanol to precipitate the DNA (Doyle and Doyle, 1987). PCR was performed using oligonucleotides HPT 1 and HPT 2. PCR reaction: 2.5µl of 10X PCR buffer (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0.75 µl of 50 mM MgCl₂, 0.5 µl of 10 mM dNTP mix, 0.5 µl of each oligonucleotide at 10 µM, 0.2 µl of Platinum Taq (5 U/µl) and 50 to 100 ng of DNA in a 25 µl reaction. PCR protocol: 94°C for 5 min; followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, 53°C for 30 s, 72°C for 30 s; and a final extension of 5 min at 72°C.

Quantification of ferritin expression in the transgenic rice lines by real time PCR and semi quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from leaves according to the Trizol protocol (Invitrogen). The cDNA was synthesized using the reverse transcriptase from the M-MLV according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). To investigate the level of expression of the ferritin genes in the transgenic rice lines we used the oligonucleotides listed on Table 1. The ubiquitin (*OsUbg 1* and *2*), FDH (*OsFDH 1* and *2*) and elongation factor oligonucleotides (*OseEF α 1* F and R) were used to normalize the mRNA amount present in the samples. In the semi-quantitative analysis we used the *OsACT1* R and F oligonucleotides to normalize the ferritin expression results. Semi-quantitative RT-PCR conditions were: 94°C for 5 min; followed by the adequate number of cycles for each gene (*OsFer* and *OsAct*) at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension temperature of 72° C for 5 min.

For the real time PCR analysis, Sybr Green and the ABI 7700 sequence detector were used to perform the qRT-PCR reactions. The PCR conditions were: 94°C for 5 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s.

Results

Development of the construct to produce an hpRNA directed against the ferritin genes

To investigate the *in vivo* function of the rice ferritin genes, we produced a hairpin construct driven by the ubiquitin promoter targeted to both copies of ferritin genes. We have used the pANDA plasmid (Miki and Shimamoto 2004) as the destination vector. The final vector (pANDAOsFeri) was obtained using the gateway system (Invitrogen). In the first step we performed the *in vitro* recombination of a 290bp PCR fragment amplified from a ferritin cDNA clone containing the *AttB* sites (Figure 1) with the pENTR vector (Invitrogen) generating the plasmid pENTRFerRNAi. In the second step the *in vitro* recombination between the pENTRFerRNAi with the destination vector pANDA generated the pANDAOsFerRNAi vector (Figure 2). The success of recombination was checked by PCR using *hpt*, *gus* and *OsFer 1* and *2* specific oligonucleotides. The final plasmid was transferred to *Agrobacterium* that was used for plant transformation (Figure 3).

The pENTRFerRNAi clone was sequenced to confirm that the 290bp fragment had recombined with the pENTR vector (data not shown).

Production of transgenic rice lines

We obtained five transgenic lines containing the hairpin gene targeted to the rice ferritin genes using a well-established method to regenerate transgenic rice plants from embryogenic calli co-cultivated with *Agrobacterium* (Hiei et al., 1994; Uphadyaya et al., 2000). During the tissue culture procedure two rice calli selections in selective NB media were made. From the first selection, 70 independent rice calli were obtained and from these, during the second selection, only 35 multiplied well in selective NB media. Only five out of 35 hygromycin-resistant calli lines regenerated into plants. All regenerated plants were tested by PCR using HPT oligonucleotides and all were positive for the hpRNA transgene (Figure 4).

A non-transformed plant (NT) that was regenerated according to the same tissue culture procedure was used as a negative control (Figure 4). Although we obtained transgenic ferritin silenced lines, we have not observed clear morphological abnormalities in the plants compared to the non-transformed control.

Level of expression of the ferritin genes

We have checked the level of ferritin expression in the silenced lines by semi-quantitative RT-PCR analysis. According to the preliminary results obtained (Figure 5), three lines had a lower ferritin expression level when compared to the non-transformed plant. The other two lines did not show reduction in the expression level of the ferritin genes. qRT-PCR analysis is being carried out to confirm the reduction of ferritin mRNA expression levels in these transgenic silenced lines.

Discussion

Regeneration of stable transgenic silenced rice lines

The pANDA vector constitutes an efficient tool for high-throughput analysis of gene function (Miki and Shimamoto, 2004). It contains the maize ubiquitin promoter with an intron upstream of the inverted repeats (IR), which has been shown to give high expression of foreign genes in transgenic rice (Uchimiya et al. 1993; Shirasu et al. 1999; Hayama et al. 2003). The ease and convenient manipulation of the gateway system (Wesley et al. 2001) led us to develop the pANDAOsFerRNAi to silence the rice ferritin genes using the pANDA vector as the destination plasmid (Figures 2 and 3). Therefore, based on this technology and on the protocol described by Hiei et al. (1994) we have obtained stable transgenic lines carrying the pANDAOsFeri construct.

Our results showed that three two five transgenic rice lines had downregulated levels of ferritin mRNA (Fig 5 and 6). We suggest that the transgenic rice line 3 was not silenced because we could not detect the hairpin expression in this line using the GUS oligonucleotides in the RT-PCR analysis (data not shown). Therefore, if the hairpin is not expressed, one could not expect any level of silencing. Although we had a small number of plants to analyze and we still have to confirm this analysis, we had a 60% of success (based on three silenced plants out of five). Our results are in accordance with previous reports from the literature (Table 2). Although there are few published works using the kind of construct and vector we did, they showed high efficiency of gene silencing. The results obtained by Miki et al. (2005) using this kind of constructs in transgenic rice plants showed a high level of gene silencing both for individual genes and for simultaneous suppression of multiple members in the Rac/ Rop-type ATPase gene family. Furthermore, it was found that *Os8N3* is the gene involved in the susceptibility interaction between rice and *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae* strain PXO99^A. Challenging the bacterial pathogen against rice leaves of transgenic *Os8N3* silenced lines containing an intron hairpin construct, the authors obtained resistant plants (Yang et al. 2006).

In accordance with the literature, our research group has been generating transgenic silenced plants using intron hairpin constructs with high efficiency for other genes either (Dr. Márcia Margis -Pinheiro - personal communication).

Gene silencing of the rice ferritin genomic copies

To silence the two rice ferritin encoding genes we developed a construct containing a DNA trigger from an exon region that is identical on both copies (Fig 1b.). According to the literature, each specific member of a gene family can be silenced by choosing non-conserved gene regions (UTR regions) and or choosing a very conserved gene region to silence as many genes in the family as possible (Miki et al. 2005). The silencing of both rice ferritin genomic copies would avoid probable compensatory effects of one gene expression in relation to the other. On the other hand, it seems to be very difficult to design a silencing DNA trigger for each rice ferritin copy alone, since both copies are extremely similar (Fig 1b; Gross et al. 2003; Yu et al. 2005).

There are no reports of efficient ferritin gene silencing in plants. In mouse, ferritin gene deletion of the H subunit causes embryonic lethality (Ferreira et al., 2000). In HeLa cells, ferritin gene silencing by transient expression of siRNA against mRNA ferritin molecules modified cellular iron availability and reduced resistance to oxidative damage induced by iron (Cozzi et al., 2004). The ferritin protein has the important activity of ferroxidase, which oxidizes iron from the dangerous ferrous form (Fe^{+2}) to the ferric form (Fe^{+3}). Another role of ferritin is that it can accumulate iron in a safe and bioavailable form (Briat and Lobréaux, 1997). Therefore, an increase in the intracellular labile iron pool due to the lack of ferritin could lead to molecule (protein, DNA, and others) and tissue serious damage, caused by the production of reactive oxygen species (ROS) catalyzed through the Fenton reaction. We expect that, in plants, results similar to the ones obtained in mice and HeLa cells could be found when silencing ferritin. However, since we found no clear morphological abnormalities in the silenced plants, we should investigate if other cellular mechanisms involved in the storage of iron could compensate for the lack or downregulation of the protein ferritin. Recently, an ortholog of CCC1 of yeast was cloned in *Arabidopsis* (*AtVIT1* – vacuolar iron transporter). Although it was found that *AtVIT1* has a lower expression throughout the plant when compared to the seeds, it has an important role in transporting iron into the vacuoles (Kim et al., 2006). Thus, we speculate that when ferritin expression is downregulated, a change in the pathway transport to store iron in ferritins could lead to the accumulation of iron into the vacuoles.

On the other hand, since ferritin genes have their expression modulated in response to several biotic and abiotic factors (Fobis-Loisy et al. 1995; Déak et al.

1999; Petit et al. 2001; Dellagi et al. 2005; Arnaud et al. 2006), it would be important to further compare the transgenic plants either under stress or in non-stressed conditions. Therefore, the plants generated in this work constitute a useful tool to characterize the physiology of rice in the iron-plant context.

Acknowledgments

We thank Dr. Rogério Margis for critical review of the manuscript and Dr. Daisuke Miki for the pANDA vector. We also thank the support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), Centro Internacional para Agricultura Tropical (CIAT).

References:

Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression. *J Biol Chem* 281: 23579 - 23588

Briat, J-F and Lobréaux, S. (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci* 2: 187 – 193

Chen J, Tang W-H, Hong M-M, Wang Z-Y (2003) *OsBP-73*, a rice gene, encodes a novel DNA-binding protein with a SAP-like domain and its genetic interference by double stranded RNA inhibits rice growth. *Plant Mol Biol* 52: 579 - 590

Chuang C-F and Meyerowitz E M (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* *Proc Natl Acad Sci* 97: 4985 – 4990

Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Biasiotto, Arosio P (2004) Analysis of the biologic functions of H- and L-ferritin in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: evidence for a proliferative role of L-ferritin *BLOOD* 103: 2377 - 2383

Déak M, Horváth G V, Davletova S, Török K, Sass L, Vass I, Barna B, Király, Dudits D (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature* 17: 192 - 196

Dellagi A, Rigault M, Segond d, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat J-F, Gaymard f, Expert D (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J* 43: 262 – 272

Doyle J J, Doyle J L (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 1 – 15

Ferreira C, Bucchini D, Martin M-E, Levi S, Arosio P, Grandchamp, Beaumont C (2000) Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem* 275: 3021 – 3024

Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* *Nature* 391: 806 - 811

Fobis-Loisy I, Loridon K, Lobréaux S, Lebrun M, Briat J-F (1995) Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *Eur J of Biochem* 231: 609 – 619

Gilissen L J W J, Bolhaar S T H P, Matos C I, Rouwendal G J A, Boone M J, Krens F A, Zuidmeer L, van Leeuwen A, Akkerdaas J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst A C, Bosch D, van de Weg E, van Ree R (2005) Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 364 - 369

Gross J, Stein R J, Fett-Neto A, Fett J P (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Mol Biol* 26: 477 – 497

Hamilton A J and Baulcombe D C (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950 – 951

Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422: 719 - 722

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271 - 282

Ivanov A J, Rovescalli A C, Pozzi P, Yoo S, Mozer B, Li H-S, Yu S-H, Higashida H, Guo V, Spencer M, Nirenberg M (2004) Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci* 101: 16216 - 16221

Jiang T-B (2005) Isolation and expression pattern analysis of two ferritin genes in tobacco. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 477 – 486

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

Kimata Y, Theil EC (1994) Posttranscriptional regulation of ferritin during nodule development in soybean. *J Plant Physiol* 104: 263 - 270

Miki D, Itoh R, Shimamoto K (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *J Plant Physiol* 138: 1903 - 1913

Miki D and Shimamoto K (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiol* 45: 490 - 495

Miyoshi K, Ito Y, Serizawa A, Kurata N (2003) *OsHAP3* genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant J* 36: 532 – 540

Moritoh S, Miki D, Akiyama M, Kawahara M, Izawa T, Maki H, Shimamoto K (2005) RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGEN-like), a new member of the RAD/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice. *Plant and Cell Physiol* 46: 699 - 715

Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, Sano H (2004) Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol* 54: 931 – 941

Parker R, Flowers T J, Moore A L, Harpham N V J (2006) An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *J Experimental Bot* 57: 1109 – 1118.

Petit J-M, Briat J-F, Lobréaux S (2001) Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* gene family. *Biochem J* 359: 575 – 582

Rabani M A, Maruyama K, Abe H, Kan M A, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses *J Plant Physiol* 133: 1755 - 1767

Seckbach, S. (1982) Ferriting out the secrets of plant ferritin. *J of Plant Nutrition* 5: 389 – 394

Shirasu K, Nielsen K, Piffanelli P, Oliver R, Schulze-Lefert P (1999) Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. *Plant J.* 17: 293 – 299

Uchimiya H, Iwata M, Nojiri C., Smarajeeva PK, Takamatsu S., Ooba S., Anzai H, Christensen AH, Quail PH, Toki S (1993) Biolophos treatment of transgenic rice plants expressing a bar gene prevents infection by the sheat blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Bio/Technology* 11: 835 – 836

Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schünmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM, Wang M – B (2000) Agrobacterium-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Aus J Plant Physiol* 27: 201 - 210

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and anti-sense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959 – 13964.

Waterhouse P and Helliwell C A (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing *Nature* 4: 29 – 38

Watson J M, Fusaro A F, Wang M, Waterhouse P (2005) RNA silencing platforms in plants *FEBS Letters* 579: 5982 - 5987

Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M, Rouse D T, Liu Q, Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581 – 590

Wicks R E and Entsch B (1993) Functional genes found for three different plant ferritin subunits in the legume *Vigna unguiculata* *Biochemi and biophys res commun* 192: 813 – 819.

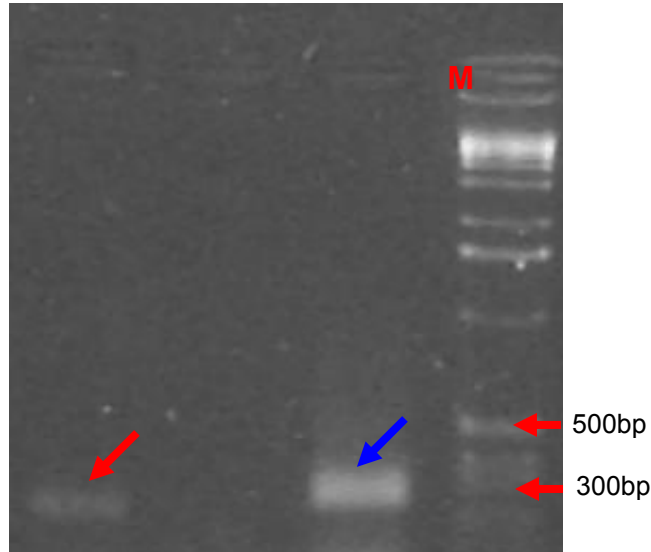
Yang B, Sugio A, White F F. (2006) *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight in rice. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 103: 10503 – 10508.

Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J, Ni P, Dong W, Hu S, Zeng C, Zhang J, Zhang Y, Li R, Xu Z, Li S, Li X, Zheng H, Cong L, Lin L, Yin J, Geng J, Li G, Shi J, Liu J, Lv H, Li J, Wang J, Deng Y, Ran L, Shi X, Wang X, Wu Q, Li C, Ren X, Wang J, Wang X, Li D, Liu D, Zhang X, Ji X, Zhao W, Sun Y, Zhang Z, Bao J, Han Y, Dong L, Ji J, Chen P, Wu S, Liu J, Xiao Y, Bu D, Tan J, Yang L, Ye C, Zhang J, Xu J, Zhou Y, Yu Y, Zhang B, Zhuang B, Wei H, Liu B, Lei M, Yu H, Li Y, Xu H, Wei S, He X, Fang L, Zhang Z, Zhang Y, Huang Y, Su Z, Tong W, Li J, Tong Z, Li S, Ye J, Wang L, Fang

L, Lei T, Chen C, Chen H, Xu Z, Li H, Huang H, Zhang F, Xu H, Li N, Zhao C, Li S, Dong L, Huang Y, Li L, Xi Y, Qi Q, Li W, Zhang B, Hu W, Zhang Y, Tian X, Jiao Y, Liang X, Jin J, Gao L, Zheng W, Hao B, Liu S, Wang W, Yuan L, Cao M, McDermott J, Samudrala R, Wang J, Ka-Shu Wong J, Yang H (2005) The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. PLOS Biol 3: 266 - 281

Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urban A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macri F. (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. Eur J of Biochem 271: 3657 – 3664

A



B

OsFer1	1	-----GC	GACTC	CGGA	AGCAA	AGCC	ACAC	GGCC	T-----	---TCCG	TA TG TTCTCTC	TGGGTTGCC																	
OsFer2	1	ctcttcaacc	gcgcgccc	GAACTC	CGGA	ACCGAA	AGCC	ACAC	GCCCT	Tcctctcact	taaTCCG	TA TG TTCTCTC	TGGGTTGCC																
OsFer1	61	CCg-----	-----GCCG	CGCCG	CGCC	CGCCCT	ACT	ATCTC	CGCC	CGCCGCT	CG	ACCCTG	GTT	CGCTC	TGGCT	GCCTG	TGCCG												
OsFer2	91	CCctcctctc	tgyccGCCG	CGCCG	CGCCG	CGCCCT	ACT	ATCTC	CGCC	CGCCGCT	CG	ACCCTG	GTT	CGCTC	TGGCT	GCCTG	TGCCG												
OsFer1	139	CCTGgCGCC	GACCCgGCG	ACTGTG	CAGG	GCCCG	CGGG	AAGGA	AGGA	GGTGCT	CAGC	GCGT	GGTCT	TCCAG	CCATT	CGAGG	AGCTC												
OsFer2	181	CCTGCaGCC	GAGCCgGCG	ACTGTG	CAGG	GCCCG	CGGG	AAGGA	AGGA	GGTGCT	CAGC	GCGT	GGTCT	TCCAG	CCATT	CGAGG	AGCTC												
OsFer1	229	AAGGGG	GAGC	TCTCC	TCTG	CCCCA	AGG	AAG	GAC	CAGT	CCTC	TGG	TAG	GCAAAA	AGTTC	GTCG	AGCAGT	GCGAG	GGCG	CTTCAaCGAG									
OsFer2	271	AAGGGG	GAGC	TCTCC	TCTG	CCCCA	AGG	AAG	GAC	CAGT	CCTC	TGG	TAG	GCAAAA	AGTTC	GTCG	AGCAGT	GCGAG	GGCG	CTTCAgCGAG									
OsFer1	319	CMGATCAATG	TGGAGT	TCAA	TGCAT	CGTAC	CGCT	TAC	CACT	CCCTTT	TCCG	CTACT	TTGAT	CGT	GACA	ACG	TTGCT	CTCAA	GGGAT	TCGCC									
OsFer2	361	CMGATCAATG	TGGAGT	TCAA	TGCAT	CGTAC	CGCT	TAC	CACT	CCCTTT	TCCG	CTACT	TTGAT	CGT	GACA	ACG	TTGCT	CTCAA	GGGAT	TCGCC									
OsFer1	409	AAATTC	TTCA	AAGAAT	CCAG	CGATG	AGG	AGG	GAT	CACG	CAG	GAA	AACT	CAT	CAACT	AC	GAG	AATGC	GTG	GAG	CCAG	GGT	CG	GGCTC					
OsFer2	451	AAATTC	TTCA	AAGAAT	CCAG	CGATG	AGG	AGG	GAT	CACG	CAG	GAA	AACT	CAT	CAACT	AC	GAG	AATGC	GTG	GAG	CCAG	GGT	CG	GGCTC					
OsFer1	499	CAGTCC	ATCG	TCACAC	ctTT	CACAG	AGTTC	GACCAT	CCCTG	AGAA	AGGG	GGA	TGCC	CTT	CTAT	GGAT	TGCC	TTGCC	TCTCG	AAAAG									
OsFer2	541	CAGTCC	ATCG	TCACAC	ctTT	CACAG	AGTTC	GACCAT	CCCTG	AGAA	AGGG	GGA	TGCC	CTT	CTAT	GGAT	TGCC	TTGCC	TCTCG	AAAAG									
OsFer1	589	CTTG	TAAATG	AGAAGT	TCGA	CAACCT	GCAC	ACTGT	GCCAT	CAAG	GTCAA	TGAT	TCCAC	AG	CTG	ACC	CGACT	TCGT	TGAG	AG	CGAAT	TC	CTT						
OsFer2	631	CTTG	TAAATG	AGAAGT	TCGA	CAACCT	GCAC	ACTGT	GCCAT	CAAG	GTCAA	TGAT	TCCAC	AG	CTG	ACC	CGACT	TCGT	TGAG	AG	CGAAT	TC	CTT						
OsFer1	679	GAGG	AGCAGG	TTCAAG	CCAT	CAAGAA	GATC	TCTG	ACTATG	TGCC	CCAGCT	GACA	AGAGT	G	GA	AGG	GGC	ATG	GGT	GTC	GC	ACT	TT	GAT					
OsFer2	721	GAGG	AGCAGG	TTCAAG	CCAT	CAAGAA	GATC	TCTG	ACTATG	TGCC	CCAGCT	GACA	AGAGT	G	GA	AGG	GGC	ATG	GGT	GTC	GC	ACT	TT	GAT					
OsFer1	769	CAGA	AGCTGC	TTGAG	GAAG	AGCTT	GAATG	GAGG	AGACTG	TGT	GAAG	GGC	AGT	AGT	AGGT	TT	CGTT	TTCTT	CCAT	CCATG	GAT	CA	TC	CAG					
OsFer2	811	CAGA	AGCTGC	TTGAG	GAAG	AGCTT	GAATG	GAGG	AGACTG	TGT	GAAG	GGC	AGT	AGT	AGGT	TT	CGTT	TTCTT	CCAT	CCATG	GAT	CA	TC	CAG					
OsFer1	859	CTAA	AGAAAG	AAAATA	AACTC	GAGT	CTGTCT	ATT	CATCAA	TTA	AGC	AGC	ACT	AGCA	ATG	CAGT	GAATGA	ACCA	ACCAAT	TTG	GT	CAT	GA						
OsFer2	901	CTAA	AGAAAG	AAAATA	AACTC	GAGT	CTGTCT	ATT	CATCAA	TTA	AGC	AGC	ACT	AGCA	ATG	CAGT	GAATGA	ACCA	ACCAAT	TTG	GT	CAT	GA						
OsFer1	949	ACTT	CCCCCT	GTG	TCTAG	CTAG	TAGCT	TC	AGAA	TCA	T	GT	TAT	GT	CG	CTC	CTCG	CAG	AAA	AGGA	AC	AT	GG	GGC	GCT	GG	CT	GT	A
OsFer2	991	ACTT	CCCCCT	GTG	TCTAG	CTAG	TAGCT	TC	AGAA	TCA	T	GT	TAT	GT	CG	CTC	CTCG	CAG	AAA	AGGA	AC	AT	GG	GGC	GCT	GG	CT	GT	A
OsFer1	1039	CGG	TACTTC	TGAT	ATTCTG	GCT	ATGCATG	GACT	CACTGGT	GAT	GGT	GTAT	TTT	GGG	-GC	ATT	TAC	ACCT	TTG	TTG	CTAC	AG	GAT	TTTC					
OsFer2	1081	CGG	TACTTC	TGAT	ATTCTG	GCT	ATGCATG	GACT	CACTGGT	GAT	GGT	GTAT	TTT	GGG	CaC	ATT	TAC	ACCT	TTG	TTG	CTAC	AG	GAT	TTTC					
OsFer1	1128	CTGG	CAGCCA	ATA	AGGA	CA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----					
OsFer2	1171	CTGG	CAGCCA	CTA	AGGA	CA	gtat	gata	aat	ccatt	gtggt	gtaa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----					

Fig 1. Electrophoretic analysis of a ferritin DNA PCR product and alignment of full length cDNA clones. These ferritin cDNA clones have 96% of nucleotide identity. **a** Electrophoretic analysis of the 290 bp PCR fragment from the cDNA clone containing the *AttB* sites. Red arrow: PCR fragment from the first PCR reaction. Blue arrow: PCR fragment from the second PCR reaction with the complete *AttB* sites. M: 1Kb Ladder. **b** Alignment of full length cDNA clones for *OsFer1* (GenBank Acc. No AF519570) and *OsFer2* (GenBank Acc. No AF519571) using the *Genomatix diAlign* software (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>). Sequences in red correspond to the oligonucleotide annealing sites. Polymorphic positions between *OsFer1* and *OsFer2* are in lowercase letter. Blue square: translation start codon.

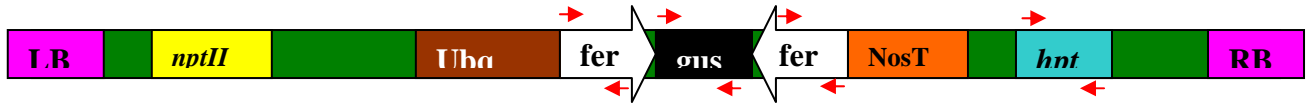


Fig 2. Illustrative scheme of the construct within the T-DNA borders to silence *OsFer 1* and *2* of rice. **nptII**: gene to confer resistance to Kanamycin. **Uba**: ubiquitin promoter; **white arrows**: ferritin fragment in the sense and anti-sense orientation; **Gus**: linker to form the loop; **NosT**: terminator sequence; **hpt**: gene to confer resistance to Hygromycin; **LB** and **RB**: left and right borders of the T-DNA. The red arrows indicate the annealing sites for the oligonucleotides.

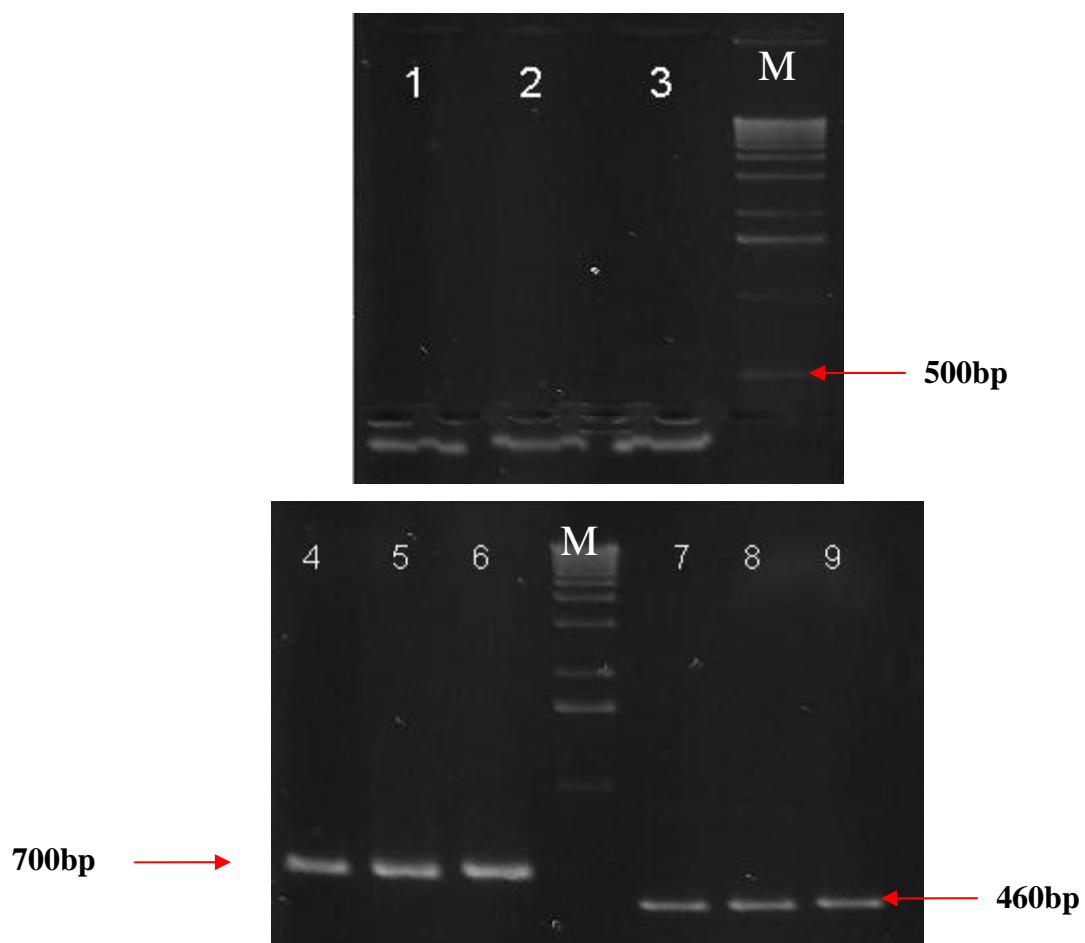


Fig 3. Electrophoretic DNA analysis of PCR products in 1% agarose gel of bacterial clones containing the pANDAOsFERi. **Lanes 1 to 3**: 290bp fragment from the rice ferritin gene. **Lanes 4 and 5**: *gus* fragment. **Lanes 7 and 8**: *hpt* fragment. **Lanes 6 and 9**: *gus* and *hpt* DNA fragments from *E. Coli* XL1 blue clones (positive controls). M: 1Kb Ladder.

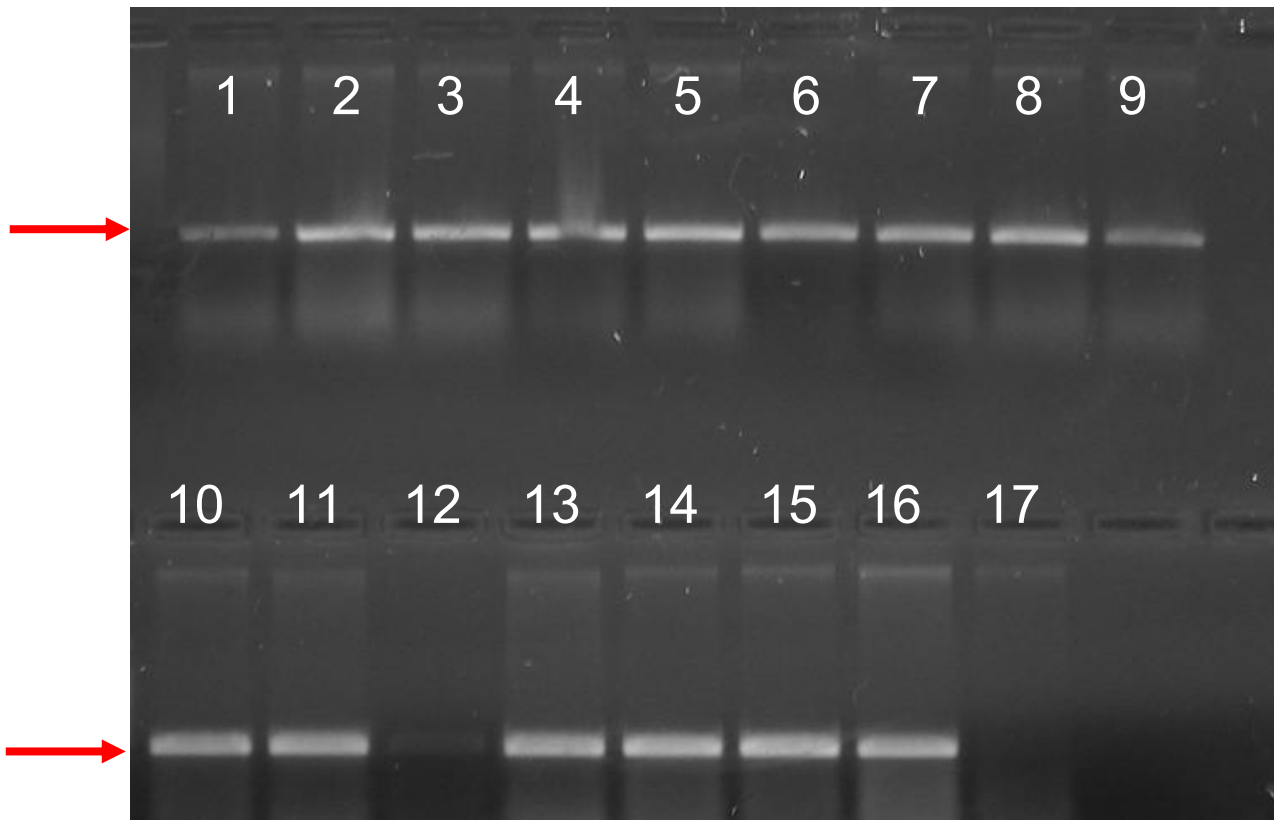


Fig 4. . Eletrophoretic analysis of PCR products from transgenic plants, evaluating the presence of the T-DNA construct carrying the *hpt* gene. 1 to 16: positive transgenic lines for the *hpt* gene; 17: non-transformed Nipponbare rice; red arrows indicate fragments of 460 bp.

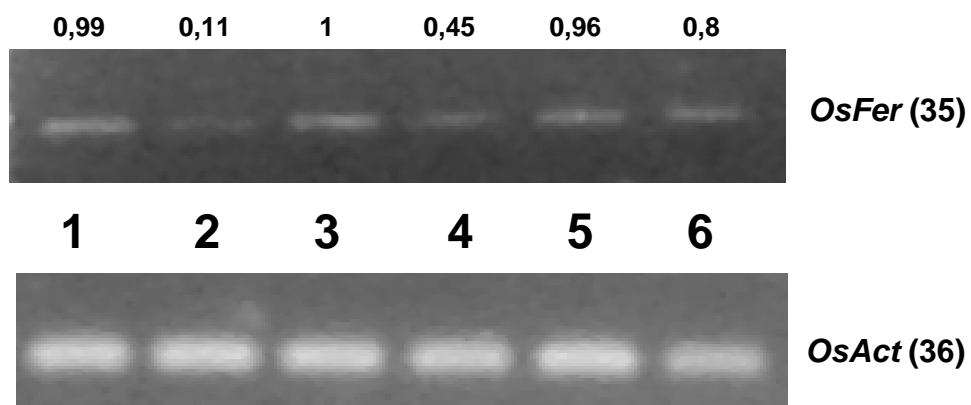


Fig 5. Electrophoretic analysis of RT-PCR products of *OsFer* and *OsAct1* in the transgenic silenced lines for the ferritin genes of rice. Plant1: non - transformed; plants 2 to 6: transgenic lines. The numbers in parenthesis indicate the cycles of RT-PCR. Band intensity of each PCR product was normalized in relation to the optical density obtained for the actin gene. Numbers above each lane represent a percentage in relation to the highest normalized optical density.

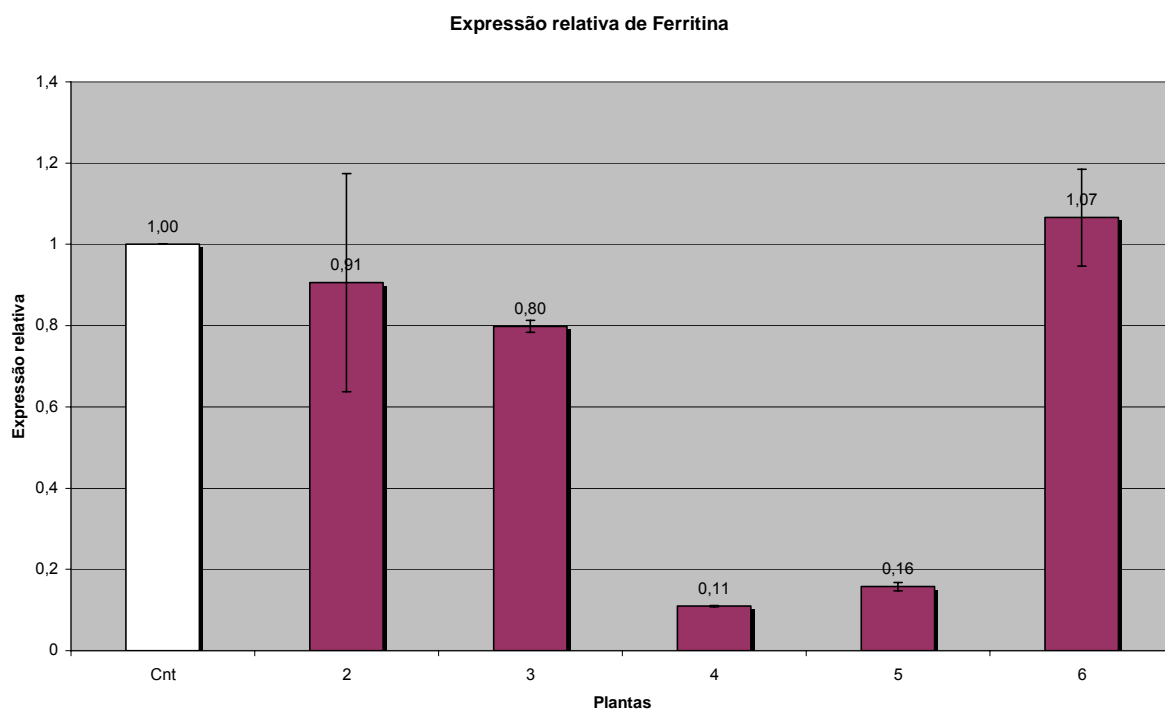


Fig 6. qRT-PCR analysis of transgenic silenced lines for the ferritin genes of rice. CNT: non - transformed; plants 2 to 6: transgenic lines. The numbers above the histograms indicate the level of the ferritin gene. The method for expression analysis was the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Table 1. Oligonucleotídeos used in the qRT-PCR and in the semi-quantitative RT-PCR essays.

Oligonucleotídeo code	Sequence (5' to 3')
OsFerF RNAi	CCTTGAGGAGCAGGTTGAAG
OsFerR RNAi	TGGATGGAAGAAACGAAACC
OsUbq R	ACCACTTCGACCGCCACTACT
OsUbq F	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
OsFDH F	CAAATCAGCTGGTGCTTCTC
OsFDH R	TTCCAATGCATTCAAAGCTG
OseEFa1 F	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT
OseEFa1 R	GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA
OsACT F	CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA
OsACT R	CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA

Table 2. Efficiency of ihpRNA, hpRNA, co-suppression and anti-sense constructs to silence genes in *Arabidopsis* and rice.

Gene	Species	promoter	Arm (nt)	GenBank Acc No	ihpRNA	Sense	Anti- sense
CHS	<i>Arabidopsis</i>	35S	741	AF112086	21/23	2/19	0/25
FLC1	<i>Arabidopsis</i>	35S	650	AY034083	16/16		2/13
GUS	Rice	Ubq	560	S69414	12/14	3/10	1/8
Fer1*	Rice	Ubq	290	AF519570	3/5		

The last four columns show the number of primary independent transformants showing silencing/ the number of transgenic plants produced from the primary transformation experiment.

* Shows the results of our silencing/ the number of transgenic plants analyzed.

CHS: Chalcone synthase; **FLC:** flowering locus; **GUS:** Beta-glucuronidase gene of *E. coli*; **Fer:** ferritin.

Modified from Wesley et al (2001).

CAPÍTULO II

Análise *in silico* e molecular de mutantes de arroz Nipponbare por inserção do retroelemento TOS17

A planta de arroz, considerada modelo para as monocotiledôneas, assim como a planta de *Arabidopsis* é modelo para as dicotiledôneas, destaca-se pela facilidade de transformação genética. E este é um fator decisivo na criação de bancos de mutantes contendo milhares de linhagens, com o objetivo da obtenção de pelo menos uma linhagem mutada para cada gene. Além disso, o arroz conta com mapas de ligação de alta densidade e centenas de milhares de clones contendo etiquetas de seqüências expressas (ESTs – Expressed Sequence Tags) e um banco de clones de cDNAs completo (KOME). O desenvolvimento de um banco de mutantes por inserção do retroelemento *TOS17* adiciona mais uma ferramenta para a genômica funcional de arroz (Hiroshika et al. 1996; Hiroshika 1997, 1999). Neste sistema, a ativação do retroelemento *TOS17* facilita a criação de centenas de linhagens mutantes, que podem ser facilmente identificadas por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para *TOS17* e para os genes nocauteados pelo retrotransposon (Takano et al. 2001).

Elementos de transposição são ubíquos em quase todos os genomas de plantas e constituem boa parte da estrutura destes genomas (Kumar e Bennetzen, 1999). Estes elementos pertencem à Classe I (retrotransposons) e à Classe II (transposons). Dentre os retroelementos mais ativos está o *TOS17* de 3,4Kpb e originariamente encontrado no genoma do arroz. Este elemento caracteriza-se por ser transcrito primeiramente em uma molécula de RNA e em seguida mobilizado para outra região do genoma. As mutações ocasionadas por este elemento geralmente são estáveis. Algumas características importantes são resumidas a seguir: (a) a transposição do *TOS17* pode ser regulada, porque ele é ativado pela cultura de tecidos e permanece silenciado em plantas regeneradas; (b) altamente mutagênico durante o processo de cultivo de tecidos, o *TOS17* transpõem-se preferencialmente em regiões ricas em genes, ocasionando ruptura em aproximadamente 8 locos por genoma durante um período de 5 meses de cultura de tecidos; (c) a integração nos locos é amplamente distribuída, tornando a saturação de genes algo possível; (d) as mutações induzidas são estáveis; (e) o número de cópias é originalmente baixo, uma a quatro cópias dependendo da variedade (Hirochika, 1997; Hirochika, 1999). Miyao et al. (2003) também demonstraram que o

TOS17 tem preferência por regiões ricas em genes. Estas características tornam o retroelemento *TOS17* uma ferramenta útil na determinação da função gênica em arroz.

Objetivos

- Identificar, no Banco de Mutantes, linhagens mutantes de arroz contendo inserção do retroelemento *TOS17* em genes envolvidos na homeostase de ferro, especialmente genes de ferritina.

(<http://tos.nias.affrc.go.jp/~miyao/pub/tos17/index.html.em>) ;

- identificar a região do gene de ferritina onde ocorreu a inserção do *TOS17*;

- caracterizar por PCR as linhagens mutantes para os genes de ferritina.

Material e métodos

Análise *in silico* de mutantes de arroz Nipponbare por inserção do retroelemento *TOS17*

A análise *in silico* foi realizada utilizando-se o banco de mutantes de arroz (Rice Genome Resource Center - RGRC), que comporta mais de 50.000 linhagens contendo inserções do retroelemento *TOS17*. Sequências genômicas de genes provavelmente envolvidos na homeostase de ferro em arroz (Gross et al., 2003) foram utilizadas para análises através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – Altschul et al., 1990) contra o banco de mutantes. As seqüências com alto valor de significância (E-value $< e^{-50}$ e alto valor de bitscore) dos alinhamentos das seqüências genômicas com as FSTs (Flanking Sequence Tags das linhagens mutantes) pela ferrameta BLAST foram realinhadas com as seqüências genômicas para se localizar a região de inserção no gene e a coerência do alinhamento, ou seja, verificar se a FST alinha perfeitamente com a região genômica flanqueadora da inserção (Figura 12).

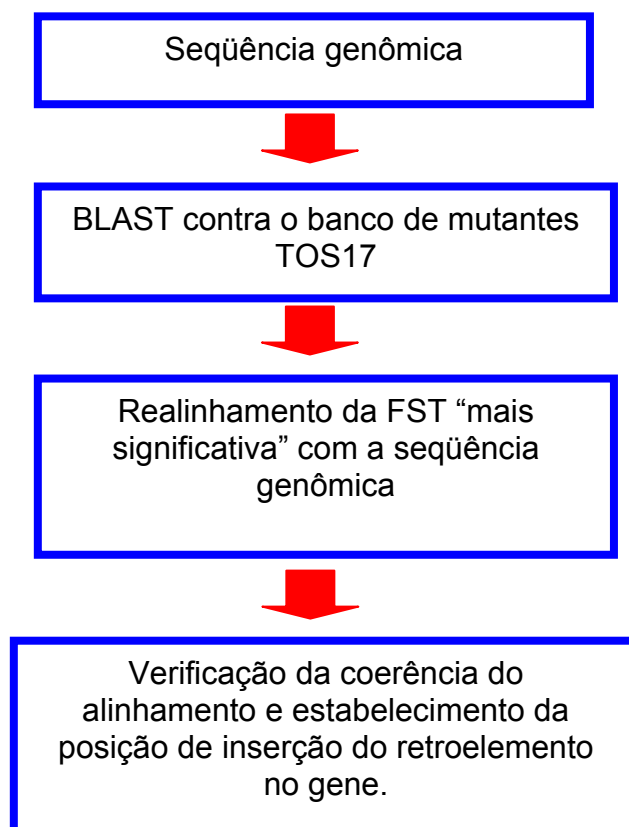


Figura 12. Esquema das etapas da análise *in silico*:

Obtenção do material genético

Sementes segregantes (um total de 20 para cada linhagem) das linhagens mutantes (Regenerantes 1 - R1) identificadas *in silico* foram importadas do RGRC, com autorização do Ministério da Agricultura do Brasil. As seguintes linhagens mutantes foram solicitadas ao Banco de Mutantes TOS17: NF2003, NG0250 e ND4539. Para a análise molecular descrita neste trabalho foram utilizadas somente plantas com inserção TOS17 no gene *OsFer2*.

Cultivo das plantas e coleta de material foliar para análise do DNA

As sementes das linhagens mutantes foram germinadas em placas de Petri autoclavadas contendo papel filtro úmido pelo período de 48 h escuro/ 48 h luz. A

seguir, as sementes foram transferidas para bandejas tipo célula contendo o substrato SOLOMAX. Plantas de aproximadamente 20 dias de idade tiveram partes das folhas coletadas e conservadas em microtubos de 1,5 ml em freezer -20°C até o momento da extração.

Extração e análise qualitativa de DNA total

O método utilizado para extração de DNA total seguiu os seguintes passos: maceração do material vegetal em nitrogênio líquido até completa pulverização; incubação em banho-maria a 65°C em microtubos contendo aproximadamente 100 mg de tecido macerado em 700 μl de tampão CTAB (CTAB 2%; EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris-HCl pH 8,0; NaCl 1.4 M e PVP 40.000 1%) por 30 min a 1 h; adição de 600 μl de clorofórmio:álcool isomílico (24:1) e homogeneização em vortex; incubação a temperatura ambiente por 5 a 10 min; centrifugação a 12.000 rpm/ 10 min; retirada de 500 μl de sobrenadante (fase aquosa) e transferência para um microtubo novo e adição de isopropanol gelado (-20°C) na relação v/v; centrifugação a 12.000 rpm/ 30 a 40 min; descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado com etanol 70%; centrifugação a 8.000 rpm por 5 min; secagem do precipitado a vácuo por aproximadamente 10 min; ressuspensão em 50 μl de água Milli – Q; incubação a 65°C por 10 min para facilitar a ressuspensão do “pellet”. A análise qualitativa foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Análise molecular por PCR das linhagens mutantes

A análise molecular foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos listados na Tabela 3. As reações de PCR foram realizadas seguindo-se estas condições: 2.5 μl de tampão 10X (200 mM Tris HCl pH8.4, 500 mM KCl); 1.5 μl de MgCl_2 50 mM; 0,5 μl de dNTPs 10 mM; 0,5 μl de cada oligonucleotídeo (10 μM); 0,2 μl de Enzima Taq DNA polimerase (5U/ μl); 2 μl (aprox. 100 ng) de DNA; água para 25 μl de volume final. O programa utilizado para a reação foi o seguinte: 95°C por 5 min; 95°C por 45 s, 53°C por 45 s, 72°C por 45 s (30 ciclos); 72° por 5 min para extensão final. Nesta análise foram utilizados 3 oligonucleotídeos (“reverse” e “forward” correspondentes a região do gene mutado e um oligonucleotídeo correspondente à região terminal 3’ do

retroelemento TOS 17) com o objetivo de diferenciar indivíduos homozigotos padrão selvagem (uma banda) de indivíduos heterozigotos (duas bandas) e homozigotos mutantes (uma banda). A Figura 13 mostra esquematicamente a estratégia utilizada para a análise molecular. Os produtos de PCR amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo utilizando-se como padrão de tamanho de fragmento o marcador Ladder 100 pb e/ou o Ladder 1 kpb.

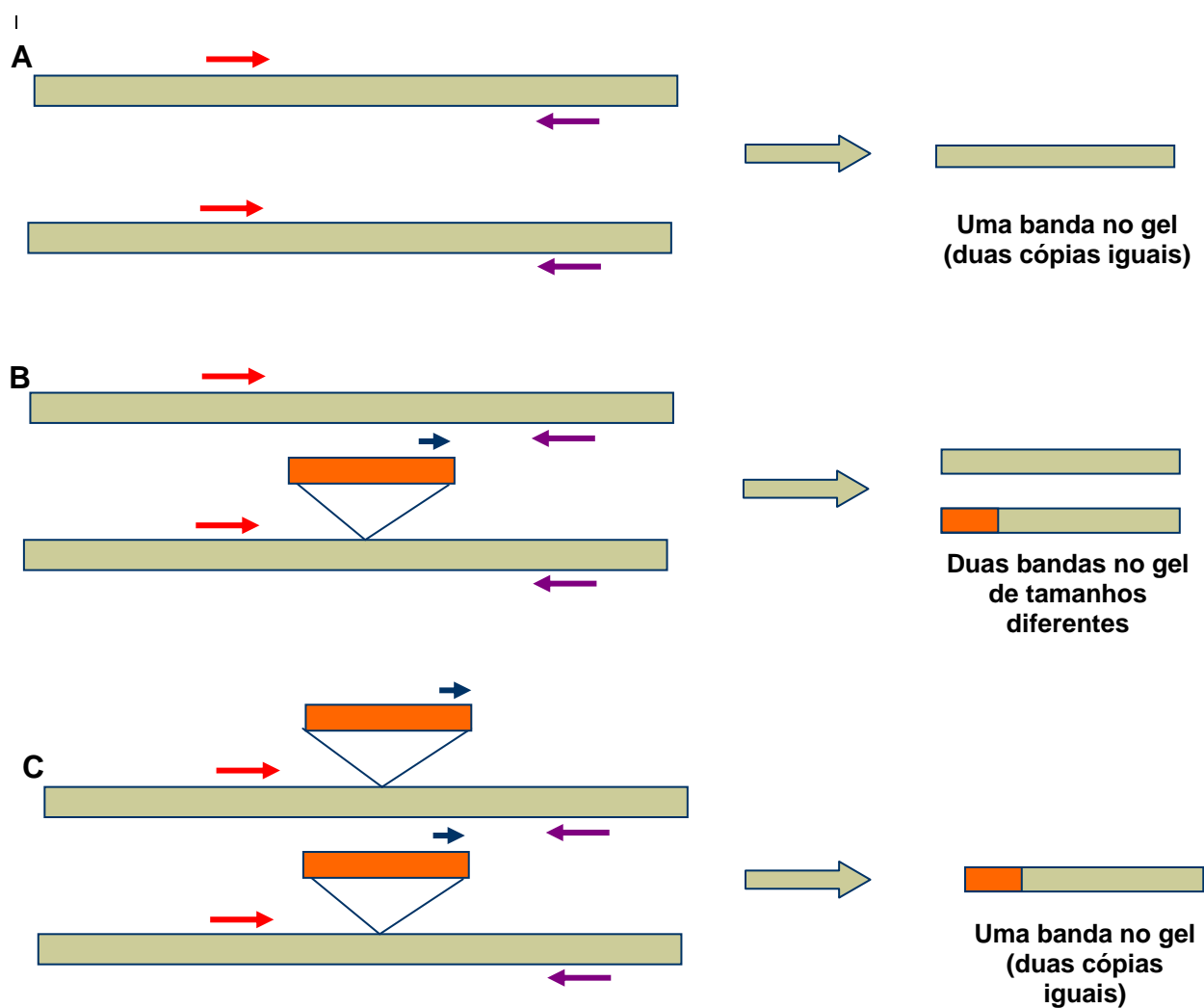


Figura 13. Esquema da estratégia utilizada para a análise por PCR para a caracterização molecular dos mutantes por inserção do TOS17. A: padrão homozigoto selvagem. B: padrão heterozigoto. C: padrão homozigoto mutante. Setas vermelhas e roxas: oligonucleotídeos para o gene. Setas pretas: oligonucleotídeo universal para o TOS17.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular das linhagens mutantes para *OsFer2*. F: forward; R: reverse.

Linhagem mutante	Seqüência do oligonucleotídeo (5' to 3')
ND4539	F: 5' CTC TGT CAA GGG TGT GAC GA 3' R: 5' TGA CAA CGT TGC TCT CAA GG 3'
NF2003	F: 5' ACT TGC CAG GCT TCG AGT TA 3' R: 5' GGT TTC GTT TCT TCC ATC CA 3'
NG0250	F: 5' ACT TGC CAG GCT TCG AGT TA 3' R: 5' CGC AGT AGC AAT GGA GTG AA 3'
TOS17 3' tail	5' AGG TTG CAA GTT AGT TAA GA 3'

Resultados

Identificação *in silico* de linhagens mutantes TOS17 de arroz

Foi realizada uma busca no banco de mutantes de arroz por inserção do retroelemento TOS17 utilizando-se as seqüências genômicas identificadas no trabalho publicado por Gross et al. (2003). As seqüências genômicas correspondem a genes envolvidos na homeostase de ferro em arroz. Na Tabela 4 estão listados os genes e as respectivas linhagens mutantes identificadas para cada um dos genes. A análise *in silico* realizada pela ferramenta BLAST resultou na identificação de 18 linhagens mutantes, sendo que foram identificadas mais de uma linhagem para alguns dos genes listados na tabela. O mapeamento cromossômico das linhagens listadas na Tabela 4 foi fornecido pelo Banco de Mutantes. É relevante notar que há correspondência entre a posição do gene e a posição da linhagem mutante em cada caso listado abaixo. Foram encontradas linhagens para: genes da família NRAMP, que são proteínas responsáveis pelo transporte de metais entre diferentes compartimentos celulares; genes da família das ferritinas, que codificam proteínas responsáveis pelo armazenamento de ferro; genes da família Yellow Stripe, que codificam proteínas integrais de membrana responsáveis pelo transporte de metais ligados a fitossideróforos ou a nicotianamina; genes da família IRT- ZIP que também codificam proteínas transportadoras de metais, principalmente Fe e Zn (Gross et

al.,2003). O presente trabalho foi direcionado para um detalhamento das análises *in silico* e moleculares por PCR somente para as linhagens que apresentaram inserção no gene *OsFer2* de acordo com os dados de mapeamento das mutações fornecidos pelo banco de mutantes (em vermelho na Tabela 4).

Tabela 4. Genes e respectivas linhagens mutantes encontradas no Banco de Mutantes por inserção do TOS17.

Gene (posição cromossômica)	Código da semente	Mapeamento das mutações nos cromossomos do arroz
<i>OsNRAMP4</i> (II)	NF6023	II
	NF6029	II
<i>OsNRAMP3</i> (VI)	NG4081	VI
<i>OsNRAMP8</i> (III)	NE8506	III
<i>OsZIP1</i> (III)	NG2551	III
<i>OsZIP4</i> (IV)	NE0018	IV
<i>OsZIP5</i> (VIII)	NE1520	VIII
<i>OsZIP7</i> (V)	ND7016	V
<i>OsYS5</i> (II)	ND8020	II
<i>OsYS7</i> (II)	NG3543	II
<i>OsYS10</i> (IV)	NE7024	IV
<i>OsFRO2</i> (IV)	NF9030	IV
	NF3020	IV
	NE8022	IV
	NF3035	IV
<i>OsFer2</i> (XII)	NG0250	XII
	NF2003	XII
	ND4539	XII

Alinhamento da seqüência genômica de *OsFer2* com as FSTs (Flanking Sequence Tags) das linhagens mutantes

Foi realizado o alinhamento da seqüência genômica de *OsFer2* com as respectivas FSTs das linhagens mutantes ND4539, NG0250 e NF2003. O

alinhamento entre a FST da linhagem ND4539 mostrou que a inserção do TOS17 ocorreu dentro do íntron localizado entre o 3º e 4º exons do gene *OsFer2* (Figura 15a). Nas linhagens NG0250 e NF2003a inserção do TOS17 ocorreu na região 3' não traduzida (3' UTR) do gene *OsFer2* (Figura 15 b e c).

Análise molecular das linhagens mutantes TOS17 de arroz

A análise molecular das linhagens mutantes foi realizada por PCR com a utilização de três oligonucleotídeos. A estratégia da análise por PCR está esquematizada na Figura 13. Foram recebidas 20 sementes de cada linhagem. No entanto, houve germinação e crescimento de dezoito plantas da linhagem ND4539 R1, seis plantas da linhagem NG0250 R1 e três plantas da linhagem NF2003 R1. A análise molecular da população de 18 plantas da linhagem ND439 R1 revelou um padrão de 6 indivíduos contendo a banda selvagem (1, 6, 7, 16, 17 e 18) e oito indivíduos contendo a banda selvagem e o padrão da mutação (2, 4, 5, 9, 10, 13, 14 e 15). Uma das plantas com padrão tipo heterozigoto foi crescida até a produção de sementes. A população de 11 plantas gerada a partir desta planta R1 está segregando entre indivíduos com padrão molecular da inserção do TOS17 e padrão molecular tipo selvagem (Figura 14a). O fato de as duas cópias do gene da ferritina no genoma do arroz serem muito similares requer mais atenção quando se deseja separar e identificar linhagens mutantes para cada uma das cópias em separado usando a estratégia de PCR. Os oligonucleotídeos fornecidos pelo Banco de Mutantes do TOS17 anelam em regiões que são idênticas para os dois genes de ferritina, não possibilitando a identificação de homozigotos para a mutação no gene *OsFer2* somente. Foi projetado um outro oligonucleotídeo, que anela em uma região que não é idêntica entre os dois genes, e que desse modo pode diferenciar plantas homozigotas de plantas heterozigotas para a mutação no gene *OsFer2* (Figura 16). Este oligonucleotídeo será testado na população ND4539.

Os resultados para a linhagem NG0250 (R1) revelaram um padrão molecular com 5 plantas heterozigotas e uma com padrão tipo selvagem dentre as 6 plantas avaliadas da população obtida (Figura 14b). As plantas heterozigotas foram levadas para uma casa de vegetação no Instituto Riograndense do Arroz (IRGA) e as

sementes estão sendo coletadas. A análise molecular por PCR da próxima geração deverá indicar quais plantas são homozigotas para a mutação.

O padrão molecular das 3 plantas obtidas da população NF2003 (R1) é unicamente tipo selvagem (Figura 14c). Esta última linhagem não possui a inserção do TOS17 dentre as plantas avaliadas e por esta razão foi descartada.

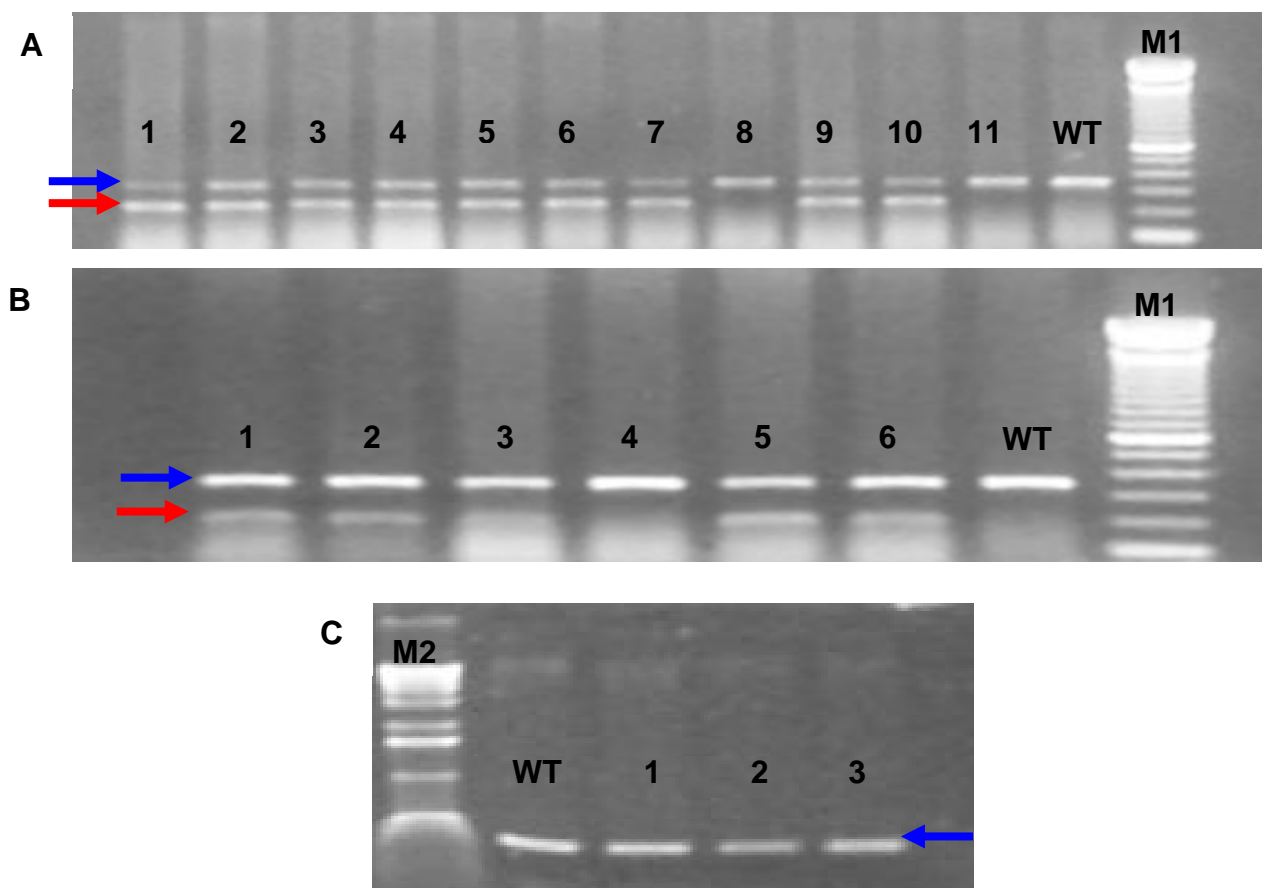


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de mutantes TOS17 para o gene *OsFer2*. A: (1 – 11) linhagem ND4539 (R2). B: (1 – 6) linhagem NG0250 (R1). C: (1 – 3) linhagem NF2003 (R1). Seta azul: banda de amplificação do gene intacto, não interrompido pelo retrotransposon (padrão tipo selvagem). Seta vermelha: banda referente à amplificação do gene interrompido pela inserção (padrão mutante). M1: ladder 100pb. M2: Ladder 1kpb. WT: tipo selvagem.

Discussão

Até o momento não foi possível a identificação de plantas homozigotas para a mutação em *OsFer2*. As plantas que apresentam o padrão mutante contêm a

inserção em heterozigose nas populações avaliadas (Figura 14). Portanto, as gerações seguintes de plantas devem ser analisadas com o objetivo de identificar plantas homocigotas para a mutação. Em seguida, estudos de caracterização da expressão do gene *OsFer2* e de caracterização fisiológica da planta mutante poderão ser conduzidos. Não há relatos na literatura sobre a caracterização funcional do gene da ferritina em arroz e em outras plantas utilizando-se mutantes insercionais e/ou silenciamento gênico. Um exemplo bastante recente da utilização destas ferramentas para caracterização de genes envolvidos em transporte e homeostase de metais é o trabalho publicado por Waters et al. (2006). Dois mutantes contendo inserções de T-DNA nos genes *AtYSL1* e *AtYSL3* foram caracterizados neste trabalho. Segundo Takano et al. (2001), a caracterização de mutantes insercionais é indispensável para a compreensão e elucidação da função de qualquer gene em particular. Os autores também discutem que a identificação de homocigotos por PCR é uma ferramenta útil em grandes populações de mutantes geradas pela mutação pela retrotransposição. A utilização de “pools” de DNA de linhagens mutantes também torna fácil a localização da linhagem com a mutação no gene de interesse em grandes populações de plantas (Sato et al. 1999). Porém, a disponibilidade de um banco de mutantes disponível *in silico* (RGRC) tornou ainda mais fácil a identificação de linhagens para qualquer gene de interesse em arroz. Foram identificadas três linhagens para o gene *OsFer2* (Tabela 4). A identificação e caracterização de mais de uma linhagem mutante para o mesmo loco gênico é importante, pois o TOS17 pode estar inserido em mais de um local no genoma e o fenótipo observado para o mutante pode não ser o resultado da inserção no loco estudado somente, mas produto da inserção em outros locais funcionalmente relevantes. Por essa razão, procurou-se identificar mais de uma linhagem mutante para os genes da ferritina. O trabalho publicado por Tabuchi et al. (2005) relatou bem isso. Três linhagens mutantes com inserção do TOS17 no gene *OsGS1;1* foram caracterizadas. Os resultados mostraram que os fenótipos mutantes eram os mesmos para cada uma das linhagens independentes.

Nossa caracterização inicial mostrou que na linhagem ND4539 ocorreu uma inserção em um íntron entre o 3º e 4º exon (Figura 15a). A literatura relata que, mesmo ocorrendo inserção em íntrons, a expressão do gene pode ser inibida. Um exemplo é o mutante *osaba1* em arroz, caracterizado por Agrawal et al. (2001). Ele possui uma cópia do TOS17 inserida em um íntron do gene *OsABA1*, responsável

pela conversão de zeaxantina em all-trans-violaxantina. Estes compostos são precursores na biossíntese do hormônio ácido abscísico (ABA). O mutante é deficiente na produção de ABA. Em arroz, um banco de mutantes gerado por inserção de T-DNA contém, dentre as sequências que flanqueiam o T-DNA, 1.846 localizadas dentro de regiões codificantes (An et al., 2003). Segundo os autores, as inserções nas regiões codificantes ocorreram dentro de exons, introns, regiões 5' UTRs e 3'UTRs. Outro ponto relevante reside no pequeno número de segregantes utilizado para a análise molecular. Nonomura et al. (2004) utilizou um total de 317 plantas segregantes da terceira geração (R3) mutante para a identificação de homozigotos para o gene PAIR1 em arroz. Este gene codifica uma proteína envolvida no pareamento dos cromossomos homólogos durante a meiose. A análise de um maior número de plantas aumentaria a probabilidade de se identificar homozigotos mutantes.

Para as outras duas linhagens houve inserção na região 3' UTR (Figura 15b e c). Mesmo que não haja nocaute na expressão do gene, pode haver padrões regulatórios diferentes no mutante homozigoto quando comparado ao tipo selvagem, pois esta região pode estar envolvida de alguma forma na regulação da expressão do gene da ferritina. Da mesma forma que Petit et al. (2001) induziram mutações por mutagênese sítio dirigida na região 5' UTR no gene *AtFer1* da ferritina de *Arabidopsis thaliana*, uma análise mais detalhada buscando-se caracterizar a região 3' UTR da ferritina de arroz, tanto de indivíduos não mutados quanto mutados, deve ser objeto de futuros trabalhos. A região 5' UTR caracterizada pelo trabalho citado acima contém uma sequência denominada IDRS (Iron Dependent Regulatory Sequence), que regula positivamente o gene quando há excesso de ferro na célula. Em um banco de mutantes por inserção de T-DNA gerado por Sallud et al. (2004), os autores consideraram para a análise *in silico* das FSTs, 1500 pb acima do códon de início e 750 pb abaixo do códon de término como sendo parte do gene. Portanto, segmentos consideráveis da estrutura do gene tanto a montante quanto à jusante devem ser considerados neste tipo de análise.

(A) ND4539_*OsFer2*_E3(Tos17)E4

E1: 294 - 592
E2: 1299 - 1382
E3: 1463 - 1523
E4: 1626 - 1712
E5: 2465 - 2529
E6: 2663 - 2728
E7: 2841 - 2903
E8: 3009 - 3053

```
OsFer2          1  cgggaaggaa tagtggttaa gcttgaccga ctccggtgcg gccgggccgg gctccacatc aaccaaccac aagcccaaaa
ND4539_FST      1  -----
OsFer2          81  tatcctctcc agccacgagc ccgccacgcg ctccctcgcc ttcgtcccat ctcgaccgtc cacgtgtggc ccatccgtga
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         161  gctccacgcg cctatatcta tccttttcta tcacctccac ccctaccacc gcacaatctc atcactcttc acccgccgcg
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         241  ccgcgaactc cggaaccgaa cgccacacgc gccttcctct cacttaatcc gccatgcttc ctcttagggt tgccccctcc
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         321  tctctggccg ccgccgccgc cgcggcgcct acctatctcg ccgccgcggc ctcgaccctt gttccgtctt ggctgctgtg
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         401  gccgcgtgga gccggagccg tggcagtgtg cagggccgcc gggaaagggg aggaggtgct cagcggcgtg gtcttccagc
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         481  cattcgagga gctcaagggg gagctctccc tcgtcccca ggccaaggac cagtctcttg ctaggcaaaa gttcgtcgac
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         561  gagtgcgagg ccgccatcag cgagcagatc aagtctgttt tcctcctcct cctcactctg ccttccattt ttgaatttct
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         641  attccccttt catgtgcgca tttcttctgc ttcttctttt ttaaaattta acaaaaatct ctgtgcctcc tggtcatttt
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         721  attttctttg ttagtgattg gatttcgtaa agggttcatt tttcatccta taataatttc tgctcttggg atgcgtctgt
ND4539_FST      1  -----
OsFer2         801  tctacagtgc tgcagatttt cccaacatt ttttttacat ggaccaacgg atacaaaatt attttagtcc acaataattg
```


ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	881	atgtaaatag	gagaaaagac	acttgtgctt	agctaaatth	agaccctggt	tagatgggac	taaaacctct	ttagtccgat
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	961	gtttggacac	taattataaa	tattaaacgc	ggactattaa	taaaacccat	tctataacct	gaattaattc	gcgagacgaa
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1041	tctattgagt	CTAATTAATC	CATGATTAGC	CTATGTCATG	CTACAGTAAA	CATGCGCTAA	TTATGGATTA	ATTAGGCTTA
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1121	AAAAAATTTG	TCACGCGAAT	TAGCTCTCAT	TTATGTAATT	AGTTTTATAA	GTAGTCTATT	TTCAATACTC	CAAATTCATC
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----ACTC	CAAATTCATC
<i>OsFer2</i>	1201	CGATATGAAG	TCCCTGTTCC	AAACACCCCC	TTAGCTTGTC	ATCCGTAGTT	ATATTCCGAA	TTGGAATTCA	ATCCTAAAAA
ND4539_FST	15	CGATATGAAG	TCCCTGTTCC	AAACACCCCC	TTAGCTTGTC	ATCCGTAGTT	ATATTCCGAA	TTnnaATTCA	ATCCTAAAAA
<i>OsFer2</i>	1281	ATAGTTCAAT	CTTTGCAGTG	TGGAGTTCAA	TGCATCGTAC	GCGTACCACT	CCCTTTTCGC	CTACTTTGAC	CGTGACAACG
ND4539_FST	95	ATAGTTCAAT	CTTTncanTG	TGGAGTTCAA	TGCATCGTAC	GCGTACCACT	CCCTTTTCGC	CTACTTTGAC	CGTGACAACG
<i>OsFer2</i>	1361	TTGCTCTCAA	GGGATTCGCC	AAGTAAGCCA	TCACCACCCC	TCATTAGCCA	TCACCAAGTA	GGAAAATTGT	CACCCATGTA
ND4539_FST	175	TTGCTCTCAA	GGGATTCGCC	AAGTAAGCCA	TCACCACCCC	TCATTAGCCA	TCACCAAGTA	GGAAAATTGT	CACCCATGTA
<i>OsFer2</i>	1441	TCGATAAATT	CTGTTCCCTC	AGATTCTTCA	AAGAATCCAG	CGATGAGGAG	AGGGATCACG	CAGAGAAACT	CATGAAGTAC
ND4539_FST	255	TCGATAAATT	CTGTTCCCTC	AGATTCTTCA	AAGAATCCAG	CGATGAGGAG	AGGGATCAcn	CAGAGAAACT	CATGAAGTAC
<i>OsFer2</i>	1521	CAGGTAACCT	TACCTCTGCT	TCGTTTGGCA	CACCAGGAAA	ACTGTAGGCT	GTACCACTAT	AATCATGCGC	CCAAATGCTA
ND4539_FST	335	CAGGTAACCT	TACCTCTGnT	TCGTTTGGCA	TOS17-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1601	AAACTGCCAT	GTTCTTCTTT	GTCAGAACAT	GCGTGGAGGC	AGGGTGCGGC	TCCAGTCCAT	CGTCACACCC	TTGACAGAGT
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1681	TCGACCATCC	TGAGAAAGGG	GATGCCTTGT	ATGGTGAGTT	GCTTTCAGCT	TGTCCTATTA	TCTCTTATGT	TTTTTATTCC
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1761	ATGGTATATG	TACTTGTGCT	TCTGCTTACG	CCTTACTGTG	TGCTAGTCTG	AGTGTCTGTT	AATTATTATC	TATGTGAAAA
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1841	TTTAAGTGGT	TGGATCCTTA	AGGTTGGGAG	GAGCCCTTTT	TTTGGCAAGA	ACAGGGGAAC	TTCTTGGGTG	AATGAGCTCA
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<i>OsFer2</i> ND4539_FST	1921 365	TTCGCCATCC	AGATTCAGCA	AGGATACTTT	CCTCTTCAAA	AGTTCCATGT	TGAATCCTGA	TGTCAATTAC	TCTCCGTTTT
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2001 365	TTAATGTATG	ACGCGGTAA	CTTTTGGAGA	TACGTTTAAAC	CATTCGTCCTT	attcaaaaaa	tatatataat	tattatttat
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2081 365	tttatgtga	cttaatttat	catcaaagt	tctttaagcg	tgatttaa	atTTTTatat	ttgcaaaaaa	aattgaataa
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2161 365	ggttaaact	taattaa	gtcaacggcg	tcatacatta	taaaacgaag	ggagtaactt	tcaataaagg	ctactttgtt
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2241 365	ttgtaaaagc	tttcttttaa	acattttgga	ctgcacagaa	aagattctct	aaattctaaa	cgctcctaaa	ggagaaaacg
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2321 365	tcattgtata	ttttccatca	ttcacctta	tggcatttgc	tagtgtctcc	agaaagtagc	atgcactggc	tgtttgttgc
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2401 365	tgtacatacc	tgtacaaact	ttgtgttccc	ctatgtttta	ccctctagct	tgcttgtgat	ttcagctatg	gagttggcct
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2481 365	tggtctctga	aaagcttga	aatgagaagt	tgcacaacct	gcacagtga	agatattctc	ctggtatgca	gttatgcagt
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2561 365	aatgctgaac	atggatttag	aatgcgttgt	ataattctca	acactatttt	gaaaagaaat	atatggtgaa	acttgaaaat
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2641 365	gtggtgccgt	gaatcaacag	gtggcatcaa	ggtgcaatga	tccacagctg	accgacttcg	ttgagagtga	attccttgag
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2721 365	gagcaggtaa	aaaaccttct	gccacttgg	gtactgaact	agctcttgag	atggttaatat	tcaactgcta	tgctttagtg
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2801 365	aattatgttt	tgctgaaaat	atctgccttg	ctctgaaagg	tgaagccat	caagaagatc	tctgagtatg	tcgccagct
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2881 365	gagaagagtg	ggaaaggggc	atggttagtg	tgttttgtca	gaaaataactt	catttgatgt	actaccatct	atctatagac
<i>OsFer2</i> ND4539_FST	2961 365	ctgtggtttg	actcatcagt	tgttgtttgc	tacgtaattt	gtgttgacag	ggtgtggcac	tttgatcaga	agctgcttga

<i>OsFer2</i>	3041	ggaagaagct tga	atggagg	agacggtgtg	aagggcagta	gtaggtttcg	tttcttccat	ccatgggatc	atgcagctaa
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	3121	agaaagaaaa	taagtcgagt	ctgtgtattc	atcaaattaa	gcacgcagta	gcaatggagt	gaatgaacca	accaatttgg
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	3201	tcatgaactt	cccctgtgt	ctaggtcagt	agagcttcag	aatcatgtgt	atgtcgcgcg	tcctcgcaga	aaaggaacat
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	3281	ggcgcggctg	gctgtagcga	tacttgtgat	attgtggcta	tgcattggagt	catggtgatg	gtgtattttg	gggagcattt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	3361	acacgtttgt	tgctagagag	atthtgtctg	cagccagtaa	ggaacagtat	gataatccat	tgtggtgtta	atgcttgttt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	3441	catcgtgctt	atgtcatggt	cctagtagtt	tatgttagta	actcgaagcc	tggcaagttt	ttatgcata	atgtcccttt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	3521	gctt							
ND4539_FST	365	----							

Tamanho do fragmento de PCR para o padrão tipo selvagem: 328pb
Tamanho do fragmento de PCR para o padrão mutante: 200pb

(B) NF2003_*OsFer2*_3'UTR(Tos17)

- E1: 294 - 592
- E2: 1299 - 1382
- E3: 1463 - 1523
- E4: 1626 - 1712
- E5: 2465 - 2529
- E6: 2663 - 2728
- E7: 2841 - 2903
- E8: 3009 - 3053

<i>OsFer2</i>	1	cggaaggaa	tagtggtaa	gcttgaccga	ctccggtgcg	gccgggcccg	gctccacatc	aaccaaccac	aagcccaaaa
---------------	---	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	81	tatcctctcc	agccacgagc	cgccacgcg	ctccctcgcc	ttcgtcccat	ctcgaccgtc	cacgtgtggc	ccatccgtga
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	161	gctccacgcg	cctatatcta	tccctttcta	tcacctccac	ccctaccacc	gcacaatctc	atcactcttc	acccgccgcg
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	241	ccggaactc	cggaaccgaa	cgccacacgc	gccttcctct	cacttaatcc	gccatgcttc	ctcctagggt	tgccccctcc
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	321	tctctggcgg	ccgccgcgcg	cgcgggcct	acctatctcg	ccgcgcgggc	ctcgaccctt	gcttcctctt	ggctgcctgt
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	401	gccgcgtgga	gccggagccg	tggcagtgtg	cagggccgcc	gggaaagggg	aggaggtgct	cagcggcgtg	gtcttccagc
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	481	cattcgagga	gctcaagggg	gagctctccc	tcgtccccca	ggccaaggac	cagtctcttg	ctaggcaaaa	gttcgtcgac
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	561	gagtgcgagg	ccgccatcag	cgagcagatc	aaagtctgtt	tcctcctcct	cctcactctg	ccttccattt	ttgaatttct
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	641	attccccttt	catgtgcgca	tttcttctgc	ttcttctttt	ttaaaattta	acaaaaatct	ctgtgcctcc	tggctatttt
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	721	atthtctttg	ttagtgattg	gatttcgtaa	agggttcatt	tttcatccta	taataatttc	tgctcttggg	atgcgtctgt
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	801	tctacagtgc	tgcagattht	cccaaacttt	ttttttacat	ggaccaacgg	atacaaaatt	atthtagtcc	acaataattg
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	881	atgtaaatag	gagaaaagac	acttgtgctt	agctaaattt	agaccctggt	tagatgggac	taaaacctct	ttagtccgat
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	961	gtttggacac	taattataaa	tattaaacgc	ggactattaa	taaaacccat	tctataacct	gaattaattc	gcgagacgaa
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1041	tctattgagt	ctaattaatc	catgattagc	ctatgtcatg	ctacagtaaa	catgcgctaa	ttatggatta	attaggctta
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	1121	aaaaaatttg	tcacgcgaat	tagctctcat	ttatgtaatt	agttttataa	gtagtctatt	ttcaatactc	caaattcatc
NF2003_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1201 1	cgatatgaag	tcctgttcc	aaacaccccc	ttagcttgtc	atccgtagtt	atattccgaa	ttggaattca	atcctaaaaa
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1281 1	atagttcaat	ctttgcagtg	tgaggttcaa	tgcacgtac	gcgtaccact	cccttttcgc	ctactttgac	cgtgacaacg
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1361 1	ttgctctcaa	gggattcgcc	aahtaagcca	tcaccacccc	tcattagcca	tcaccaagta	ggaaaattgt	cacccatgta
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1441 1	tcgataaatt	ctgttccttc	agattcttca	aagaatccag	cgatgaggag	agggatcacy	cagagaaact	catgaagtac
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1521 1	caggtaactt	tacctctgct	tcgtttggca	caccaggaaa	actgtaggct	gtaccactat	aatcatgcgc	ccaaatgcta
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1601 1	aaactgccat	gttcttcttt	gtcagaacat	gcgtggaggc	agggtgcggc	tccagtccat	cgtcacacc	ttgacagagt
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1681 1	tcgaccatcc	tgagaaaggg	gatgccttgt	atggtgagtt	gctttcagct	tgtcctatta	tctcttatgt	tttttatcc
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1761 1	atggtatatg	tacttgtgct	tctgcttacg	ccttactgtg	tgctagtctg	agtgtctggt	aattattatc	tatgtgaaaa
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1841 1	tttaagtgg	tggatcctta	aggttgggag	gagccctttt	tttggcaaga	acaggggaac	ttccttgggtg	aatgagctca
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	1921 1	ttcgccatcc	agattcagca	aggatacttt	cctcttcaaa	agttccatgt	tgaatcctga	tgtcaattac	tctccgtttt
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2001 1	ttaatgtatg	acgcggttaa	ctttttgaga	tacgtttaac	cattcgtctt	attcaaaaaa	tatatataat	tattatttat
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2081 1	tttattgtga	cttaatttat	catcaaatgt	tctttaagcg	tgatttaa	at	ttttatat	ttgcaaaaaa
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2161 1	ggttaaacgt	taattaa	gtcaacggcg	tcatacatta	taaaacgaag	ggagtaactt	tcaataaagg	ctactttggt
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2241 1	ttgtaaaagc	tttcttttaa	acat	tttggga	ctgcacagaa	aagattctct	aaattctaaa	cgctcctaaa
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2321 1	tcattgtata	ttttccatca	tttcacotta	tggcatttgc	tagtgtctcc	agaaagtagc	atgcactggc	tgtttgttgc
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2401 1	tgtacatacc	tgtacaaaact	tttgtttccc	ctatgtttta	ccctctagct	tgcttgtgat	ttcagctatg	gagttggcct
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2481 1	tggctctcga	aaagcttgta	aatgagaagt	tgcacaacct	gcacagtgt	agatattctc	ctggttatgca	gttatgcagt
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2561 1	aatgctgaac	atggatttag	aatgcgttgt	ataattctca	acactatfff	gaaaagaaat	atatggtgaa	acttgaanaat
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2641 1	gtggtgccgt	gaatcaacag	gtggcatcAA	GGTGCAATGA	TCCACAGCTG	ACCGACTTCG	TTGAGAGtGA	ATTCCCTGAG
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2721 1	GAGCAGGTAA	AAAaCCTTCT	GCCCACTTGG	GTA CTGAACT	AGCTCTTGAG	ATGTT-AATA	TTCAACTGCT	ATGCTTTAGT
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2800 1	GAATTATGTT	TTGCTGAAAA	TATCTGCCTT	GCTCTGAAAG	GT TGAAGCCA	TCAAGAAGAT	CTCTGAGTAT	GTCGCCACAG
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2880 1	TGAGAAGAGT	GGGAAAGGGG	CATGTTTAGT	GTGTTTTGTC	AGAAAATACT	TCATTTGATG	TACTACCATC	TATCTATAGA
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	2960 1	CCTGTGGTTT	GACTCATCAG	TTGTTGTTTG	CTACGTAATT	TGTGTTGCAG	GGGTGTGGCA	CTTTGATCAG	AAGCTGCTTG
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	3040 1	AGGAAGAAGC	TGAATGGAG	GAGACGGTGT	GAAGGGCAGT	AGTAGGTTTC	GTTTCTTCCA	TCCATGGGAT	CATGCAGCTA
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	3120 1	AAGAAAGAAA	ATAAGTCGAG	TCTGTGTATT	CATCAAATTA	AGCACGCAGT	AGCAATGGAG	TGAATGAACC	AACCAATTTG
		-----	-----	-----	-----	---TOS17GT	AGCAATGGAG	TGAATGAACC	AACCAATTTG
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	3200 33	GTCATGAACT	TCCCCCTGTG	TCTAGGTCAG	TAGAGCTTCA	GAATCATGTG	TATGTCGCGC	GTCCTCGCAG	AAAAGGAACA
		GTCATGAACT	TCCCCCTGTG	TCTAGGTCAG	TAGAGCTTCA	GAATCATGTG	TATGTCGCGC	GTCCTCGCAG	AAAAGGAACA
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	3280 113	TGGCGcGCT	GGCTGTAGCG	ATACTTGTGA	TATTGTGGCT	ATGCATGGAG	TCATGGTGAT	GGTGTATTTT	GGGgGCATT
		TGGCGCCGCT	GGCTGTAGCG	ATACTTGTGA	TATTGTGGCT	ATGCATGGAG	TCATGGTGAT	GGTGTATTTT	GGGG-GCATT
<i>OsFer2</i> NF2003_FST	3360 192	TACACGTTTG	TTGCTAGAGA	GATTTTGCTG	GCAGCCAGTA	AGGAACAGTA	TGATAATCCA	TTGTGGTGTT	AATGCTTGTT
		TACACGTTTG	TTGCTAGAGA	GATTTTGCTG	GCAGCCAATA	AGGAACAATA	TGATAAACCA	TTGTGGTGTT	AATGCTTGTT
<i>OsFer2</i>	3440	TCATCGTGCT	TATGTCATGT	TCCTAGTAGT	TTATGTTAGT	AACTCGAAGC	CTGGCAAGTT	TTTATGCATA	TATGTCCCTT



NF2003_FST	272	TCATCGTGCT	TATGTCATGT	TCCTAGTAGT	TTATGTTAGT	AACTCGAAGC	CTGGCAAGT	TTTATGCATA	TATGTCCTT
<i>OsFer2</i>	3520	TGCTT-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NF2003_FST	352	TGCTTTGCTG	CCTCTGAAAG	AACAGAAAAA	ATAAAAAGAGA	AAGAAAGAGA	AGAGGATGGG	CCCATCAAGA	ATAATTGGGC
<i>OsFer2</i>	3525	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NF2003_FST	432	CTTAAGTGAC	AGCTTATGTT	TGAGTTTGAG	CCCACCTTTG	CTGGCGTGGC	GAGGCTCCAC	ATTATAACAC	atgtatctct
<i>OsFer2</i>	3525	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	---
NF2003_FST	512	gctattataa	aaactgaaat	atTTTTactt	ttatTTTTant	acgtcttcat	atttgagtcg	ggt	

Tamanho do fragmento de PCR para o padrão tipo selvagem: 414pb
Tamanho do fragmento de PCR para o padrão mutante: 330pb

(C) NG0250_*OsFer2*_3'UTR(Tos17)

- E1: 294 - 592
- E2: 1299 - 1382
- E3: 1463 - 1523
- E4: 1626 - 1712
- E5: 2465 - 2529
- E6: 2663 - 2728
- E7: 2841 - 2903
- E8: 3009 - 3053

<i>OsFer2</i>	1	cgggaaggaa	tagtggttaa	gcttgaccga	ctccggtgcg	gccggggccgg	gctccacatc	aaccaaccac	aagcccaaaa
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	81	tatcctctcc	agccacgagc	ccgccacgcg	ctccctcgcc	ttcgtcccat	ctcgaccgtc	cacgtgtggc	ccatccgtga
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	161	gctccacgcg	cctatatcta	tccttttcta	tcacctccac	ccctaccacc	gcacaatctc	atcactcttc	accgcgcgcg
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	241	ccgcgaactc	cggaaccgaa	cgccacacgc	gccttctctc	cacttaatcc	gcc atgcttc	ctcctaggg	tgccccctcc
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>OsFer2</i>	321	tctctggcgg	ccgccgcgcg	cgcgggcgct	acctatctcg	ccgcgcgggc	ctcgaccctc	gcttccgtct	ggctgcctgt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

OsFer2	401	gccgcgtgga	gccggagccg	tggcagtgtg	cagggccgcc	gggaaagggg	aggaggtgct	cagcggcgtg	gtcttccagc
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	481	cattcgagga	gctcaagggg	gagctctccc	tcgtccccca	ggccaaggac	cagtctcttg	ctaggcaaaa	gttcgtcgac
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	561	gagtgcgagg	ccgccatcag	cgagcagatc	aaagtctgtt	tcctcctcct	cctcactctg	ccttccattt	ttgaatttct
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	641	attccccttt	catgtgcgca	tttcttctgc	ttcttctttt	ttaaaattta	acaaaaatct	ctgtgcctcc	tggtcatttt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	721	atthtctttg	ttagtgattg	gatttcgtaa	agggttcatt	tttcatccta	taataatttc	tgctcttggg	atgcgtctgt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	801	tctacagtgc	tgcagattht	cccaaacatt	ttttttacat	ggaccaacgg	atacaaaatt	atthtagtcc	acaataattg
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	881	atgtaaatag	gagaaaagac	acttgtgctt	agctaaattt	agaccctggt	tagatgggac	taaaacctct	ttagtccgat
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	961	gtttggacac	taattataaa	tattaaacgc	ggactattaa	taaaacccat	tctataacct	gaattaattc	gcgagacgaa
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1041	tctattgagt	ctaattaatc	catgattagc	ctatgtcatg	ctacagtaaa	catgcgctaa	ttatggatta	attaggctta
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1121	aaaaaatttg	tcacgcgaat	tagctctcat	ttatgtaatt	agttttataa	gtagtctatt	ttcaatactc	caaattcatc
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1201	cgatatgaag	tcctgttcc	aaacaccccc	ttagcttgtc	atccgtagtt	atattccgaa	ttggaattca	atcctaaaaa
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1281	atagttcaat	ctttgcagtg	tggagttcaa	tgcacgtac	gcgtaccact	cccttttcgc	ctactttgac	cgtgacaacg
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1361	ttgctctcaa	gggattcgcc	aahtaagcca	tcaccacccc	tcattagcca	tcaccaagta	ggaaaattgt	cacccatgta
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1441	tcgataaatt	ctgttccttc	agattcttca	aagaatccag	cgatgaggag	agggatcacg	cagagaaact	catgaagtac
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1521	caggtaactt	tacctctgct	tcgtttggca	caccaggaaa	actgtaggct	gtaccactat	aatcatgcgc	ccaaatgcta

NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1601	aaactgccat	gttcttcttt	gtcagaacat	gcgtggaggc	aggggtgcggc	tccagtccat	cgtcacaccc	ttgacagagt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1681	tcgaccatcc	tgagaaaggg	gatgccttgt	atggtgagtt	gctttcagct	tgtcctatta	tctcttatgt	tttttatcc
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1761	atggtatatg	tacttgtgct	tctgcttacg	ccttactgtg	tgctagtctg	agtgtctggt	aattattatc	tatgtgaaaa
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1841	tttaagtgg	tggatcctta	aggttgggag	gagccctttt	tttggcaaga	acaggggaac	ttccttgggtg	aatgagctca
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1921	ttcgccatcc	agattcagca	aggatacttt	cctcttcaaa	agttccatgt	tgaatcctga	tgtcaattac	tctccgtttt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2001	ttaatgtatg	acgcggttaa	ctttttgaga	tacgtttaac	cattcgtctt	attcaaaaaa	tatatataat	tattatttat
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2081	tttattgtga	cttaatttat	catcaaagt	tctttaagcg	tgatttaaat	atttttatat	ttgcaaaaaa	aattgaataa
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2161	ggttaaacgt	taattaaana	gtcaacggcg	tcatacatta	taaaacgaag	ggagtaactt	tcaataaagg	ctactttggt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2241	ttgtaaaaagc	tttcttttaa	acattttgga	ctgcacagaa	aagattctct	aaattctaaa	cgctcctaaa	ggagaaaacg
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2321	tcattgtata	tttccatca	ttcacctta	tggcatttgc	tagtgtctcc	agaaagtagc	atgcactggc	tgtttgttgc
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2401	tgtacatacc	tgtacaaact	ttgtgttccc	ctatgtttta	ccctctagct	tgcttgtgat	ttcagctatg	gagttggcct
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2481	tggctctcga	aaagcttgta	aatgagaagt	tgcaaacct	gcacagtgt	agatattctc	ctggttatgca	gttatgcagt
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2561	aatgctgaac	atggatttag	aatgcgttgt	ataattctca	acactatttt	gaaaagaaat	atatggtgaa	acttgaaaat
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2641	gtgttgccgt	gaatcaacag	gtggcatcaa	ggtgcaatga	tccacagctg	accgacttcg	ttgagagtga	attccttgag
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

OsFer2	2721	gagcaggtaa	aaaaccttct	gcccaacttg	gtactgaact	agctcttgag	atgtaatat	tcaactgcta	tgcttttagtg
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2801	aattatgttt	tgctgaaaat	atctgccttg	ctctgaaagg	ttgAAGCCAT	CAAGAAGATC	TCTGAGTATG	TCGCCAGCT
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2881	GAGAAGAGTG	GGAAAGGGGC	ATGGTTAGTG	TGTTTTGTCA	GAAAATACTT	CATTTGATGT	ACTACCATCT	ATCTATAGAC
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2961	CTGTGGTTTG	ACTCATCAGT	TGTTGTTTGC	TACGTAATTT	GTGTTGCAGG	GGTGTGGCAC	TTTGATCAGA	AGCTGCTTGA
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3041	GGAAGAAGCT	TGAATGGAGG	AGACGGTGTG	AAGGGCAGTA	GTAGGTTTCG	TTTCTTCCAT	CCATGGGATC	ATGCAGCTAA
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3121	AGAAAGAAAA	TAAGTCGAGT	CTGTGTATTC	ATCAAATTA	GCA CGCAGTA	GCAATGGAGT	GAATGAACCA	ACCAATTGG
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3201	TCATGAACTT	CCCCCTGTGT	CTAGGTCAGT	AGAGCTTCAG	AATCATGTGT	ATGTCGCGCG	TCCTCGCAGA	AAAGGAACAT
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3281	GGCGCGGCTG	GCTGTAGCGA	TACTTGTGAT	ATTGTGGCTA	TGCATGGAGT	CATGGTGATG	GTGTATTTTG	GGGAGCATTT
NG0250_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3361	ACACGTTTGT	TGCTAGAGAG	ATTTTGCTGG	CAGCCAGTAA	GGAACAGTAT	GATAATCCAT	TGTGGTGTTA	ATGCTTGTTT
NG0250_FST	19	ACACGTTTGT	TGCTAGAGAG	ATTTTGCTGG	CAGCCAGTAA	GGAACAGTAT	GATAATCCAT	TGTGGTGTTA	ATGCTTGTTT
OsFer2	3441	CATCGTGCTT	ATGTCATGTT	CCTAGTAGTT	TATGTTAGTA	ACTCGAAGCC	TGGCAAGTTT	TTATGCATAT	ATGTCCTTT
NG0250_FST	99	CATCGTGCTT	ATGTCATGTT	CCTAGTAGTT	TATGTTAGTA	ACTCGAAGCC	TGGCAAGTTT	TTATGCATAT	ATGTCCTTT
OsFer2	3521	GCTT-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NG0250_FST	179	GCTTTGCTGC	CTCTGAAAGA	ACAGACAAAA	GAAAAGGAGA	GAGAAAAAGA	AGAGGATGGG	CCCATCAAGA	ATAATTGGGC
OsFer2	3525	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NG0250_FST	259	CTTAAGTGAC	AGCTTATGTT	TGAGTTTGAG	CCCACCTTTG	CTGGCGTGGT	GAGGCTCCAC	ATTATAACAC	GTCTATATCT
OsFer2	3525	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NG0250_FST	339	CTGCTATTAT	AAAAACGGAA	GATGTTTTTA	TCTGTATTTT	AGCACGTTAT	TTATGTTTGA	GTCGGTTTTT	AAGTTTTTTT
OsFer2	3525	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NG0250_FST	419	CTTGAAAATG	CAGATCCGTG	TTTGAGTTGG	TTTTTATGTC	CGTTCGCTTT	TAGAAATGCA	GAATGAATCG	TATGA-----
OsFer2	3525	---	---	---	---	---	---	---	---

NG0250_FST 494 ---

Tamanho do fragmento de PCR para o padrão tipo selvagem: 315pb
 Tamanho do fragmento de PCR para o padrão mutante: 156pb

Figura 15. Alinhamento da seqüência gênômica de *OsFer2* (GenBank Acc. No AF519571) com as FSTs das respectivas linhagens mutantes ND4539, NF2003 e NG0250. As setas em vermelho indicam o sítio de anelamento dos oligonucleotídeos para o gene *OsFer2*. A região de inserção do retroelemento **TOS17** está indicada no alinhamento. Em azul: posição dos exons. ATG em vermelho: códon de início de tradução. TGA em vermelho: códon de término de tradução. E1 – E8: posição dos exons no gene *OsFer2*.

OsFer1	1	aatt-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1	cgggaaggaa	tagtggttaa	gcttgaccga	ctccggtgcg	gccgggccg	gctccacatc	aaccaaccac	aagcccaaaa
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	81	tatcctctcc	agccacgagc	ccgccacgcg	ctccctcgcc	ttcgtcccat	ctcgaccgtc	cacgtgtggc	ccatccgtga
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	5	-----	-----	-----	-----	-----	----AATCTC	ATCACTCTTC	ACCCGCCGCG
OsFer2	161	gctccacgcg	cctatatcta	tcctttcta	tcacctccac	ccctaccacc	gcacAATCTC	ATCACTCTTC	ACCCGCCGCG
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	31	ac-----CTC	CGGAAGCAAA	CGCCACACGC	GCCTc-----	-----TCC	GCC ATGCTTC	CTCCTAGGGT	TGCCCCg---
OsFer2	241	ccgcgaaCTC	CGGAACCGAA	CGCCACACGC	GCCTtcctct	cacttaaTCC	GCC ATGCTTC	CTCCTAGGGT	TGCCCCctcc
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	91	-----G	CCGCCGCCGC	CGCCGCGCCT	ACCTATCTCG	CCGCCCGCGC	CTCGACCCCT	GCTTCCGTCT	GGCTGCCTGT
OsFer2	321	tctctggccG	CCGCCGCCGC	CGCCGCGCCT	ACCTATCTCG	CCGCCCGCGC	CTCGACCCCT	GCTTCCGTCT	GGCTGCCTGT
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	162	GCCGCGTGGt	gccggacccg	gGGCAGTGTG	CAGGGCCGCC	GGGAAAGGGA	AGGAGGTGCT	CAGCGGCGTG	GTCTTCCAGC
OsFer2	401	GCCGCGTGGa	gccggagccg	tGGCAGTGTG	CAGGGCCGCC	GGGAAAGGGA	AGGAGGTGCT	CAGCGGCGTG	GTCTTCCAGC
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	242	CATTCGAGGA	GCTCAAGGGG	GAGCTCTCCC	TCGTCCCCCA	GGCCAAGGAC	CAGTCTCTcG	CTAGGCAAAA	GTTTCGTCGAC
OsFer2	481	CATTCGAGGA	GCTCAAGGGG	GAGCTCTCCC	TCGTCCCCCA	GGCCAAGGAC	CAGTCTCTtG	CTAGGCAAAA	GTTTCGTCGAC

ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	322	GAGTGCAGAG	CCGCCATCAa	CGAGCAGATC	AAgTCTGTTT	TCCTCCTCCT	C---ACTCTG	CCTTCCATTT	TTGAATTCT
OsFer2	561	GAGTGCAGAG	CCGCCATCAg	CGAGCAGATC	AAgTCTGTTT	TCCTCCTCCT	CctcACTCTG	CCTTCCATTT	TTGAATTCT
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	399	ATCCCCCTTT	CATGTGCGCA	TTCTTCTTTC	TTCTTCTTTT	Tt-AATTTA	ACAAAAATCT	CTGTGCCTCC	TGGTCATTTT
OsFer2	641	ATCCCCCTTT	CATGTGCGCA	TTCTTCTGTC	TTCTTCTTTT	TtaaAATTTA	ACAAAAATCT	CTGTGCCTCC	TGGTCATTTT
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	478	ATTTTCTTTG	TTAGTGATTG	GATTTCGTAA	AGGGTtgCAT	TTTTCATCCT	ATAATAATTT	CTGCTCTTGG	GATGCGTCTG
OsFer2	721	ATTTTCTTTG	TTAGTGATTG	GATTTCGTAA	AGGGTt-CAT	TTTTCATCCT	ATAATAATTT	CTGCTCTTGG	GATGCGTCTG
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	558	TTCTACAGTG	CTTCAGATTT	CCCAAACAAT	TTTTTctttt	gaTACATGGA	CCAACGGATA	CAAAATTATT	TTAtTCCACA
OsFer2	800	TTCTACAGTG	CTGCAGATTT	TCCCAAACAT	TTTTTt----	--TACATGGA	CCAACGGATA	CAAAATTATT	TTAgTCCACA
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	638	ATAATTGATG	TAAATAGGAG	AAAAGACACT	-GTGCTTAGC	TATAT-----	-----	-----	-----
OsFer2	874	ATAATTGATG	TAAATAGGAG	AAAAGACACT	tGTGCTTAGC	TAAATttaga	ccctgtttag	atgggactaa	aacctcttta
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	682	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	954	gtccgatggt	tggacactaa	ttataaatat	taaacgcgga	ctattaataa	aaccattct	ataacctgaa	ttaatcgcg
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	682	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1034	agacgaatct	attgagtcta	attaatccat	gattagccta	tgatcatgcta	cagtaaacad	gcgctaatta	tggattaaatt
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	682	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	1114	aggcttaaaa	aaatttgtea	cgcaattag	ctctcattta	tgtaattagt	tttataagta	gtctattttc	aatACTCCAA
ND4539_FST	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---ACTCCAA
3									
									
OsFer1	682	-----	-----	-----	-----TTA	GCTTGTATC	CGttcTAGTT	ATATTCCGAA	TTGGAATCA
OsFer2	1194	ATTCATCCGA	TATGAAGTCC	CTGTTCCAAA	CACCCCCTTA	GCTTGTATC	CG---TAGTT	ATATTCCGAA	TTGGAATCA
ND4539_FST	8	ATTCATCCGA	TATGAAGTCC	CTGTTCCAAA	CACCCCCTTA	GCTTGTATC	CG---TAGTT	ATATTCCGAA	TTNNAATCA
OsFer1	725	ATCCTAAAAA	AgAGTTCAAT	CTTTGCAGTG	TGGAGTACAA	TGCATCGTAC	GCGTACCACT	CCCTTTTCGC	CTACTTTGAC
OsFer2	1271	ATCCTAAAAA	ATAGTTCAAT	CTTTGCAGTG	TGGAGTTCAA	TGCATCGTAC	GCGTACCACT	CCCTTTTCGC	CTACTTTGAC
ND4539_FST	85	ATCCTAAAAA	ATAGTTCAAT	CTTTNCANTG	TGGAGTTCAA	TGCATCGTAC	GCGTACCACT	CCCTTTTCGC	CTACTTTGAC

2

→

OsFer1	805	CGTGACAACG	TTGCTCTCAA	GGGATTCGCC	AAGTAAGCCA	TCACCACCct	catTTAGTCA	TCACCAAGTA	GGAAAATTGT
OsFer2	1351	CGTGACAACG	TTGCTCTCAA	GGGATTCGCC	AAGTAAGCCA	TCACCACCCC	TCATTAGCCA	TCACCAAGTA	GGAAAATTGT
ND4539_FST	165	CGTGACAACG	TTGCTCTCAA	GGGATTCGCC	AAGTAAGCCA	TCACCACCCC	TCATTAGCCA	TCACCAAGTA	GGAAAATTGT
OsFer1	885	CACtCATGTA	TCGACAAATT	CTGTTcCTTC	AGATTCTTCA	AAGAATCCAG	CGATGAGGAG	AGGGATCACG	CAGAGAAACT
OsFer2	1431	CACCCATGTA	TCGATAAATT	CTGTTcCTTC	AGATTCTTCA	AAGAATCCAG	CGATGAGGAG	AGGGATCACG	CAGAGAAACT
ND4539_FST	245	CACCCATGTA	TCGATAAATT	CTGTTcCTTC	AGATTCTTCA	AAGAATCCAG	CGATGAGGAG	AGGGATCACn	CAGAGAAACT
OsFer1	965	CATCAAGTAC	CAGGTAACtT	TACCTCTGCT	gccaaTTGGC	ACACCAGGAA	AACTGTACGC	TGTACCACTA	TAATCATGCA
OsFer2	1511	CATGAAGTAC	CAGGTAACtT	TACCTCTGCT	TCGT-TTGGC	ACACCAGGAA	AACTGTAGGC	TGTACCACTA	TAATCATGCG
ND4539_FST	325	CATGAAGTAC	CAGGTAACtT	TACCTCTGnT	TCGT-TTGGC	A TOS17 ----	-----	-----	-----
OsFer1	1045	CCCAAATGCT	AATACTGCAA	TGTTCTTCTT	TGTCAGAACA	TGCGTGGAGG	CAGGGTGCGG	CTCCAGTCCA	TCGT CACACC
OsFer2	1590	CCCAAATGCT	AAAActGCCA	TGTTCTTCTT	TGTCAGAACA	TGCGTGGAGG	CAGGGTGCGG	CTCCAGTCCA	TCGT CACACC
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1125	TTTGACAGAG	TTCGACCATC	CTGAGAAAGG	GGATGCCTTG	TATGGTGAGT	TGCTTTcAGC	TTGTcCTATa	-----TATG
OsFer2	1670	CTTGACAGAG	TTCGACCATC	CTGAGAAAGG	GGATGCCTTG	TATGGTGAGT	TGCTTTcAGC	TTGTcCTATt	atctctTATG
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1199	TTTTTTATTC	CATGGTATAT	GTACTTATGC	TTCTG-----	--CTTACTGT	GTGCTAGTCT	GAGTGTCTGc	ctgттаATTA
OsFer2	1750	TTTTTTATTC	CATGGTATAT	GTACTTGTGC	TTCTGcttac	gcCTTACTGT	GTGCTAGTCT	GAGTGTCTGt	taatt-ATTA
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1272	TCTATGTGAA	AATT-AAGTG	GCTCAATCCT	TAAGGTTGGG	AGGAGCCTTT	TTTTTttttt	ttttttttGC	AAAAACAGGG
OsFer2	1829	TCTATGTGAA	AATTtAAGTG	GTTGATCCT	TAAGGTTGGG	AGGAGCCCTT	TTTTTg----	-----GC	AAGAACAGGG
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1351	GAACTTCCTT	GGTGAATGAG	CTCATTCGCC	ATCCAGATTC	AACAGGGATA	CTTTCCTCTT	CAAAAGTTC	ATGTTGAATC
OsFer2	1897	GAACTTCCTT	GGTGAATGAG	CTCATTCGCC	ATCCAGATTC	AGCAAGGATA	CTTTCCTCTT	CAAAAGTTC	ATGTTGAATC
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1431	CTGATGTCAA	TTACTccCTC	CGTTTTTTAA	TGTATGACGC	GATTAACtTT	T-----	---AACCATT	TGTCTTATTC
OsFer2	1977	CTGATGTCAA	TTACT--CTC	CGTTTTTTAA	TGTATGACGC	GGTTAACtTT	Ttgagatacg	tttAACCATT	CGTCTTATTC
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

←

1

OsFer1	1499	AAAt-ATATA	TATAtatata	tatatatata	tatatgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtatata	tgtaATTATT	TATTTTATTG
OsFer2	2055	AAAAaATATA	TATAaatt---	-----	-----	-----	-----	----ATTATT	TATTTTATTG
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1578	TGACTTAATT	TATCATCAAA	TGTTCTTTAA	GCGTGATTTA	AATATTTTTA	TATTTGCAAA	AAAA-----	--AGGTTAAA
OsFer2	2088	TGACTTAATT	TATCATCAAA	TGTTCTTTAA	GCGTGATTTA	AATATTTTTA	TATTTGCAAA	AAAAaattgaa	taAGGTTAAA
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1650	CGTTGATTAA	AAAGACAACG	GCGTCGTACA	TTaaAAAACG	AAGGGAGTAA	CTTTCAATAA	AGGCTACTTT	GTTTtgtag-
OsFer2	2168	CGTTAATTAA	AAAGTCAACG	GCGTCATACA	TTatAAAACG	AAGGGAGTAA	CTTTCAATAA	AGGCTACTTT	GTTTtgtaaa
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1729	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2248	agctttcttt	taaacatttt	ggactgcaca	gaaaagattc	tctaaattct	aaacgctcct	aaaggagaaa	acgtcattgt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1729	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2328	atattttcca	tcatttcacc	ttatggcatt	tgctagtgtc	tccagaaagt	agcatgcact	ggctgtttgt	tgctgtacat
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1729	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	2408	acctgtacaa	actttgtgtt	cccctatggt	ttaccctcta	gcttgcttgt	gatttcagct	atggagttgg	ccttggctct
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1729	----AAGCTT	GTAATGAGA	AGTTGCACAA	CCTGCACAGT	GTAAGATATT	CTCCTGTTAT	GCAGTAATGC	-----TG
OsFer2	2488	cgaaAAGCTT	GTAATGAGA	AGTTGCACAA	CCTGCACAGT	GTAAGATATT	CTCCTGTTAT	GCAGTTATGC	agtaatgcTG
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1797	AACATGGATT	TAGAATGTGT	TGTATAATTC	TCAACACTAT	TTTGAAAAGA	AATATATGGT	GAAACTTGAA	AATGTGTTgc
OsFer2	2568	AACATGGATT	TAGAATGCGT	TGTATAATTC	TCAACACTAT	TTTGAAAAGA	AATATATGGT	GAAACTTGAA	AATGTGTTgc
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1877	tGTGAATCAA	CAGGTGGCAT	CAAGGTGCAA	TGATCCACAG	CTGACCGACT	TCGTTGAGAG	CGAATTCCTT	GAGGAGCAGG
OsFer2	2648	cGTGAATCAA	CAGGTGGCAT	CAAGGTGCAA	TGATCCACAG	CTGACCGACT	TCGTTGAGAG	TGAATTCCTT	GAGGAGCAGG
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	1957	T-AAAAACCT	TCTGCCCACT	TGGGTACTGA	ACTAGCTCTT	GAgatgttaA	ATATTCAACT	GCTGTGCTTT	AGTGAAGTAT
OsFer2	2728	TaAAAAACCT	TCTGCCCACT	TGGGTACTGA	ACTAGCTCTT	GAgatgtt-A	ATATTCAACT	GCTATGCTTT	AGTGAATTAT
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2036	GTTTTGCTGA	AAATATCTGC	CTTGCTCTGA	AAGGTTGAAG	CCATCAAGAA	GATCTCTGAG	TATGTCGCC	AGCTGAGAAG
OsFer2	2807	GTTTTGCTGA	AAATATCTGC	CTTGCTCTGA	AAGGTTGAAG	CCATCAAGAA	GATCTCTGAG	TATGTCGCC	AGCTGAGAAG

ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2116	AGTGGGAAAG	GGGCATGGTT	AGTGTGTTTT	GTCAGAAAAT	ACTTCATTTG	ATGTACTACC	ATCTATCTAT	AGACCTGTGG
OsFer2	2887	AGTGGGAAAG	GGGCATGGTT	AGTGTGTTTT	GTCAGAAAAT	ACTTCATTTG	ATGTACTACC	ATCTATCTAT	AGACCTGTGG
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2196	TTTGACTCAT	CAGTTGTTGT	TTGCTACGTA	ATTTGTGTTG	CAGGGGTGTG	GCACCTTTGAT	CAGAAGCTGC	TTGAGGAAGA
OsFer2	2967	TTTGACTCAT	CAGTTGTTGT	TTGCTACGTA	ATTTGTGTTG	CAGGGGTGTG	GCACCTTTGAT	CAGAAGCTGC	TTGAGGAAGA
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2276	AGCTTGA---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3047	AGCTTGAatg	gaggagacgg	tgtgaagggc	agtagtaggt	ttcgtttctt	ccatccatgg	gatcatgcag	ctaaagaaag
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2283	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3127	aaaataagtc	gagtctgtgt	attcatcaaa	ttaagcacgc	agtagcaatg	gagtgaatga	accaaccaat	ttggtcatga
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2283	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3207	acttccccct	gtgtctaggt	cagtagagct	tcagaatcat	gtgtatgtcg	cgcgtcctcg	cagaaaagga	acatggcgcg
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2283	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3287	gctggctgta	gcgatacttg	tgatattgtg	gctatgcatg	gagtcatggt	gatgggtgat	tttggggagc	atttacacgt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2283	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3367	ttgttgctag	agagattttg	ctggcagcca	gtaaggaaca	gtatgataat	ccattgtggt	gttaatgctt	gtttcatcgt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer1	2283	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OsFer2	3447	gcttatgtca	tgttcctagt	agtttatggt	agtaactcga	agcctggcaa	gtttttatgc	atatatgtcc	ctttgctt
ND4539_FST	365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 16. Projeto de oligonucleotídeo para diferenciar indivíduos homozigotos de heterozigotos da linhagem mutante Tos17 ND4539 para o gene *OsFer2* (GenBank Acc. No AF519571) somente. Em verde, o oligonucleotídeo forward (3), que é capaz de hibridizar somente na sequência do gene *OsFer2*. Em vermelho, oligonucleotídeos (1 e 2), sugeridos pelo banco de mutantes TOS17 do RGRG. Em azul, posição dos exons nos dois genes. ATG em vermelho: códon de início de tradução. TGA em vermelho: códon de término de tradução.

CAPÍTULO III

Análise de expressão dos genes de ferritina em plantas de arroz Nipponbare cultivadas sob excesso de ferro.

O ferro é um micronutriente essencial, mas tanto sua falta quanto o excesso são prejudiciais ao ambiente celular. A proteína ferritina destaca-se por desempenhar papel importante na homeostase deste elemento. Ela acumula ferro de maneira segura e torna-o disponível quando necessário. Cada molécula de ferritina pode acumular aproximadamente 4500 átomos de ferro (Briat e Lobréaux, 1997). Segundo a literatura, os genes da família das ferritinas têm sua expressão modulada por fatores abióticos e bióticos. Esses genes podem ter sua expressão modulada por ferro, ácido abscísico, indiretamente por patógenos quando uma planta é desafiada, por óxido nítrico e no desenvolvimento de nódulos em plantas de soja (Kimata and Theil, 1994; Fobis-Loisy et al. 1995; Déak et al. 1999; Petit et al. 2001; Dellagi et al. 2005; Arnaud et al. 2006). Especialmente o metal ferro tem papel modulador na regulação da expressão da ferritina. Em um trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo, foi observado que plantas cultivadas sob uma condição de deficiência de ferro têm a expressão da ferritina inibida (Sperotto et al., 2007). Por outro lado, plantas cultivadas sob uma condição de excesso de ferro têm a expressão da ferritina aumentada (Petit et al, 2001).

Este capítulo tem como objetivo descrever a caracterização preliminar da expressão do gene de ferritina em plantas de arroz da cultivar Nipponbare, pois é relevante obter-se tais dados para posterior comparação com as plantas transgênicas silenciadas e com as plantas mutantes homozigotas para os genes de ferritina.

Objetivo

- Analisar por RT-PCR semiquantitativo a expressão dos genes *OsFer1* e *OsFer2* da ferritina de arroz Nipponbare em plantas cultivadas em meio hidropônico sob diferentes concentrações de ferro.

Material e métodos

Cultivo das plantas

Sementes de arroz, da cultivar Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. *japonica* L.), foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido estéril, em B.O.D. a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 48 h escuro/ 48 h luz. Após esse período, as sementes germinadas foram transferidas para o substrato vermiculita pelo período de 10 d, mantendo-se úmido o substrato com solução nutritiva (Yoshida et al., 1976). Estas plantas foram transferidas para meio hidropônico contendo solução modificada de Yoshida (Yoshida et al., 1976) pelo período de 13 d. Em seguida, as plantas foram transferidas para meio hidropônico contendo os tratamentos.

Tratamentos

As plantas de arroz Nipponbare foram transferidas para meio hidropônico contendo os seguintes tratamentos: I - controle (5,6 ppm de FeSO_4); II – 50 ppm de FeSO_4 ; III – 500 ppm de FeSO_4 . Foram utilizadas 4 plantas por tratamento, sendo que cada amostra foi composta por duas plantas que foram coletadas para posterior extração de RNA total. As raízes foram separadas das partes aéreas.

Extração de RNA total

As plantas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Até o momento da extração, as amostras foram conservadas em freezer – 80°C . Os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido até completa pulverização. Aproximadamente 100 mg de tecido macerado foi incubado e misturado com 1 mL do reagente Trizol por 5 min em microtubos (autocalvados a 120°C por 20 min) a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μl de clorofórmio ao homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por aproximadamente 3 min. Após centrifugação refrigerada (4°C) a $12.000 \times g$ por 15 min; 550 μl de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e misturados numa relação 1/1 (v/v) com isopropanol

e centrifugados a 4° C, a 12.000x g por 40 min. O isopropanol foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 8.000 x g por 5min. O novo precipitado foi seco a vácuo por aproximadamente 10 min e ressuscitado em 50 µl (parte aérea) e 40 µl (raiz) de água MilliQ autoclavada (120° C/ 20 min). Para facilitar a ressuspensão, as amostras de RNA extraídas foram incubadas a 65° C por 10 min. As análises quantitativas e qualitativas foram realizadas por espectrofotometria (leituras a 260 nm e 280 nm) e em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Síntese de cDNA a partir de RNA total

A síntese da primeira fita de cDNA, a partir de RNA total, foi realizada utilizando-se a enzima Superscript II, seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen). Foram realizadas duas sínteses de cDNA a partir de 2 amostras independentes do mesmo tratamento. Foi utilizada uma quantidade inicial de 2 µg de RNA total, oligonucleotídeo Poli – T₍₁₈₎ em um volume final de 20 µl.

Oligonucleotídeos utilizados e análise por RT-PCR

Os oligonucleotídeos utilizados foram os seguintes: OsFer R; OsFer F para ferritina; OsACT1 R e OsACT1 F para actina como controle interno (Tabela 5). Inicialmente foi estabelecido o número ideal de ciclos da PCR (ainda na fase exponencial, antes de atingir o “plateau”) para avaliação da expressão de cada um dos genes nas condições experimentais citadas acima. As reações de RT-PCR foram realizadas seguindo-se estas condições: 2,5 µl de tampão 10 X; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de dNTPs 10 mM; 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM); 0,2 µl de Enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl); 1 µl da primeira fita de cDNA; água para 25 µl de volume final. Os produtos da RT-PCR amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, utilizando-se como padrão de tamanho de fragmento o marcador Ladder 100 pb.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão da ferritina por RT-PCR semi-quantitativo.

Nomenclatura do gene	Seqüência dos oligonucleotídeos (5' para 3')
OsFer F	CCAAAGGAAGGAGGTGCTC
OsFer R	GGAATTCGCTCTCAACGAAG
OsAct1 R	CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA
OsAct1 F	CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA

Resultados

A exposição das plantas a níveis crescentes de ferro foi acompanhada por aumento da expressão de ferritina na parte aérea, tanto após 6 horas quanto após 12 horas de exposição aos tratamentos (Figura 17). O maior nível de transcrito da ferritina nas amostras das plantas que não foram submetidas aos tratamentos (amostra 1, tempo T0) pode ser decorrente, em parte, de uma maior quantidade de cDNA total nessas amostras em comparação com as amostras controle, 50 ppm de FeSO₄ e 500 ppm de FeSO₄, pois as mesmas apresentaram a banda relativa ao controle interno de actina também com maior intensidade.

No experimento de 24 h e 48 h, que foi realizado de forma independente do anterior, não foi detectada diferença dentre os tratamentos em relação à expressão de ferritina nas partes aéreas das plantas (Figura 18).

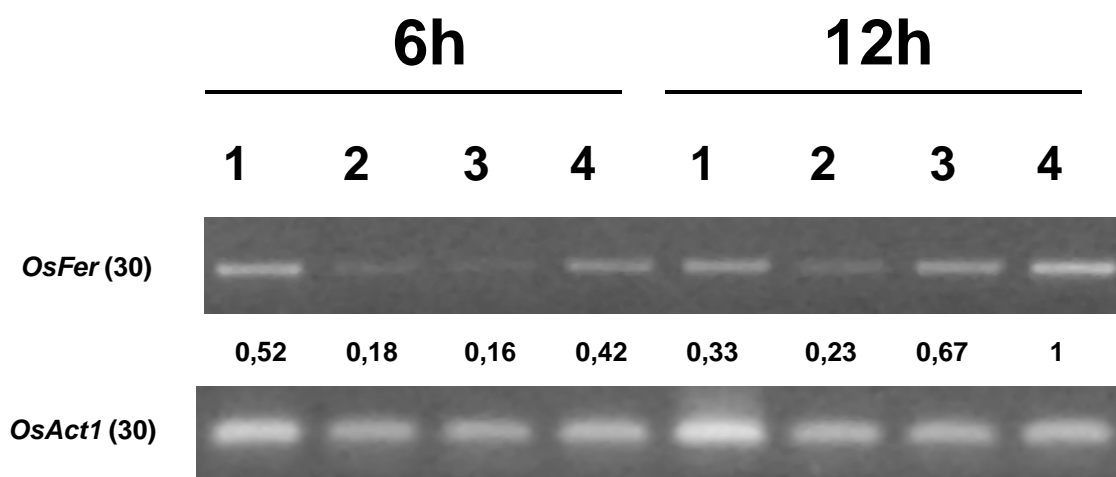


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da RT-PCR de *OsFer* e *OsAct1*. As extrações de RNA total foram realizadas de partes aéreas de plantas coletadas no início dos tratamentos (1) e após 6h e 12h de exposição aos tratamentos. (2): 5,6 ppm de FeSO_4 ; (3): 50 ppm de FeSO_4 ; (4): 500 ppm de FeSO_4 . Os números entre parênteses ao lado dos nomes dos genes indicam o número de ciclos da RT-PCR. A intensidade das bandas de cada produto de PCR foi normalizada em relação à densidade óptica obtida para o gene de actina. Os números abaixo de cada canaleta representam porcentagens em relação à densidade óptica normalizada de valor mais alto.

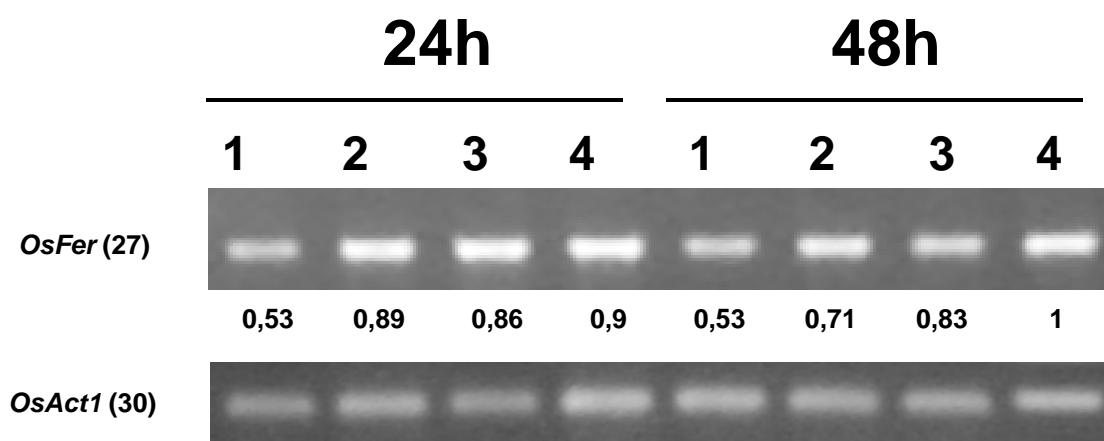


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da RT-PCR de *OsFer* e *OsAct1*. As extrações de RNA total foram realizadas de partes aéreas de plantas coletadas no início dos tratamentos (1) e após 24h e 48h de exposição aos tratamentos. (2): 5,6 ppm de FeSO_4 ; (3): 50 ppm de FeSO_4 ; (4): 500 ppm de FeSO_4 . Os números entre parênteses ao lado dos nomes dos genes indicam o número de ciclos da RT-PCR. A intensidade das bandas de cada produto de PCR foi normalizada em relação à densidade óptica obtida para o gene de actina. Os números abaixo de cada canaleta representam porcentagens em relação à densidade óptica normalizada de valor mais alto.

Discussão

Com exposição de 6 h e 12 h aos tratamentos (Figura 17), observou-se aumento de expressão da ferritina em partes aéreas das plantas de arroz cultivadas sob alta concentração de ferro (50 e 500 ppm) em meio hidropônico em relação às plantas cultivadas na condição controle. Em folhas de milho foi observado um aumento transiente de mRNA de ferritina em até 24 h e um acúmulo da proteína em até três dias, em resposta ao tratamento com excesso de ferro (Lobréaux et al., 1992). Em mutantes *ys1* (Yellow Stripe1) de milho, que são ineficientes no transporte

de Fe (III) complexado a ácido muginéico, houve acúmulo de mRNA de ferritina em folhas coletadas 9h após o tratamento com excesso de ferro. Após esse período, foi detectado um decréscimo no nível de mRNA (Fobis-Loisy et al., 1996). As condições experimentais destes trabalhos se assemelham às condições de nosso experimento em termos de cultivo, pois as plantas de milho foram mantidas em cultura hidropônica sob uma condição de excesso de ferro. Apesar de não terem sido utilizadas linhagens mutantes em nosso experimento, como no trabalho de Fobis-Loisy et al. (1996), os resultados obtidos são semelhantes.

Ainda há poucos trabalhos que relatam sobre o aumento de expressão da ferritina em plantas de arroz sob condições de estresse abiótico. Há dois exemplos na literatura, um que relata o aumento da expressão de ferritina em plantas de arroz sob uma condição de excesso de ferro a partir da análise de um microarranjo (Rabani et al. 2003) e o outro, de caracterização e sequenciamento de proteínas em plantas de arroz sob condições de estresse salino (Parker et al. 2006).

Em plantas de milho, cultivadas em meio hidropônico contendo alta concentração de ferro, o gene *ZmFer1* apresentou um maior nível de expressão em comparação com a outra cópia presente no genoma (Fobis-Loisy et al., 1995). É relevante salientar que no gene *ZmFer1* há uma seqüência 5'UTR denominada IDRS (Iron Dependent Regulatory Sequence), que está ausente na outra cópia (*ZmFer2*). Esta seqüência foi caracterizada por mutagênese sítio-dirigida como sendo um *cis*-elemento responsivo a ferro (Petit et al., 2001). Plantas de *Arabidopsis* em culturas hidropônicas contendo excesso de ferro também apresentaram comportamento similar ao de milho e de arroz. Das quatro cópias para o gene da ferritina presente em *Arabidopsis*, somente a *AtFer2* não teve expressão induzida no experimento realizado com plantas cultivadas até 12 h sob a condição de excesso de ferro (Petit et al. 2001). No genoma do arroz também foram caracterizadas duas cópias, *OsFer1* e *OsFer2* (Gross et al., 2003) e *cis*-elementos responsivos a estresses abióticos (Rabani et al., 2003). Entretanto, como as duas cópias são muito similares (96% de identidade; Gross et al. 2003; Yu et al. 2005) torna-se difícil a caracterização da expressão dos dois genes em separado. Os resultados mostrados neste trabalho não permitem a conclusão de que há expressão diferencial dos genes para ferritina de arroz (Figuras 17 e 18). Para tal será necessário o uso de uma estratégia que permita amplificar fragmentos específicos e de tamanhos diferentes de cada um dos mRNAs de ferritina.

Em cultura de células de soja, também foi observado um comportamento semelhante aos resultados de nosso experimento, pois foi detectado por “northern blot”, um aumento de ferritina em 15 h após o tratamento com excesso de ferro. De 15 h até a última avaliação de expressão em 48 h, houve um decréscimo no nível de mRNA (Lescure et al., 1991). Entretanto, estas condições experimentais não devem refletir as mesmas condições experimentais em culturas hidropônicas. Nos experimentos de hidroponia são avaliadas plantas e/ ou órgãos de plantas, com características fisiológicas distintas de culturas de células. Ao mesmo tempo, podemos apenas especular tal semelhança com o comportamento da expressão da ferritina em arroz, pois não avaliamos o comportamento da ferritina em até 48 h na mesma repetição do experimento (Figura 17).

No outro experimento de caracterização da expressão da ferritina (Figura 18), não foram observadas diferenças significativas ao nível de mRNA em partes aéreas submetidas a níveis elevados de ferro. Sugere-se que há uma estabilização no acúmulo de mRNA de ferritina em plantas de arroz cultivadas em meio hidropônico após 24 h de exposição aos tratamentos. Lescure et al. (1991) observaram, em culturas de células de soja sob excesso de ferro, um decréscimo no nível de mRNA de ferritina a partir de 15 h. Porém, como no caso de nosso experimento, estes resultados podem não refletir os resultados encontrados em culturas hidropônicas.

A maioria dos autores observou que, em folhas de plantas, há um pico de expressão de ferritina em 12 h após o tratamento com ferro. Após esse período há uma estabilização no acúmulo ou há um decréscimo de mRNA (Lescure et al. 1991; Fobis-Loisy et al. 1995; Petit et al. 2001; Motta et al. 2001). Os nossos resultados demonstram que há semelhança em relação aos encontrados na literatura, especialmente no experimento de 6 h e 12 h (Figura 17). Sugere-se que o aumento em poucas horas dos níveis de ferritina em plantas, em resposta ao excesso de ferro, seja rápido o suficiente para que a proteína desempenhe seu papel de acumular ferro de uma forma segura, evitando a presença de níveis tóxicos de ferro livre intracelular.

Considerações finais

Apesar do ferro ser um micronutriente essencial, sua concentração celular deve ser regulada finamente. As formas livres de ferro intracelular podem ocasionar danos resultantes de processos oxidorreduativos irreversíveis a vários componentes fundamentais à sobrevivência da célula, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Dentro deste contexto, a proteína ferritina, que é capaz de acumular ferro de uma forma segura e biologicamente disponível à célula, desempenha papel crucial.

A ferritina, em animais e vegetais, foi amplamente caracterizada, porém, em arroz ainda há poucos estudos que revelam sua importância na interação ferro planta. Por isso, foram utilizadas duas abordagens de genética reversa com o objetivo de caracterizar funcionalmente a ferritina em plantas de arroz *japonica* variedade Nipponbare.

A primeira abordagem consistiu da geração de plantas transgênicas silenciadas para ambos os genes de ferritina caracterizados em arroz. Foi possível identificar diminuição da expressão da ferritina nos transformantes primários (17 plantas). Nenhuma anormalidade morfológica clara foi identificada nas plantas transgênicas em comparação com as plantas não-transformadas. Especula-se que possa haver algum mecanismo compensatório nas plantas com baixo nível de ferritina, pois, em plantas não transformadas, esta proteína tenderia a acumular o excesso de ferro. Este mecanismo compensatório poderia incluir maior alocação de ferro para os vacúolos, através do aumento da atividade de transporte de uma proteína de arroz, ortóloga à VIT1, recentemente identificada em *Arabidopsis*. Análises posteriores com as plantas transgênicas devem ser realizadas, para confirmar a redução de expressão de ferritina e testar nossa hipótese de mudança de rota de transporte de ferro. Outros experimentos, como submeter as plantas silenciadas para ferritina a condições de estresse abiótico, também devem ser conduzidos. Estes experimentos teriam como objetivo verificar se plantas de arroz com baixos níveis de ferritina comportam-se como mais susceptíveis aos estresses do que plantas não-transformadas.

A segunda abordagem teve como objetivo a caracterização *in silico* e molecular de mutantes insercionais TOS17 em arroz. Nos mutantes da linhagem ND4539, ainda não foi possível identificar mutantes homocigotos para o gene *OsFer2*, devido à alta similaridade entre as duas cópias da ferritina (com

amplificação da banda tipo selvagem do gene *OsFer1* nos mutantes homozigotos para inserção em *OsFer2*). O baixo número de indivíduos utilizados na análise molecular por PCR (baixa germinação das sementes recebidas) resultou na dificuldade de identificação de mutantes homozigotos das outras duas linhagens. Alguns trabalhos vêm utilizando centenas de segregantes para as mutações insercionais, o que aumenta a probabilidade de identificação de plantas homozigotas para a inserção quando esta não for letal.

A caracterização dos níveis de expressão da ferritina em plantas de arroz Nipponbare, cultivadas em meio hidropônico contendo diferentes concentrações de ferro, foi realizada por RT-PCR semi-quantitativo. Os resultados estão de acordo com a literatura. Há aumento de expressão da ferritina à medida que aumenta a concentração de ferro no meio de cultivo nas primeiras horas de exposição aos tratamentos. Após 24 h, parece haver uma estabilização da quantidade de mRNA de ferritina, mesmo com o aumento da concentração de ferro no meio de cultivo. A expressão de ferritina em plantas de arroz da cultivar Nipponbare, submetidas a outros tratamentos também deverá ser investigada, e o padrão de expressão comparado com as plantas silenciadas (transgênicas) e com as plantas mutantes homozigotas (com inserção do elemento TOS17).

Perspectivas

- confirmar a redução no nível de expressão nas plantas transgênicas silenciadas para o gene da ferritina e nas demais plantas ainda não analisadas;
- Verificar se houve aumento de expressão do gene *OsVIT1* (transportador vacuolar de ferro) nas plantas transgênicas silenciadas para o gene *OsFer*;
- Submeter as plantas transgênicas silenciadas para ferritina a condições de estresse;
- Identificar plantas homozigotas para o gene *OsFer2* nas linhagens mutantes TOS17;
- Confirmar os resultados obtidos nos experimentos de expressão de ferritina em partes aéreas de plantas de arroz cultivadas em meio hidropônico sob altas concentrações de ferro.

Referências Bibliográficas

Agrawal G K, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Myiao A, Hirochika H. (2001) Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon TOS17 insertion. Tagging of a Zeaxanthine Epoxidase gene and a novel OsTATC gene. *Plant Physiology* 125: 1248 – 1257.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal Molecular Biology* 3: 403 – 410.

An S, Park S, Jeong D-H, Lee D-Y, Kang H-G, Yu J-H, Hur J, Kim S-R, Kim Y-H, Lee M, Han S, Kim S-J, Yang J, Kim E, Wi S J, Chung H S, Hong J-P, Choe V, Lee H-K, Choi J-H, Nam J, Kim S-R, Park P-B, Park K Y, Kim W T, Choe S, Lee C-B, An G. (2003) Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiology* 143: 2040 – 2047.

Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression. *Journal Biological Chemistry* 281: 23579 – 23588

Barceló F, Miralles F, Areán C O. (1997) Purification and characterization of ferritin from alfalfa seeds. *Journal of Inorganic Biochemistry* 66: 23 – 27.

Briat J-F, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoiron S, von Wíren N, Wuytswinkel O V. (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol Cell* 84: 69 – 81.

Briat J-F and Lobréaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science* 2: 187 – 193.

Briat J-F and Lebrun M. (1999) Plant responses to metal toxicity. *Sciences de la Vie* 322: 43 – 54.

Briat J-F. (2006) Cellular and whole organism aspects of iron transport and storage in plants. In: Tamás M J and Martinoia E. (Eds) *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 194 – 213.

Bruggemann W, Mass-Kantel K, Moog P R (1993) Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of plasma membrane-bound ferric-quelate reductase. *Planta* 190: 151 – 155.

Buchanan-Wollaston V (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* 33: 821 – 834.

Cataldo D A, McFadden K M, Garland T R, Wildung R E. (1988) Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology* 86: 734 – 739.

Chen J, Tang W-H, Hong M-M, Wang Z-Y (2003) *OsBP-73*, a rice gene, encodes a novel DNA-binding protein with a SAP-like domain and its genetic interference by double stranded RNA inhibits rice growth. *Plant Molecular Biology* 52: 579 – 590.

Chu C. C., Wang C. S., Sun C. S., Hsu C, Yin K. C, Chu C. Y, Bi F. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18: 659 – 668.

Chuang C-F and Meyerowitz E M (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* *Proc Natl Acad Sci* 97: 4985 – 4990.

Cohen C K, Garvin D F, Kochian L V (2004) Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* 218: 784 –792.

Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Biasiotto, Arosio P (2004) Analysis of the biologic functions of H- and L-ferritin in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: evidence for a proliferative role of L-ferritin *BLOOD* 103: 2377 - 2383

Crichton R R, Ponce-Ortiz Y, Koch M H J, Parfait R, Stuhmann H B. (1978) Isolation and characterization of phytoferritin from pea (*Pisum sativum*) and lentil (*Lens esculenta*). *Biochemical Journal* 171: 349 – 356.

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta S L, Briat J-F, Walker E L (2001) Maize yellow stripe 1 encodes a membrane protein involved in Fe (III) uptake. *Nature* 18: 346 – 349.

Déak M, Horváth G V, Davletova S, Török K, Sass L, Vass I, Barna B, Király, Dudits D (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature* 17: 192 – 196

Dellagi A, Rigault M, Segond d, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat J-F, Gaymard f, Expert D (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant Journal* 43: 262 – 272

DiDonato R J Jr, Roberts L A, Sanderson T, Easley R B, Walker E L. (2004) *Arabidopsis* yellow stripe Like 2 (YSL2): a metal regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine metal-transporters. *Plant Journal* 39: 403 – 414.

Droc G, Ruiz M, Larmande P, Pereira A, Piffanelli P, Morel J B, Deivart A, Courtois B, Guiderdoni A, Périn C. (2006) OryGenesDB: a database for rice reverse genetics. *Nucleic Acids Research* 34: D736 – D740.

Eckhardt U, Mas Marques A, Buckhout T J (2001) Two iron regulated cation transporters from tomato complement metal uptake deficient from yeast mutants. *Plant Molecular Biology* 45: 437 – 448.

Eide D, Broderius M, Fett J P, Guerinot M L (1996) A novel iron regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 28: 5624 – 5648.

Ferreira C, Bucchini D, Martin M-E, Levi S, Arosio P, Grandchamp, Beaumont C (2000) Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *Journal Biological Chemistry* 275: 3021 – 3024

Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Cenaorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806 – 811.

Fobis-Loisy I, Aussel L, Briat J-F (1996) Post-transcriptional regulation of plant ferritin accumulation in response to iron as observed in the maize mutant *ys1*. *FEBS Letters* 397: 149 – 154.

Fobis-Loisy I, Loridon K, Lobréaux S, Lebrun M, Briat J-F (1995) Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *European Journal of Biochemistry* 231: 609 – 619.

Fu-zhen L, Song-heng J, Guo-cheng H, Ya-ping F, Hua-min S, De-an J, Zong-xiu S. (2005) Isolation and physiological characterization of a premature senescence mutant in rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Zhejiang University Science* 6B: 803 – 811.

Gilissen L J W J, Bolhaar S T H P, Matos C I, Rouwendal G J A, Boone M J, Krens F A, Zuidmeer L, van Leeuwen A, Akkerdaas J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst A C, Bosch D, van de Weg E, van Ree R (2005) Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115: 364 – 369.

Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17: 282 – 286.

Gross J, Stein R J, Fett-Neto A, Fett J P (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology* 26: 477 – 497

Grossman M J, Hinton S M, Minak-Bernero V, Slaughter C, Stiefel E I. (1992) Unification of the ferritin family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 2419 – 2423.

Grusak M A, Pearson J N, Marentes E. (1999) The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Research* 60: 41 – 56.

Hamilton A J and Baulcombe D C (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950 – 951.

Harrison P M and Arosio P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1275: 161 – 203.

Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422: 719 - 722

Hell R and Stephan U W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216: 541 – 551.

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* 6: 271 - 282

Hintze K J and Theil E C (2006) Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 591 – 600.

Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M. (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7783 – 7788.

Hirochika H. (1997) Retrotransposons of rice: Their regulation and use for genome analysis. *Plant Molecular Biology* 35: 231 – 240.

Hirochika H. (1999) Retrotransposons of rice as a tool for forward and reverse genetics. In *Molecular Biology of rice*, K Shimamoto ed (Tokyo Springer- Verlag) pp. 43 – 58.

Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing Y, Eun M Y, Han C, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H. (2004) Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Journal* 54: 325 – 334.

Holm R H, Kennepohl P, Solomon E I (1996) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews* 96: 2239 – 2314.

Ivanov A J, Rovescalli A C, Pozzi P, Yoo S, Mozer B, Li H-S, Yu S-H, Higashida H, Guo V, Spencer M, Nirenberg M (2004) Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci* 101: 16216 – 16221.

Jeon J-S, Lee S, Jung K-H, Jun S-H, Jeong D-H, Lee J, Kim C, Jang S, Yang K, Nam J, An K, Han M J, Sung R J, Choi H-S, Yu J H, Cho S-Y, Cha S-S, Kim S-I, An G. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal* 22: 561 – 570.

Jiang T-B (2005) Isolation and expression pattern analysis of two ferritin genes in tobacco. *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 477 – 486.

Kerschen A, Napoli C A, Jorgensen R A, Müller A E. (2004) Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Letters* 566: 223 – 228.

Kimata Y and Theil e C. (1994) Posttranscriptional regulation of ferritin during nodule development in soybean. *Plant Physiology* 104: 263 – 270.

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

Kochian L V (1991) Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. In: Mortvedt J J, Cox F R, Shumann L M, Welsh R M (eds) *Micronutrients in Agriculture* (2nd ed) Soil Science Society of America, Inc, Madison, USA, pp. 229 – 296.

Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishisawa N K. (2004) OsYSL2 is a rice metal nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the floem. *Plant Journal* 39: 415 – 424.

Kumar A and Bennetzen JL. (1999) Plant retrotransposons. *Annual Review Genetics* 33: 479 – 532.

Laulhere J-P, Lescure A-M, Briat J-F. (1988) Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soybean seeds. *The Journal of Biological chemistry* 263: 10289 – 10294.

Lescure A-M, Proudhon D, Pesey H, Ragland, Theil E. C., Briat J-F. (1991) Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8222 – 8226.

Lobréaux S and Briat J-F. (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochemical Journal* 274: 601 – 606.

Lobréaux S, Yewdall S, Briat J-F, Harrison P M. (1992) Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochemical Journal* 288: 931 – 939.

Lobréaux S, Massenet O, Briat J-F. (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Molecular Biology* 19: 563 – 575.

Lobréaux S, Hardy T, Briat J-F. (1993) Abscisic acid is involved in the iron induced regulation of maize ferritin. *Embo Journal* 12: 651 – 657.

Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. (2001) Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 821 – 834.

Macara I G, Hoy T G, Harisson P M. (1972) The formation of ferritin from apoferritin. Kinetics and mechanisms of iron uptake. *Biochemical Journal* 126: 151 – 162.

Macara I G, Hoy T G, Harisson P M. (1973) The formation of ferritin from apoferritin. Catalytic action of apoferritin. *Biochemical Journal* 135: 343 - 348.

Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghart. Handbook of metalloproteins, John Wiley & Sons, Ltd., NY, 2001.

Miki D, Itoh R, Shimamoto K (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiology* 138: 1903 – 1913.

Miki D and Shimamoto K (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology* 45: 490 - 495

Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka Y, Onosato K, Hirochika H. (2003) Target site specificity of the TOS17 retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon rich regions of the genome. *The Plant Cell* 15: 1771 – 1780.

Miyao A, Iwasaki Y, Kitano H, Itoh JI, Maekawa M, Murata K, Yatou O, Nagato Y, Hirochika H. (2006) A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Molecular Biology* (in press)

Miyoshi K, Ito Y, Serizawa A, Kurata N (2003) *OsHAP3* genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant Journal* 36: 532 – 540

Moritoh S, Miki D, Akiyama M, Kawahara M, Izawa T, Maki H, Shimamoto K (2005) RNAi-mediated silencing of *OsGEN-L* (*OsGEN-like*), a new member of the RAD/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice. *Plant and Cell Physiology* 46: 699 – 715.

Motta A, Basso B, Dell'Orto M, Briat J-F, Soave C (2001) Ferritin synthesis in response to iron in the Fe-inefficient maize mutant *ys3*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 461 – 465.

Murgia I, Delledone M, Soave C. (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 30: 521 – 528.

Murgia I, de Pinto M C, Delledone M, Soave C, De Gara L. (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *Journal of Plant Physiology* 161: 777 – 783.

Nonomura K-I, Nakano M, Fukuda T, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata. (2004) The novel gene Homologous Pairing Aberration in Rice Meiosis 1 of rice encodes putative Coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *The Plant Cell* 16: 1008 – 1020.

Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, Sano H (2004) Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Molecular Biology* 54: 931 - 941

Ostergaard L and Yanofsky M F. (2004) Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 39: 682 – 696.

Palmgren M G (1998) Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺ ATPase. *Advances Botanical Research* 28: 1 – 70.

Parker R, Flowers T J, Moore A L, Harpham N V J (2006) An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal Experimental Botany* 57: 1109 – 1118.

Petit J-M, van Wuytswinkel O, Briat J-F, Lobréaux S. (2001) Characterization of an iron dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *ZmFer1* plant ferritin genes by iron. *Journal Biological Chemistry* 276: 5584 – 5590.

Petit J-M, Briat J-F, Lobréaux S (2001) Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* gene family. *Biochemical Journal* 359: 575 – 582.

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

Qu L Q, Yoshihara T, Ooyama A, Goto F, Takaiwa F. (2005) Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta* 222: 225 – 233.

Rabani M A, Maruyama K, Abe H, Kan M A, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiology* 133: 1755 - 1767

Ragland M, Briat J-F, Gagnon J, Laulhere J-P, Massenet O, Theil E C. (1990) Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 18339 – 18344.

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

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

Sallud C, Gay C, Larmande P, Bés M, Piffanelli P, Piégu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Périn C, Sabau X, Ghesquiére A, Glaszmann J C, Delseny M, Guiderdoni E. (2004) Highthroughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant Journal* 39: 450 – 464.

Sato Y, Sentoku N, Miura Y, Hirochika H, Kitano H, Matsuoka M. (1999) Loss of function mutation in the rice homeobox gene OsH15 affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants. *Embo Journal* 18: 992 – 1002.

Savino G, Briat J-F, Lobréaux S. (1997) Inhibition of the iron induced ZmFer1 maize ferritin gene expression by antioxidants and serine/ threonine phosphatase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 33319 – 33326.

Schmidt W (1999) Mechanisms and regulation of reduction based iron uptake in plants. *New Phytology* 141: 1 – 26.

Seckbach, S. (1982) Ferriting out the secrets of plant ferritin. *Journal of Plant Nutrition* 5: 389 – 394

Shirasu K, Nielsen K, Piffanelli P, Oliver R, Schulze-Lefert P (1999) Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. *Plant Journal*. 17: 293 – 299

Spence M J, Henzl M T, Lammers P J. (1991) The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Molecular Biology* 17: 499 – 504.

Sperotto R A, Ricachenevsky F K, Fett J P (2007) Iron deficiency in rice shoots: identification of novel induced genes using RDA and possible relation to leaf senescence. *Plant Cell Reports* (in press).

Stephan U W and Schmidke I, Stepahn V W, Scholtz G. (1996) The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *BioMetals* 9: 84 – 90.

Strozycki P M, Skapska A, Szczesniak K, Sobieszczuk E, Briat J-F, Legocki A B. (2003) Differential expression and evolutionary analysis of the three ferritin genes in the legume plant *Lupinus luteus*. *Physiologia Plantarum* 118: 380 – 389.

Szaciłowski K, Chmura A, Stasicka Z. (2005) Interplay between iron complexes, nitric oxide and sulfur ligands: structure, (photo) reactivity and biological importance. *Coordination Chemistry Reviews* 249: 2408 – 2436.

Tabuchi M, Sujiyama K, Ishiyama K, Inoue E, Sato T, Takahashi H, Yamaya T. (2005) Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase 1;1. *Plant Journal* 42: 641 – 651.

Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, Furuya M (2001) Isolation and characterization and rice phytochrome A mutants. *The Plant cell* 3: 521 – 534.

Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S. (2002) Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnology* 20: 1030 – 1034.

Theil E C, Burton J W, Beard J L. (1997) A sustainable solution for dietary iron deficiency through plant biotechnology and breeding to increase seed ferritin control. *Journal of European Clinical Nutrition* 51: S28 – S31.

Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T, Buckhout T J. (2001) Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiology* 127: 1030 – 1043.

Uchimiya H, Iwata M, Nojiri C., Smarajeeva PK, Takamatsu S., Ooba S., Anzai H, Christensen AH, Quail PH, Toki S (1993) Biolophos treatment of transgenic rice plants expressing a bar gene prevents infection by the sheat blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Bio/Technology* 11: 835 – 836

Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schünmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM, Wang M – B (2000) Agrobacterium-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Australian Journal Plant Physiol* 27: 201 – 210.

Varotto C, Maiwald D, Pesaresi P, Jahans P, Francesco S, Leister D (2002) The metal iron transporter *IRT1* is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 31: 589 – 599.

Van Wuitswinkel O, Vansuyt G, Grignon N, Fourcroy P, Briat J-F (1998) Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant Journal* 17: 93 – 97.

Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot M L, Briat J-F, Curie C (2002) *IRT1*, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14: 1223 – 1233.

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

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and anti-sense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959 – 13964.

Waterhouse P and Helliwell C A (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature* 4: 29 – 38

Waters B M, Chu H-H, DiDonato R J, Roberts L A, Eisley R B, Lahner B, Salt D E, Walker E L. (2006) Mutations in *Arabidopsis* Yellow Stripe-like1 and Yellow Stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol* 141: 1446 - 1458.

Watson J M, Fusaro A F, Wang M, Waterhouse P (2005) RNA silencing platforms in plants *FEBS Letters* 579: 5982 - 5987

Wei J and Theil E C (2000) Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (Soybean) *The Journal of Biological Chemistry* 275: 17488 – 17493.

Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M, Rouse D T, Liu Q, Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* 27: 581 – 590

Wicks R E and Entsch B. (1993) Functional genes found for three different plant ferritin subunits in the legume, *Vigna unguiculata* Biochemical and Biophysical Research Communications 192: 813 – 819.

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

Yang B, Sugio A, White F F. (2006) *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight in rice. Proc. Natl. Acad Sci. USA 103: 10503 – 10508.

Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J, Ni P, Dong W, Hu S, Zeng C, Zhang J, Zhang Y, Li R, Xu Z, Li S, Li X, Zheng H, Cong L, Lin L, Yin J, Geng J, Li G, Shi J, Liu J, Lv H, Li J, Wang J, Deng Y, Ran L, Shi X, Wang X, Wu Q, Li C, Ren X, Wang J, Wang X, Li D, Liu D, Zhang X, Ji X, Zhao W, Sun Y, Zhang Z, Bao J, Han Y, Dong L, Ji J, Chen P, Wu S, Liu J, Xiao Y, Bu D, Tan J, Yang L, Ye C, Zhang J, Xu J, Zhou Y, Yu Y, Zhang B, Zhuang B, Wei H, Liu B, Lei M, Yu H, Li Y, Xu H, Wei S, He X, Fang L, Zhang Z, Zhang Y, Huang Y, Su Z, Tong W, Li J, Tong Z, Li S, Ye J, Wang L, Fang L, Lei T, Chen C, Chen H, Xu Z, Li H, Huang H, Zhang F, Xu H, Li N, Zhao C, Li S, Dong L, Huang Y, Li L, Xi Y, Qi Q, Li W, Zhang B, Hu W, Zhang Y, Tian X, Jiao Y, Liang X, Jin J, Gao L, Zheng W, Hao B, Liu S, Wang W, Yuan L, Cao M, McDermott J, Samudrala R, Wang J, Ka-Shu Wong J, Yang H (2005) The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. PLOS Biol 3: 266 - 281

Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urban A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macri F. (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. European Journal of Biochemistry 271: 3657 – 3664