UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Análise da expressão dos genes da Família VIT em plantas de arroz (*Oryza sativa*) e análise funcional do gene *OsVIT1*

Karina Letícia Lopes

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

Orientação: Profª. Drª. Janette Palma Fett
Co-orientação: Paloma Koprovski Menguer
Porto Alegre, dezembro de 2010

AGRADECIMENTOS

À professora Janette Palma Fett pela oportunidade de conhecer um pouco do universo da Biologia Molecular e pela orientação. E ao professor Arthur Germano Fett-Neto, que junto com a Janette, forma a base que sustenta o Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS.

A todos os colegas, que viraram amigos, do Laboratório de Fisiologia Vegetal, pelas conversas e brincadeiras que animavam os dias, e todos os doces e chocolates que deram energia para continuar os experimentos. Ao Raul e Guilherme, que me ensinaram as primeiras técnicas moleculares. Ao Felipe Ricachenevsky pelas dicas, idéias, conselhos, abraços, análises filogenéticas e figuras cedidas. Pela convivência que me fez descobrir minha vózinha de mentira Kelly, que eu adoro de verdade. E principalmente à Paloma, minha co-orientadora querida, por toda ajuda, paciência, preocupação e dedicação. Pá! Espero que a experiência de trabalhar juntas tenha sido tão boa pra ti, quanto foi pra mim!

Ao Dr. Raul Antonio Sperotto por ter aceitado o convite para participar na banca examinadora. E à Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva por fazer parte da minha banca examinadora e por toda a ajuda nos experimentos de transformação de leveduras.

A todos os amigos, principalmente à Edilena e Estela por estarem sempre presentes quando precisava de alguém para desabafar, tomar um café e companhia para uma festa.

À minha família (minhas irmãs Andréa e Ana, e meus sobrinhos João Pedro e Anthony) por fazerem de mim uma pessoa feliz. Em especial à minha mãe Luiza, simplesmente por tudo!

RESUMO

O arroz possui grande importância econômica e nutricional, sendo o alimento básico de grande parte da população humana. No entanto, o grão de arroz é pobre em nutrientes minerais, como o ferro (Fe) e zinco (Zn), cuja deficiência afeta milhões de pessoas. Vários autores defendem a biofortificação do grão de arroz, com aumento dos teores de vitamina A, Fe e Zn no grão. Para que seja possível aumentar os níveis de minerais no grão de arroz, é necessário que sejam conhecidos os mecanismos responsáveis pela absorção destes pelas raízes da planta, transporte, distribuição, armazenamento e alocação para o grão. Assim, resultados deste tipo de estudo poderão contribuir para os avanços nas pesquisas de biofortificação. Em *Arabidopsis thaliana* e *Tulipa gesneriana* foi demonstrado que o gene *VIT1* (**V**acuolar **I**ron **T**ranporter **1**) codifica uma proteína responsável pelo transporte de ferro para dentro dos vacúolos, podendo atuar na estocagem e regulação dos níveis de ferro nos tecidos. Esses resultados indicam que *At*VIT1 e *Tg*VIT1 podem ter um papel importante na homeostase de ferro nessas plantas. Em arroz, nosso grupo identificou dois genes da família VIT (*Os*VIT1 e *Os*VIT2), com sequências similares à do gene *VIT1* de *Arabidopsis thaliana* que podem ter sido originados a partir de um evento de duplicação. Apresentam 71% e 68% de identidade com a proteína *At*VIT1, respectivamente, e 74% de identidade entre suas sequências de aminoácidos. Com o objetivo de caracterizar a expressão desses genes em arroz, plantas foram analisadas após tratamento com excesso de diferentes metais, em diferentes estágios reprodutivos e em sementes durante a germinação. Os resultados mostraram que o gene *OsVIT1* teve sua expressão induzida em resposta apenas ao tratamento com excesso de Fe em folhas, não tendo sido detectados transcritos em raízes ou em folhas de plantas expostas a excesso de Zn e Mn. Esses dados indicam uma possível relação entre a indução de *OsVIT1* e os níveis de Fe intracelular nas folhas. A expressão de *OsVIT2* não apresentou diferença significativa entre a condição controle e os tratamentos. Os picos de expressão observados em panícula (*OsVIT1,* em R5) e folha-bandeira (*OsVIT2,* em R4) possivelmente correspondem a momentos de grande mobilização e acúmulo de metais nestes órgãos. Os metais poderiam ser remobilizados, em outro momento, para os grãos. *OsVIT2* teve aumento da expressão após 4 dias de germinação, que coincidiu com o surgimento de tecidos fotossinteticamente ativos no embrião. Para a análise funcional, plasmídeos clonados com as regiões codificantes do gene *OsVIT1* foram transformados em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae (Δccc1)* deficientes no transporte de ferro. As leveduras transformantes foram crescidas em meio mínimo contendo diferentes concentrações de Fe para avaliar a complementação da levedura mutante pelo gene de arroz *OsVIT1*. O experimento não teve resultado positivo. Será feita a extração do plasmídeo para confirmar a inserção do gene *OsVIT1* por PCR, após será repetido o experimento com exposição das leveduras à Fe. A caracterização dos genes da família *VIT* e a compreensão dos mecanismos que regulam a sua expressão em arroz são essenciais para um melhor entendimento do transporte e homeostase de ferro nesta planta.

Palavras-chave: arroz, expressão gênica, genes VIT.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 2
1.1. Arroz 2
1.2. Importância dos minerais na nutrição vegetal 3
1.2.1. Ferro 3
1.2.2. Zinco 5
1.2.3. Manganês 7
1.3. Importância dos minerais na nutrição humana 8
1.3.1. Ferro 9
1.3.2. Zinco 10
1.3.3. Manganês 11
1.4. Biofortificação 12
1.5. Família VIT 14
2. OBJETIVOS 17
3. MATERIAIS E MÉTODOS 18
3.1. Análises de expressão por RT-PCR quantitativo 18
3.1.1. Coleta da plantas crescidas a campo 18
3.1.2. Cultivo de plantas em laboratório 18
3.1.3. Extração de RNA e Síntese de cDNA 19
3.1.4. RT-PCR quantitativo 20
3.1.5. Análises estatísticas 21
3.2. Análises de elementos por ICP-OES 21
3.3. Análise funcional por transformação de levedura 22
3.3.1. Recombinação em *Escherichia coli* 22
3.3.2. Seleção de leveduras mutantes 23
3.3.3. Transformação de leveduras 24
4. RESULTADOS 25
4.1. Análises de expressão por RT-PCR quantitativo 25
4.2. Análise funcional por transformação de levedura 29
4.2.1. Recombinação em *Escherichia coli* 29
4.2.2. Seleção de leveduras mutantes 32
4.2.3. Transformação de leveduras 34
5. DISCUSSÃO 36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. A produção anual de arroz é de aproximadamente 606 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil participa com 13.140.900t (2,17% da produção mundial) e destaca-se como único país não-asiático entre os 10 maiores produtores (FAO, 2006). O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz no Brasil, sendo responsável por 61,1% da produção nacional dessa cultura (IBGE, 2010).

Apenas uma pequena quantidade de arroz é consumida como ingrediente em produtos processados, sendo seu maior consumo na forma de grão. O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido. Nos países em desenvolvimento, onde o arroz é um dos principais alimentos da dieta, ele é responsável por fornecer, em média, 715 Kcal per capita por dia, 27% dos carboidratos, 20% das proteínas e 3% dos lipídios da alimentação. No Brasil, o consumo per capita é de 108g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta (Kennedy *et al*., 2002). Portanto, devido à importância do arroz na dieta de grande parte da população, sua qualidade nutricional afeta diretamente a saúde humana.

O grão de arroz é pobre em nutrientes minerais, como o ferro (Fe) e zinco (Zn), cuja deficiência afeta milhões de pessoas (FAO, 2006). Vários autores defendem a biofortificação do grão de arroz, com aumento dos teores de vitamina A, ferro e zinco no grão – que poderá ter um impacto significativo na solução do problema da má nutrição (HarvestPlus, 2006). Para isto,

muitos trabalhos vêm sendo realizados, em plantas de arroz, com o objetivo de caracterizar genes e mecanismos responsáveis pela absorção de minerais pelas raízes da planta, transporte entre os diferentes órgãos, distribuição intracelular e armazenamento, alocação para o grão e distribuição entre os diferentes tecidos dentro do grão.

1.2. Importância dos minerais na nutrição vegetal

As plantas necessitam de um conjunto de nutrientes minerais essenciais, sem os quais elas são incapazes de completar o seu ciclo de vida (Marschner, 1995). Esses nutrientes minerais são tradicionalmente classificados em macro e micronutrientes, dependendo da quantidade exigida para o desenvolvimento normal da planta. Os macronutrientes são substâncias requeridas em grandes quantidades diárias para o crescimento das plantas. Os micronutrientes são necessários em quantidades relativamente pequenas, mas críticas para o funcionamento correto do metabolismo: entre 5 e 100 mg kg^{-1} (Alloway, 2004). São eles: Boro, Cloro, Cobre, Ferro, Manganês, Molibdênio, Níquel e Zinco. Neste trabalho dar-se-á atenção a três desses micronutrientes: Ferro, Zinco e Manganês.

1.2.1. Ferro

O ferro é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas (Morrisey & Guerinot, 2009), fazendo parte de centros de oxirredução de proteínas essenciais para a fotossíntese e respiração (Gross *et al.,* 2003). Sua deficiência afeta o desenvolvimento das plantas, inibindo o crescimento do meristema apical, além de gerar zonas de clorose intervenal, podendo levar à morte celular em casos severos (Sperotto *et al.*, 2009). Por outro lado, o ferro livre é altamente reativo e tóxico por meio da reação de Fenton (Morrisey & Guerinot, 2009), e altas concentrações de ferro podem ser extremamente prejudiciais às células vegetais. Portanto,

as plantas desenvolveram mecanismos para lidar tanto com a deficiência quanto com o excesso de ferro. Os mecanismos de captação de ferro mais amplamente descritos ocorrem sob deficiência de ferro, e são descritos em mais detalhes abaixo.

A incorporação do ferro entre os constituintes celulares requer a redução do Fe^{+3} para Fe^{+2}. Dependendo da origem filogenética da espécie, este processo acontece fora da célula ou dentro do citoplasma (Schmidt, 2003). Em gramíneas, há a secreção de quelantes pela planta, em geral fitossideróforos (aminoácidos não-protéicos), que formam um complexo de alta afinidade com o ferro III, propiciando a entrada do ferro quelado por meio de transportadores específicos, chamada de estratégia II (Römheld & Marschner, 1986). Esses transportadores são ortólogos da proteína Yellow Stripe 1 (YS1) de milho, e são fortemente induzidos por deficiência de ferro (Curie *et al*., 2001; Mori, 1999).

Já as dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas utilizam a estratégia I, onde a mobilização do ferro acontece por meio de uma ação combinada entre H^{+}-ATPases, que realizam a extrusão de prótons, e ferro-quelato redutases. A enzima ferro-quelato redutase foi identificada pela primeira vez em *Arabidopsis thaliana* (AtFRO2) e realiza a redução do Fe^{+3} quelado a Fe^{+2}, para então o Fe^{+2} ser absorvido pelas raízes das plantas por meio de transportadores específicos do tipo *Iron Regulated Transporter 1* (*AtIRT1*) (Robinson *et al.,* 1999).

Hoje, existem fortes evidências de que o arroz utiliza um mecanismo combinando as duas estratégias (I e II). Apesar do fato de plantas de arroz produzirem e secretarem fitossideróforos em baixas quantidades, elas são capazes de absorver ferro III quelado de modo eficiente através da proteína OsYSL15 (Inoue *et al.*, 2009). Mas diferentemente de outras gramíneas, as plantas de arroz também absorvem Fe^{+2} quando disponível, através dos transportadores OsIRT1 e OsIRT2 (Ishimaru *et al*., 2006). Esta habilidade de absorver Fe^{+2} provavelmente evoluiu no arroz como

uma adaptação a campos alagados, onde esta forma é mais abundante, devido às condições anaeróbicas que prevalecem nesses campos (Jeong & Guerinot, 2009).

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

1.2.2. Zinco

O zinco é o metal de transição mais abundante nos organismos depois do ferro, e é o único metal representado em todas as seis classes de enzimas (Broadley *et al.*, 2007). O zinco é redox-estável sob condições fisiológicas (Barak & Helmke, 1993). Desse modo, em sistemas biológicos, o zinco só existe na forma Zn^{+2} e não participa de reações de oxirredução (Maschner, 1995).

Mais de setenta metaloproteínas contendo zinco já foram identificadas (Barak & Helmke, 1993), entre elas: álcool desidrogenase, anidrase carbônica, Cu/Zn-superóxido dismutase, fosfatase alcalina, fosfolipase, carboxipeptidase e RNA polimerase. Esse papel do zinco como componente integral de diversas enzimas torna esse elemento crucial para vários processos metabólicos na planta, tais como a fotossíntese, síntese protéica, manutenção da integridade da membrana, metabolismo de auxinas e reprodução. Uma das funções mais conspícuas do zinco está relacionada com a regulação da expressão gênica: vários fatores de transcrição dependem da presença do zinco para formar o motivo dedo-de-zinco, reconhecer seqüências de DNA específicas e ativar a transcrição (Alberts *et al*., 1998; Brown, 2006).

Os sintomas característicos mais visíveis da deficiência de zinco são crescimento reduzido e folhas cloróticas, necróticas e mal formadas. Várias mudanças bioquímicas também podem ser

relacionadas à deficiência de zinco: redução da atividade fotossintética, produção de radicais livres, diminuição da síntese protéica, redução dos níveis do fitormônio ácido indol-acético, entre outras.

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

A raiz é o principal órgão de captura de nutrientes minerais nas plantas. Aparentemente, a maioria do zinco parece ser obtida como um cátion divalente (Zn^{+2}); e em pH alto, possivelmente também é obtido como um cátion monovalente ($ZnOH^{+}$) presentes na solução do solo (Marschner, 1995). Porém, foi proposto que as raízes também podem absorver o zinco quelado a fitossideróforos (Zhang *et al.,* 1991). Inicialmente, a liberação de fitossideróforos foi descrita como um mecanismo para mobilizar o Fe^{+3} presente no solo em compostos inorgânicos insolúveis (Marschner & Romheld, 1994). Contudo, descobriu-se que os fitossideróforos liberados por raízes de gramíneas podem ligar-se não só ao Fe^{+3}, como também efetivamente quelam o Zn^{+2}, Cu^{+2}, Mn^{+2}, Ni^{+2} e Co^{+2} (Buchanan *et al*., 2000) que são absorvidos de modo eficiente através da proteína OsYSL15 (Inoue *et al*., 2009).

Estudos mostram que os transportadores de metais da família ZIP (**Z**RT, **I**RT-related **p**rotein) compõe o sistema primário de captação de Zn nas raízes. Dois transportadores da família ZIP já bem caracterizados, IRT1 (**i**ron **r**egulated **t**ransporter) e IRT2, representam o sistema principal de captação de Fe nas células radiculares de *Arabidopsis thaliana*, e IRT1, pelo menos,

também contribui significativamente na captação de Zn e Cádmio (Cd) (Guerinot, 2000). Em arroz, proteínas ZIP têm sido caracterizadas como transportadoras de Zn (proteína *Os*ZIP4, localizada na membrana plasmática; Grotz & Guerinot, 2006).

1.2.3. Manganês

O Manganês (Mn) é um micronutriente essencial que desempenha papéis primários na ativação de diversas enzimas, e na rota biossintética de isoprenóides (Reuter *et al*., 1988). Também possui papel chave no aparato fotossintético e na síntese de clorofila. Muitos estudos indicam que Mn^{+2} pode substituir o Mg^{+2} como cofator, afetando assim a síntese de proteínas, lipídios e carboidratos (Lidon *et al*., 2004).

A mobilidade do Mn no solo é baixa, e seu aproveitamento pela planta depende da absorção pelas raízes, que, por sua vez, é governada pela disponibilidade do elemento na interface solo-raiz. O manganês não é facilmente redistribuído na planta e sintomas de deficiência surgem em folhas novas se houver restrição na disponibilidade durante o desenvolvimento da planta, mesmo que as folhas velhas contenham altas concentrações do elemento (Loneragan, 1988).

Excesso de Manganês (Mn) representa um fator limitante de crescimento e rendimento, principalmente para campos de cereais com solos ácidos e mal drenados, com baixo potencial redox (Foy, 1984; Schlichting & Sparrow, 1988). O excesso de Mn pode ser associado com manchas marrons em folhas maduras, clorose intervenal e necrose, deformação de folhas jovens e retardo do crescimento (Foy *et al.,* 1978).

Grandes diferenças na tolerância ao excesso de Mn existem entre diferentes espécies de plantas e entre diferentes cultivares da mesma espécie (Heenan & Carter, 1976; Foy *et al.*, 1978), sendo o arroz citado como o cereal mais tolerante, podendo acumular até cinco vezes mais Mn

em suas folhas do que outras gramíneas (Foy *et al.,* 1978). Lidon e co-autores (Lidon & Teixeira, 2000; Lidon, 2001; Lidon *et al*., 2004) concluiram que a alta tolerância a Mn em folhas de arroz não é consequência do acúmulo e inativação de Mn em vacúolos, mas da ligação de Mn a uma proteína localizada no cloroplasto que apresenta atividade superóxido dismutase (SOD).

Resultados da combinação de abordagens proteômica, transcriptômica e fisiológica claramente indicam que o suprimento tóxico de Mn afeta funções simplásticas particularmente relacionadas à fotossíntese (Führs *et al*., 2008), através da inibição da síntese de clorofila em folhas jovens, por inibir a absorção de outros micronutrientes como Fe, Zn e Mg (Foy *et al*., 1978; Marschner, 1995).

1.3. Importância dos minerais na nutrição humana

Podemos dizer que os minerais são os elementos mais importantes para o organismo, pois estão na base e na estrutura dos macronutrientes, como proteínas, carboidratos e vitaminas (Grusak & DellaPenna, 1999). Embora os minerais representem uma pequena parte do peso do corpo humano, são imprescindíveis para todas as reações químicas, com ênfase no processo de geração de energia, participando ativamente no crescimento, na manutenção da homeostase e na regulação de todos os processos orgânicos, atuando em todas as funções celulares (Grusak & DellaPenna, 1999).

Dos cerca de 95 elementos químicos presentes na Tabela Periódica, há cerca de 50 nos tecidos e fluídos do organismo humano. Quatro desses elementos - carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio – representam por volta de 95% do peso total do corpo humano; e o restante é constituído de minerais essenciais (4%), não essenciais (1%) e tóxicos (FAO, 2006). Nessa classificação, ferro, zinco e manganês são enquadrados como microminerais essenciais, juntamente com o cobre, iodo, cromo, selênio e cobalto.

Muitas doenças novas, como a Síndrome da Fadiga Crônica, o envelhecimento precoce acelerado, a depressão, as deficiências imunológicas, o câncer e muitas outras, são resultantes da carência mineral à qual o ser humano moderno está exposto. Isto se deve ao desenvolvimento da agricultura intensiva, vastas monoculturas e o emprego sistemático de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que diminuíram a biodisponibilidade de muitos minerais devido a lixiviação, empobrecimento do solo e a quelação dos metais.

1.3.1. Ferro

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

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

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

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

1.3.2. Zinco

O zinco é um micronutriente essencial não só para as plantas, mas também para os animais, incluindo os seres humanos. Já foram identificadas mais de trezentas enzimas que contêm zinco e estão envolvidas em processos metabólicos básicos nos humanos. Portanto, um consumo adequado desse mineral é necessário para o crescimento e reprodução normais (FAO/WHO/IAEA, 1996). Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja sob risco de consumo insuficiente de zinco, condição que pode resultar em vários problemas de saúde, entre os quais destacam-se o crescimento retardado, a imaturidade sexual, problemas cognitivos e a imunodepressão (Hotz & Brown, 2004). A deficiência de zinco em

humanos é a terceira mais importante no mundo, depois das deficiências de ferro e vitamina A (Hambidge, 2000).

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

1.3.3. Manganês

A concentração de manganês no organismo humano tende a ser alta em tecidos ricos em mitocôndrias. Sua presença está associada à formação de tecido conjuntivo e ósseo, crescimento e reprodução e metabolismo de carboidratos e lipídios.

A deficiência desse mineral pode causar perda de peso, dermatite transiente, náusea e vômito, além de afetar a capacidade reprodutiva, a função pancreática e o metabolismo de carboidratos. Já quando acumulado em excesso no fígado e no sistema nervoso central produz sintomas iniciais como insônia, depressão seguida de anorexia, apatia, irritabilidade, letargia, além de tremores e sintomas tipo Parkinson (Buchman, 2006).

As recomendações de doses diárias desse mineral são: entre 1,9 e 2,3 mg/dia para homens; e entre 1,6 e 1,8 mg/dia para mulheres, podendo ter uma exigência de até 2,6 mg/dia durante a lactação (FNB, 2004). Existe baixa concentração desse mineral em grãos de arroz,

sendo encontrados 2 a 36 μg de Mn por grama de arroz integral, e de 6 a 17 μg de Mn por grama de arroz branco (Walter *et al.*, 2008).

Estudos sugerem que a absorção de Mn pelo organismo está diretamente associada à concentração de ferro, sendo reforçada em suficiência de ferro, e diminuída em deficiência de ferro. O aumento do consumo de fitatos na dieta também diminui a disponibilidade de Mn (Buchman, 2006).

1.4. Biofortificação

A biofortificação é o processo que consiste em aumentar a concentração natural de nutrientes biodisponíveis em plantas cultivadas, e surgiu nos últimos anos como alternativa para aliviar problemas de má nutrição (Palmgren *et al*., 2008).

Grãos não perecíveis, em especial grãos de cereais, são fontes pobres em micronutrientes. Como resultado, as populações mais pobres, que geralmente obtêm alimento por meio de monoculturas, são populações mais vulneráveis às doenças provenientes da deficiência mineral. Várias estratégias têm sido propostas para lidar com a deficiência de micronutrientes, incluindo a suplementação, a fortificação de alimentos processados, a biofortificação através da aplicação de fertilizantes e a implementação de programas de cruzamentos e de engenharia genética com a finalidade de gerar grãos ricos em nutrientes minerais (Gómez-Galera *et al*., 2010).

O foco da biofortificação é não apenas aumentar as concentrações de minerais nos grãos, mas também aumentar a biodisponibilidade desses minerais. O aumento das concentrações pode ser obtido por meio de intervenções agronômicas, cruzamentos ou engenharia genética, enquanto o aumento da biodisponibilidade desses minerais somente pode ser obtido por meio de cruzamentos ou engenharia genética (Gómez-Galera *et al.,* 2010).

Como alimento básico de grande parte da população humana e despontando como planta modelo entre as monocotiledôneas (devido ao pequeno tamanho do genoma e grande relação de sintenia com outras espécies de cereais (IRGSP, 2005)), o arroz foi escolhido para experimentos pioneiros de fortificação alimentar. Plantas transgênicas com maiores teores de beta-caroteno (precursor da vitamina A) já foram obtidas através de engenharia genética, uma vez que a deficiência de vitamina A também é um problema grave de saúde pública, principalmente no terceiro mundo (Ye *et al.,* 2000; Paine *et al*., 2005).

Estudos recentes mostram que a translocação de minerais para as sementes é finamente regulada. Portanto, o simples aumento na absorção destes do solo não resulta, na maioria dos casos, em grãos com maiores concentrações de minerais (Jiang *et al*., 2007). Plantas de arroz crescidas em quantidades normais e excedentes de Zn mostraram que o acúmulo deste mineral nos grãos se deu, em grande parte, pela captação do mineral nas raízes após o florescimento e não pela remobilização deste das folhas (Jiang *et al.,* 2007).

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

Muito da fisiologia e regulação da absorção de minerais da rizosfera já foi elucidada. Entretanto, a falta de conhecimento sobre como os nutrientes são transportados para dentro e para

fora dos tecidos vasculares, translocados para os tecidos vegetativos e descarregados dentro das sementes são algumas das barreiras para a biofortificação de sementes (Kramer *et al*., 2007).

1.5. Família VIT

O gene *CCC1* (Ca^{2+}-sensitive cross-complementer 1) de levedura codifica um transportador de ferro/manganês que promove o acúmulo desses metais no vacúolo (Li *et al.,* 2001). Kim *et al*. (2006) caracterizaram em *Arabidopsis* um gene ortólogo ao *CCC1* de levedura, denominado *AtVIT1* (vacuolar iron transporter 1). *AtVIT1*, assim como o gene *CCC1* de levedura, desempenha papel na homeostase de ferro. *At*VIT1 apresentou 62% de similaridade em sua sequência de aminoácidos com a proteína CCC1. Em sementes de *A. thaliana*, a expressão de *VIT1* coincide com a formação dos vacúolos durante o desenvolvimento do embrião (Kim *et al*., 2006). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que leveduras mutantes *ccc1* (sensíveis a grandes quantidades de ferro extracelular), expressando *AtVIT1* tiveram o crescimento mantido em meio contendo excesso de ferro, além de apresentarem aumento no conteúdo de ferro e manganês vacuolar, quando comparadas com as células controle.

Em *Tulipa gesneriana* (Momonoi et al, 2009) a expressão de *VIT1* foi associada com o aumento no conteúdo de ferro vacuolar e o desenvolvimento da coloração azul nas pétalas. *Tg*VIT1 apresenta 85% de identidade em nível de aminoácidos com *At*VIT1.

Proteínas VIT1-like podem ser encontradas em todo reino vegetal, com dois agrupamentos distintos em mono e dicotiledôneas (figura 1).

Tendo em vista que o gene *VIT1* desempenha um papel importante na homeostase de ferro e manganês em *A. thaliana* e de ferro em *T. gesneriana,* foi realizado um *screening* no genoma de arroz, o que permitiu a identificação de duas sequências, *OsVIT1* e *OsVIT2* (Figura 1), ainda não descritas na literatura. As proteínas putativas codificadas por estes genes apresentaram

71 % e 68 % de identidade em nível de aminoácidos com a proteína *At*VIT1, respectivamente. Podem ter sido originados a partir de um evento de duplicação, e apresentam 74% de identidade entre suas sequências de aminoácidos.

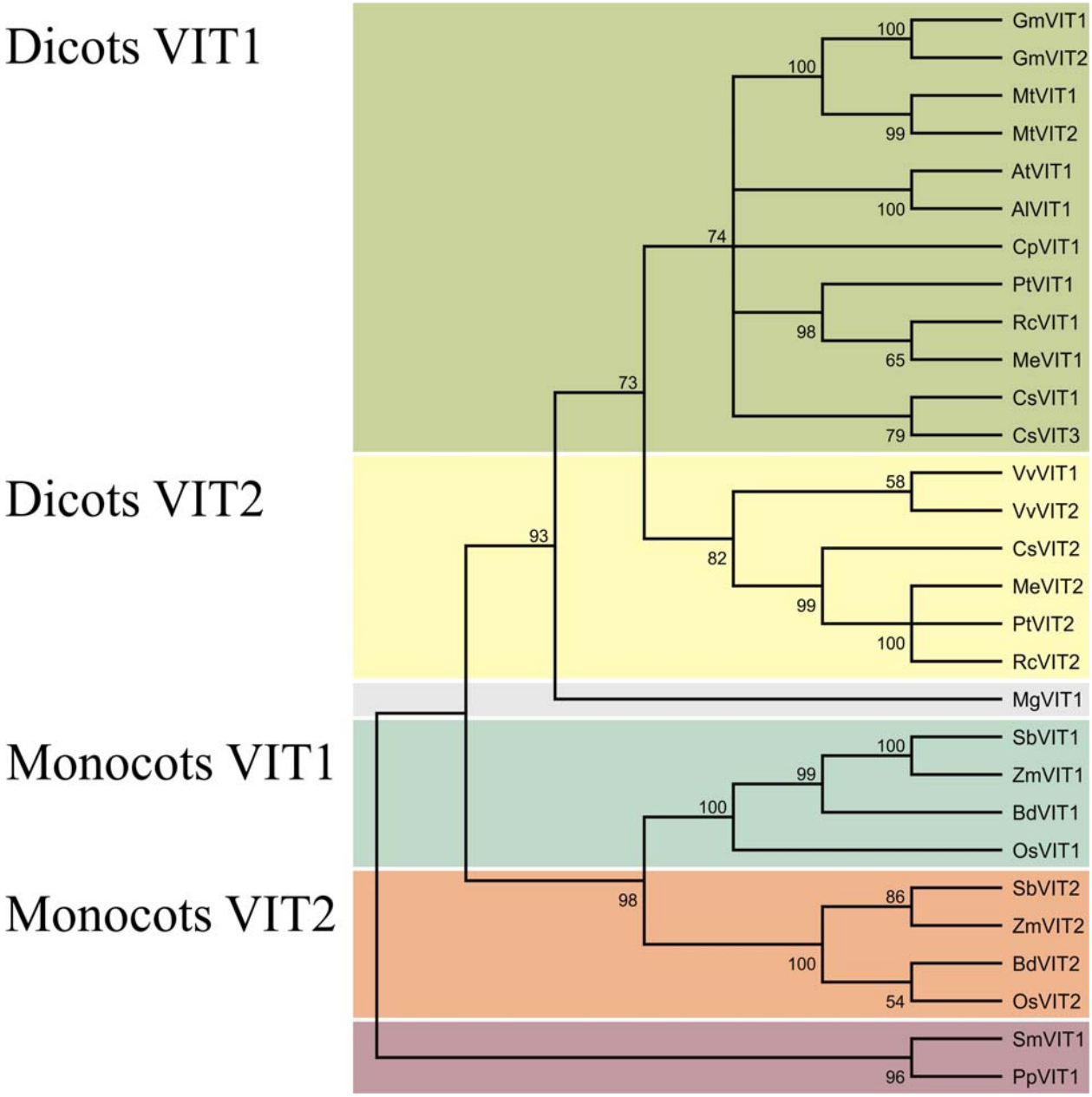

Figura 1: Árvore filogenética obtida a partir de neighbor-joining mostrando as relações entre os genes *OsVIT1* e *OsVIT2*, com outros genes da mesma família encontrados em mono e dicotiledôneas**.** Sendo: *Gm (Glycine max), Mt (Medicago truncatula), At (Arabidopsis thaliana), Al (Arabidopsis lyrata), Cp (Carica papaia), Pt (Populus trichocarpa), Rc (Ricinus communis), Me (Manihot esculenta), Cs (Cucumis sativus), Vv (Vitis vinifera), Mg (Mimulus guttatus), Sb (Sorghum bicolor), Zm (Zea mays), Bd (Brachypodium distachyon), Os (Oryza sativa), Sm (Selaginella moellendorffii) e Pp (Physcomitrella patens)*. Figura cedida por Felipe Klein Ricachenevsky.

2. OBJETIVOS

O obetivo geral deste trabalho é caracterizar os genes da família *VIT* em plantas de arroz.

Objetivos específicos:

2.1. Analisar a expressão dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* em raízes e folhas de plantas crescidas em laboratório, submetidas a tratamentos com excesso de ferro, zinco e manganês; em panículas e folhas-bandeira, de plantas crescidas a campo, em diferentes estágios reprodutivos; e em sementes em processo de germinação.

2.2. Avaliar a atividade da proteína *Os*VIT1 no transporte de metais através da expressão heteróloga do gene em leveduras mutantes *ccc1* (defectivas no transporte vacuolar de Fe).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises de expressão por RT-PCR quantitativo

3.1.1. Coleta de plantas crescidas a campo

As coletas de folhas-bandeira e panículas de plantas da cultivar Nipponbare, nos estágios reprodutivos R3 (surgimento da panícula), R4 (antese), R5 (enchimento do grão) e R7 (grão endurecido) foram realizadas na Unidade Experimental do IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz, Cachoeirinha, RS).

3.1.2 Cultivo de plantas em laboratório

Em laboratório, sementes da cultivar Nipponbare foram germinadas durante 4 dias numa incubadora a 28°C em placa de *petri* com papel filtro umedecido em água destilada. Após a germinação, as plantas foram transferidas para potes contendo substrato inerte (vermiculita) onde foram mantidas por 10 dias, sendo molhadas apenas com água destilada. Para o período de adaptação as plantas foram transferidas para vasos com 2 litros de solução nutritiva controle contendo 0,1mM de KCl, 0,1mM de KH_2PO_4, 0,7 mM de K_2SO_4, 2mM de $Ca(NO_3)_2$ e 0,5mM de $MgSO_4$, 0,5μM de MnSO4, 0,01 μM de $(NH_4)_6Mo_{27}O_{24}$, 10μM de H_3Bo_3, 0,5 μM de $ZnSO_4$, 0,2μM de CuSO4 e 100μM de Fe^{+3}- EDTA por 7 dias. A solução nutritiva controle foi trocada a cada 3 dias. Após, algumas plantas foram transferidas para os tratamentos com excesso de ferro (1,25 mM), zinco (200 μM) e manganês (50 μM e 200 μM) onde foram mantidas por 9 dias, com troca das soluções a cada três dias. As amostras foram coletadas em 3 repetições, cada uma contendo 3 amostras biológicas, após zero, 1, 3, 6 e 9 dias de tratamento com excesso e condição

controle. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento a 26°C ± 1 sob luz branca com um fotoperíodo de 16/8h luz-escuro (irradiação de aproximadamente 100 μmol m^{-2} s^{-1}) conforme a figura 2.

Figura 2: Método de crescimento de plantas de arroz em laboratório. Uso de baldes com capacidade de 2 litros de meio nutritivo. Sala de crescimento a 26°C ± 1 sob luz branca (100 μmol m^{-2} s^{-1}) com fotoperíodo de 16/8h luz-escuro.

3.1.3. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras foi extraído com o kit *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen®) e a quantificação através do fluorímetro QUBIT (Invitrogen®). As amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen®) para remover qualquer DNA genômico contaminante. A síntese da primeira fita foi realizada utilizando um *primer* oligo-dT_{30} e a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen®) a partir de 1 μg de RNA total.

3.1.4. RT-PCR quantitativo

Experimentos por RT-PCR quantitativo foram realizados utilizando *primers* específicos para o gene constitutivo *OsUBQ5* (5'-AACCAGCTGAGGCCCAAGA-3'; 5'-ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA-3') e para os genes *OsVIT1* (5'-GTGCCACTCCTACCCTACA-3'; 5'-TAAACCGGCCCTTGACATAG-3') e *OsVIT2* (5'-CTATTATCGGTGCGCTTGCT-3'; 5'-ATTGCAGCTTCGTTGGATTC-3'). A enzima utilizada foi a Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®). Também foram realizadas reações de RT-PCR quantitativo utilizando *primers* para o gene *OsNAS1* (5'-TCTAACAGCCGGACGATCGAAAGG-3'; 5'-TTTCTCACTGTCATACACAGATGGC-3') e *OsIRO2* (5'-CCACAGGAAGCTCAGCCACA-3'; 5'-CAGATTCTCCACCTGCTTCTGC-3') cujas expressões são induzidas por excesso de zinco (Ishimaru *et al.*, 2008 e Sperotto *et al.*, 2009) e para o gene *OsFER1* (5'-TCACTCTTCACCCGCCGCG-3'; 5'-TCGACGAACTTTTGCCTAGC-3'), cuja expressão é induzida por excesso de ferro (Stein *et al.*, 2009).

Foi utilizado o equipamento Applied-Biosystems 7500 para as análises de expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real. As condições de reação foram: inicialmente 5 min de desnaturação a 94˚C, seguido por 40 ciclos de 10s a 94˚C, 15 s a 60˚C, 15 s a 72˚C e 35 s a 60˚C; as amostras foram mantidas por 2 min a 40˚C para o anelamento e depois aquecidas de 55 a 99˚C com uma elevação de 0,1˚C/s para produção da curva de dissociação dos produtos amplificados. As reações tinham um volume final de 20 µl compostas de 10 µl de cada amostra transcrita reversamente diluída 50 vezes, 2 µl de tampão PCR (10X), 1,2 µl de $MgCl_2$ (50 mM), 0,1 µl de dNTPs (5 mM), 0,4 µl dos pares de primers (10 µM), 4,25 µl de água, 2,0 µl de SYBR green (diluído 1:10.000), e 0,05 µl de Taq Platinum DNA polimerase (5 U/µl) (Invitrogen). A expressão

gênica foi quantificada utilizando o método comparativo CT, onde os valores de expressão do gene de interesse foram normalizados em relação aos valores de expressão do gene controle (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada amostra, analisada em triplicata, o valor de ΔC_T foi obtido pela subtração do valor de CT de *OsUBQ5* pelo CT do gene de interesse.

3.1.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através de teste-t de Student ou Anova One-Way seguido de Tukey HSD, utilizando o programa SPSS Base 12.0 para Windows.

3.2. Análises de elementos por ICP-OES

Para a análise da concentração de metais absorvidos pelas raízes e daqueles translocados para a parte aérea, as amostras foram secas a 60° C por 48h. O material seco foi pré-digerido durante a noite em 4 ml de HNO_3 98.8% . A digestão foi realizada usando um bloco aquecido com sistema de exaustão de gases (Model 1016, Tecator, Hoganas, Sweden). O material foi ressuspendido em 15 ml de HNO_3 2% redestilado. A análise dos elementos foi realizada utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (CIROS ICP Model FCE12; Spectro, Kleve, Germany). Padrões de folhas de tomate e farinha de arroz (SRM 1573A e 1568A, respectivamente; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) foram digeridas e analisadas juntamente com as amostras de arroz para assegurar a precisão da calibração do instrumento (Sperotto *et al*., 2009). As amostras de raízes (10 mg por repetição) e folhas (30 mg por repetição) foram enviadas para análise no Laboratório de Química do Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.3. Análise funcional por transformação de levedura

3.3.1. Recombinação em *Escherichia coli*

Foi extraído o RNA total de folhas de plantas submetidas a excesso de ferro, visto que apresentaram expressão aumentada do gene *OsVIT1* durante este estudo. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita a partir de 1 μg de RNA total. A adição das sequências de recombinação foi realizada por meio de duas etapas de PCR. Na primeira etapa, foram utilizados *primers* que anelam nas extremidades do gene *OsVIT1* e contém uma extensão de 20 pb (5'-TAAATTACCGGATCAATTCGGATGGTGAAGGAGTTCGTGCA-3'; 5-TAATTACATGATGCGGCCCTTTAGATGGACTGCACGGCC-3). Na segunda etapa, foram utilizados *primers* que anelam na extensão de 20 pb do primeiro par de *primers* (5'-ACGCAAACACAAATACACACACTAAATTACCGGATCAATTCGG-3'; 5-AATGTAAGCGTGACATAACTAATTACATGATGCGGCCCT-3), sendo que este último par também contem uma extensão de 20 pb. Deste modo, foi obtida uma construção do gene *OsVIT1* com 40 pb em cada extremidade, como resultado do PCR secundário. Após a amplificação, essa construção foi purificada utilizando o *kit* GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®).

A recombinação foi realizada conforme Parrish *et al*., 2004, utilizando o produto de PCR secundário, o plasmídeo pCM190 clivado no sítio de BamHI e NotI (conforme descrito por Garí *et al*., 1997) e células da linhagem KC8 de *E. coli*. Como controle positivo, foi utilizado o plasmídeo íntegro e, como controle negativo, foi utilizado o plasmídeo clivado (confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%) e sem adição do produto de PCR secundário.

Com a finalidade de verificar se as colônias que cresceram realmente eram recombinantes, foi realizado PCR de colônias isoladas, utilizando-se os *primers* do PCR primário. Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%).

As colônias que apresentaram a amplificação prevista foram inoculadas em meio LB líquido contendo os antibióticos ampicilina e canamicina. Após, foi realizada a extração do plasmídeo e o tratamento com RNAse. Para confirmar que estas colônias realmente continham o plasmídeo com a inserção do gene *OsVIT1*, foi realizada mais uma reação de PCR utilizando os *primers* do PCR primário. Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%).

3.3.2. Seleção de leveduras mutantes

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas, bem como os genótipos são: linhagem parental selvagem DY150 (MATa ura3-52, leu2-3, 112, trp1-1, his3-11, 15, ade2-1, can1-100(oc)); e linhagem mutante para o transporte vacuolar de Fe Δccc1 (MATa ura3-52, leu2-3, 112, trp1-1, his3-11, 15, ade2-1, can1-100(oc) Δccc1::HIS3). As cepas foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Mary Lou Guerinot, do Dartmouth College, Estados Unidos.

As linhagens foram crescidas em meio YPAD líquido contendo: 4% de glicose, 2% extrato de levedura, 4% de peptona e 0,008% de adenina hemisulfato, por 24h a 30°C, com agitação de 200 rpm. Após foram plaqueadas em meio YPAD sólido contendo 1,8% de ágar e crescidas em estufa a 30°C por 24h (Moura *et al*., 2010).

Para confirmação dos genótipos de cada uma das cepas, as mesmas foram testadas para cada marca de seleção auxotrófica: -URA (sem a adição de uracila), -LEU (sem a adição de leucina), -TRP (sem a adição de triptofano), -HIS (sem a adição de histidina), -ADE (sem a adição de adenina) e +CAN (com a adição de canavanina). Os marcadores auxotróficos foram

testados em meio sintético contendo 0,67% de YNB (Difco yeast nitrogen base – w/o amino acids and ammonium sulfate), 0,5% de sulfato de amônio, 2% de glicose e suplementados com os aminoácidos apropriados. O meio foi solidificado com 2% de Bacto Agar. Colônias isoladas do meio YPAD foram selecionadas e inoculadas nas placas de seleção. Para cada marca de seleção foi omitido do meio o aminoácido correspondente. Na placa para confirmar resistência à canavanina, foram adicionados 50 µl do respectivo aminoácido, 100 mg/ml.

3.3.3. Transformação de leveduras

Para a transformação da cepa mutante *Δccc1* de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado o plasmídeo recombinante pCM190VIT1 multiplicado em *E. coli*. Para obtenção de plasmídeos ultra purificados foi utilizado o kit Pure Link™ HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen®). A transformação foi feita utilizando o método LiAc/SS carrier DNA/PEG descrito por Gietz & Schiestl (2007) na linhagem mutante *Δccc1,* utilizando três quantidades do DNA de interesse (plasmídeo recombinante): 0,5; 1,0 e 2,0 µg. Após a transformação, células foram inoculadas em placas contendo meio de seleção auxotrófica sem a adição de uracila (–URA). Placas foram mantidas em estufa por quatro dias a 30°C. As leveduras *Δccc1* contendo o plasmídeos pCM190 recombinantes recuperam a capacidade de crescer em meio sem uracila, devido à marcação específica do plasmídeo. Selecionadas as leveduras transformantes, elas foram crescidas em meio mínimo contendo diferentes concentrações de Fe para avaliar a complementação gênica de *OsVIT1*.

4. RESULTADOS

4.1. Análises de expressão por RT-PCR quantitativo

O gene *OsVIT1* teve sua expressão induzida em resposta ao excesso de Fe apenas em folhas e *OsVIT2*, apesar de ter sido detectado em folhas e raízes, não apresentou resultados claros que permitam inferir uma possível função em situações de estresse por excesso de Fe (Figura 3).

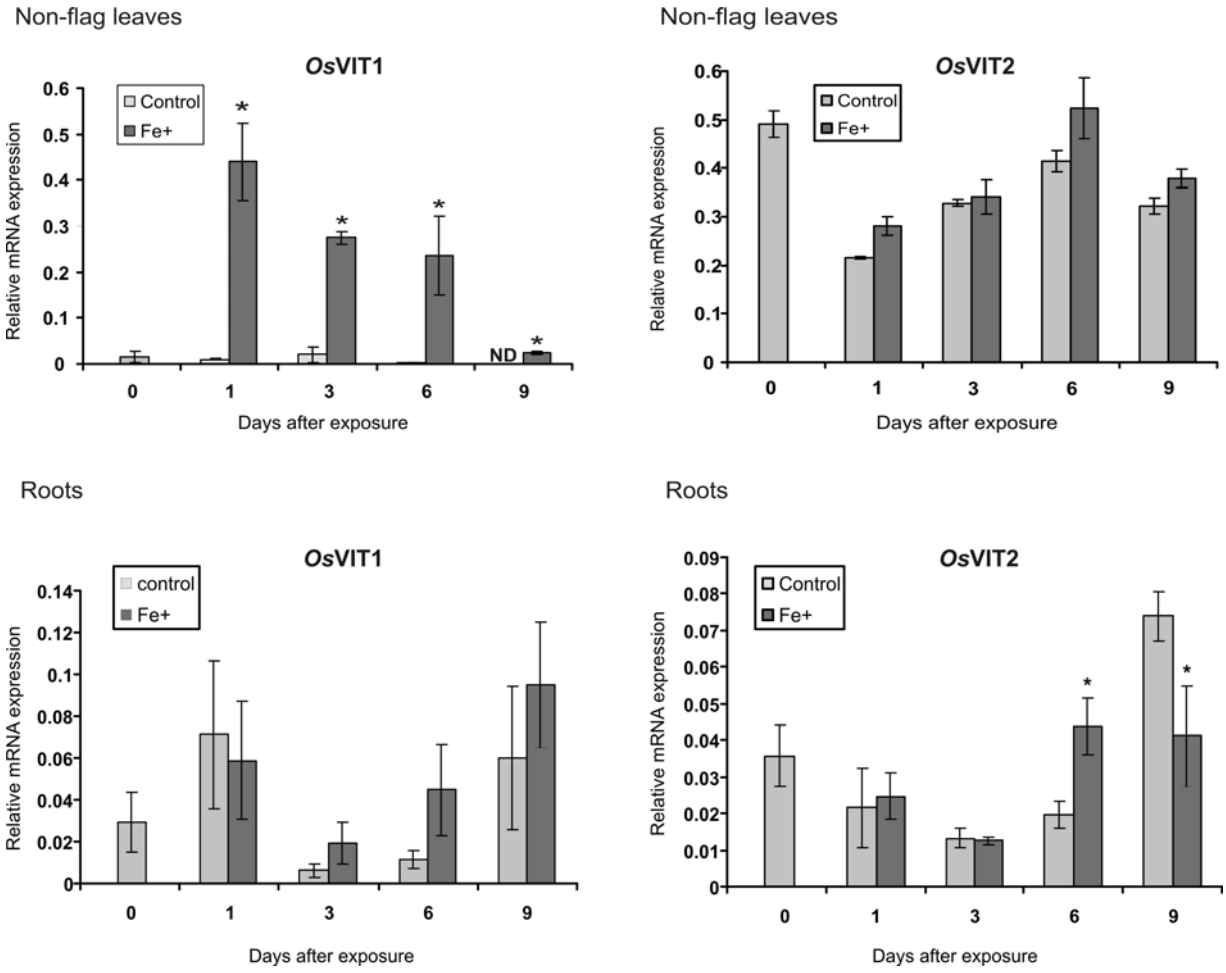

Figura 3: Expressão dos genes da família *VIT* em folhas destacadas e raízes de plantas de arroz da cultivar NIPPONBARE após exposição de um, três, seis e nove dias ao tratamento com excesso de ferro. Valores são médias de três repetições ± EP. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes dos controles (em um mesmo tempo de exposição) de acordo com o teste t de Student ($P \leq 0,05$).

A concentração de Fe em raízes e folhas foi determinada por ICP-OES (*inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy*) segundo Sperotto et al, 2009. Os resultados mostram que as amostras submetidas ao excesso de Fe acumularam grandes quantidades deste metal tanto em folhas quanto em raízes, após 9 dias de tratamento com excesso de ferro (Figura 4).

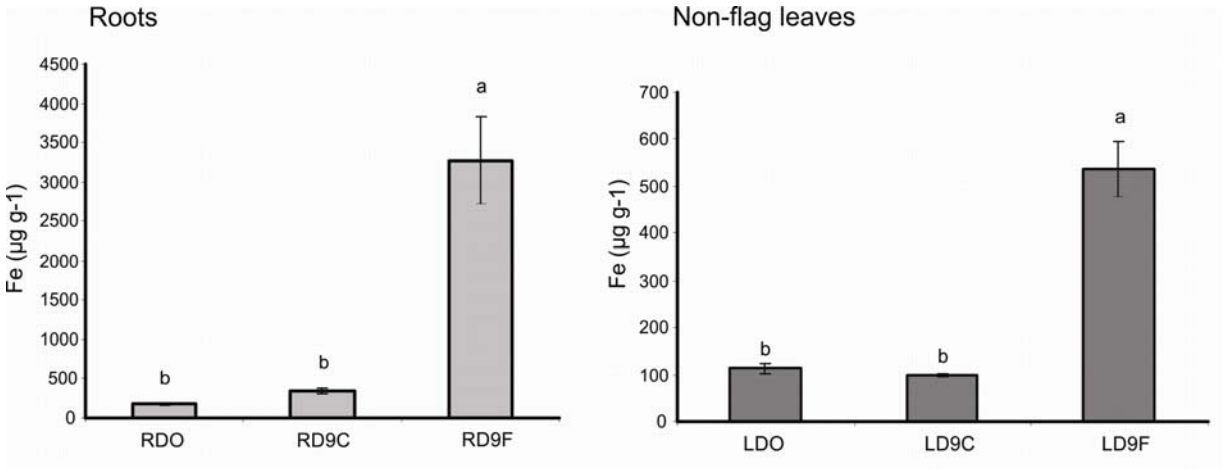

Figura 4: Concentração de ferro em raízes e folhas destacadas da cultivar NIPPONBARE, quantificado por ICP-OES após exposição a excesso de ferro. R (raiz), L (folha), D0 (dia zero), D9C (dia nove controle) e D9F (dia nove Fe+). Valores são médias de três repetições $\pm$ EP. A análise estatística dos dados foi realizada usando Anova One-Way seguida de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

A indução da expressão de Ferritina (*OsFer*) pelo excesso de ferro em folhas (Figura 5A) também confirma a eficiência do tratamento, pois já havia sido demonstrado pelo nosso grupo que a expressão de ferritina é induzida por tratamento de excesso de ferro em plantas de arroz (Stein *et al*., 2009).

Houve aumento da expressão de *OsVIT2* após 4 dias de germinação (Figura 5B), que coincide com o surgimento de tecidos fotossinteticamente ativos no embrião. O gene *OsVIT1* não teve expressão detectada durante a germinação.

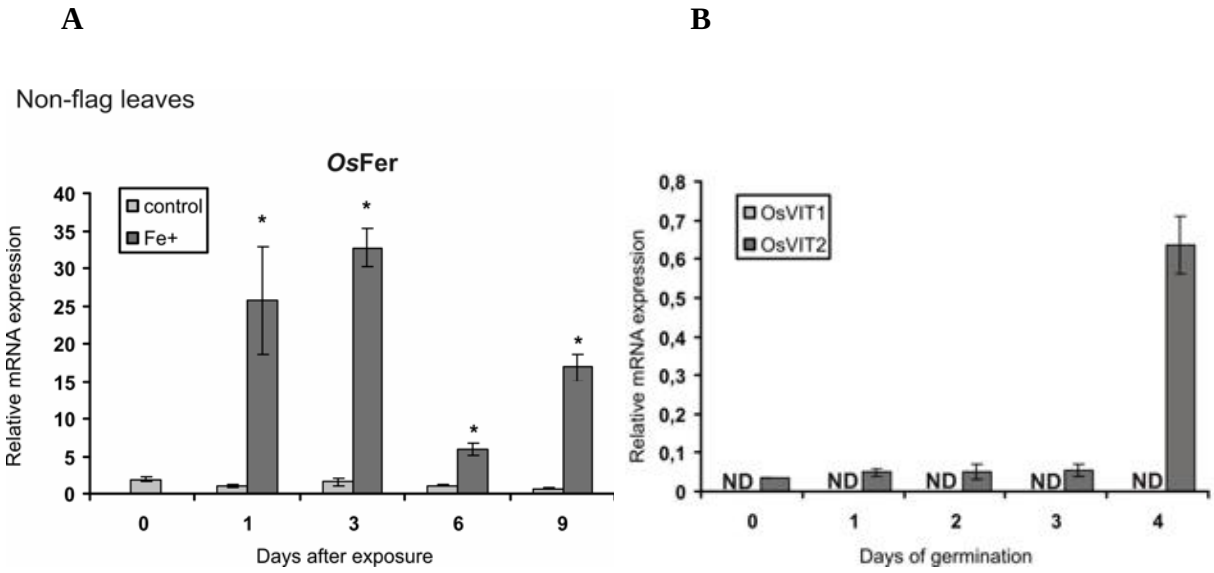

Figura 5: Expressão de Ferritina (*OsFer)* em folhas destacadas após exposição de um, três, seis e nove dias ao tratamento com excesso de ferro. Valores são médias de três repetições ± EP. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes dos controles (em um mesmo tempo de exposição) de acordo com o teste t de Student ($P \leq 0,05$) (A). Expressão dos genes da família *VIT* em sementes da cultivar NIPPONBARE durante o processo de germinação das sementes (B).

A análise da expressão em diferentes estágios reprodutivos mostra que *OsVIT1* tem um pico de expressão em panícula no estágio R5 e *OsVIT2* tem um pico de expressão em folha-bandeira no estágio R4, que possivelmente correspondem a momentos de grande mobilização e acúmulo de metais nestes órgãos (Figura 6).

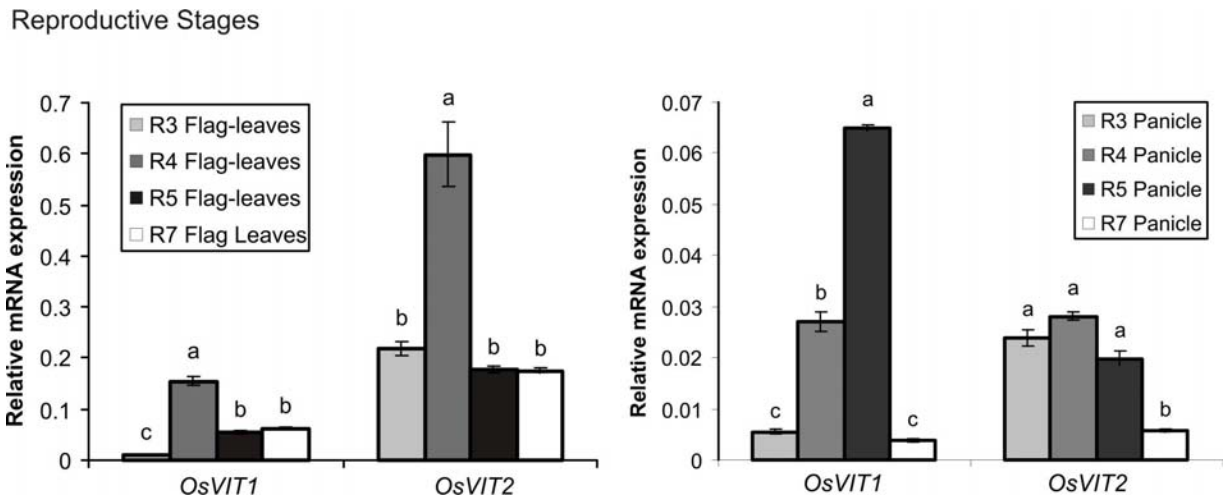

Figura 6: Expressão dos genes da família *VIT* em folhas-bandeira e panículas da cultivar NIPPONBARE em diferentes estágios reprodutivos da planta. Valores são médias de três repetições ± EP. A análise estatística dos dados foi realizada usando Anova One-Way seguida de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

Não houve acúmulo de transcritos de *OsVIT1* e nem alteração significativa na abundância dos transcritos de *OsVIT2* quando em excesso de Zn, em raízes e folhas, embora a eficiência do tratamento tenha sido comprovada pela indução da expressão dos genes *OsNAS1* e *OsIRO2* em raízes (dados não mostrados). A indução da expressão destes dois genes faz parte da resposta de plantas de arroz ao excesso de Zn (Ishimaru *et al*., 2008).

No tratamento com excesso de Mn (50 μM), não houve acúmulo de transcritos de *OsVIT1* e a expressão de *OsVIT2* apresentou um padrão oscilante, não respondendo de maneira clara ao tratamento (Figura 7). Devido a isto, repetimos o experimento com excesso de Mn utilizando 200 μM de Mn, para evitar que houvesse falta de resposta em consequência do uso de concentração de Mn insuficiente para causar estresse. Uma análise inicial dos dados não mostrou acúmulo de transcritos de *OsVIT1* e a expressão de *OsVIT2* não apresentou diferença entre a condição controle e o tratamento (dados não mostrados).

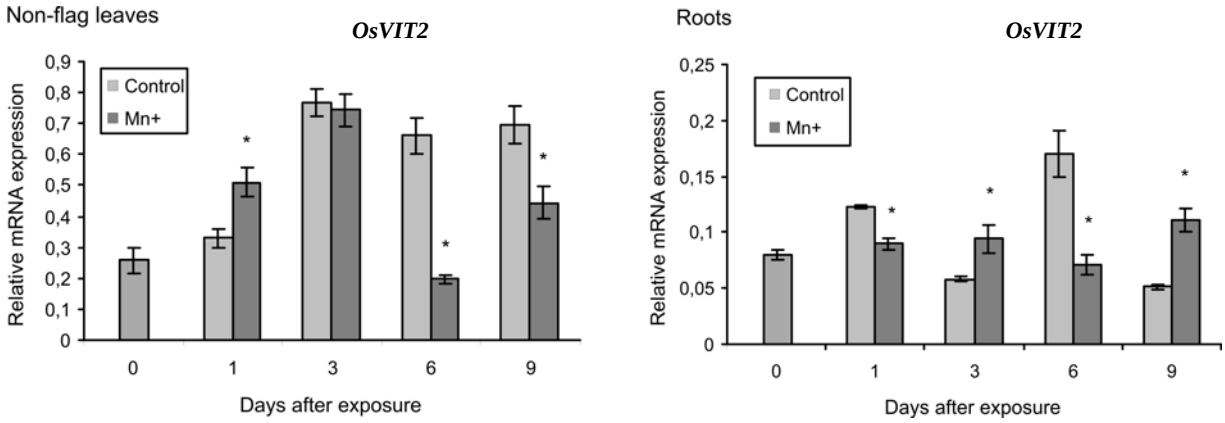

Figura 7: Expressão do gene *OsVIT2* em folhas destacadas e raízes da cultivar NIPPONBARE após exposição de um, três, seis e nove dias ao tratamento com excesso de manganês. Valores são médias de três repetições ± EP. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes dos controles (em um mesmo tempo de exposição) de acordo com o teste t de Student ($P \leq 0,05$).

4.2. Análise funcional por transformação de levedura

4.2.1. Recombinação em *Escherichia coli*

Considerando que o gene *OsVIT1* teve a expressão altamente regulada por ferro em folhas de arroz, apenas este gene foi escolhido para a realização de experimentos de complementação de leveduras mutantes.

Foram obtidos os plasmídeos pCM190 íntegro e clivado. O plasmídeo clivado foi detectado no gel como uma banda única com o tamanho esperado: 8012pb (Figura 8).

As sequências de recombinação foram adicionadas por meio de duas etapas de PCR, gerando uma construção contendo o gene *OsVIT1* (741pb) mais 40 pb em cada uma das extremidades (Figura 9).

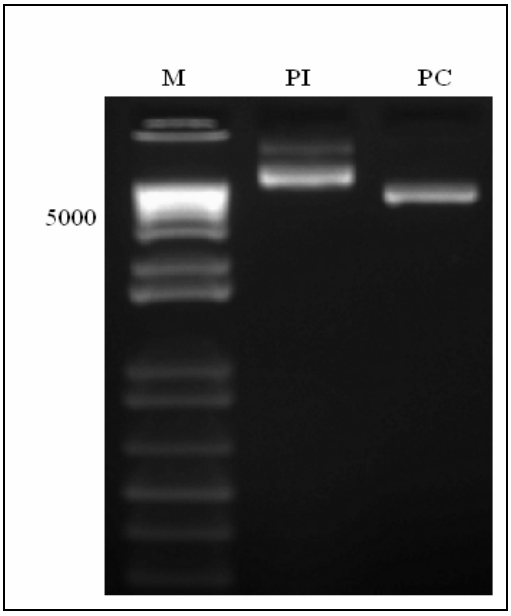

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1%). M: marcador, PI: plasmídeo íntegro, PC: plasmídeo clivado com as enzimas BamHI e NotI. Etapa da recombinação homóloga feita por Edilena Sperb. Figura cedida por Edilena Sperb.

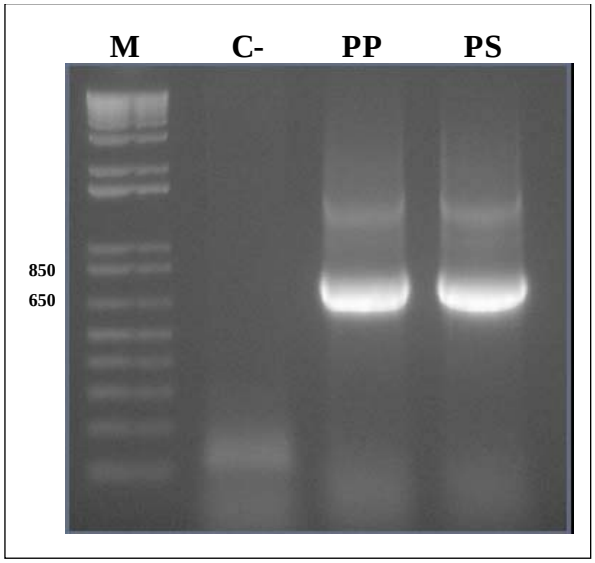

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando os produtos resultantes das duas etapas de PCR da recombinação homóloga. M: marcador, C-: controle negativo, PP: produto do PCR primário, PS: produto do PCR secundário.

Das placas contendo colônias de *E. coli* transformadas com o plasmídeo recombinante, foram selecionadas 60 colônias, analisadas por PCR. A Figura 10 mostra um dos quatro géis obtidos com os produtos de PCR, mostrando colônias com a amplificação esperada. As colônias 5, 8, 9, 10, 11 e 15 foram selecionadas para a próxima etapa.

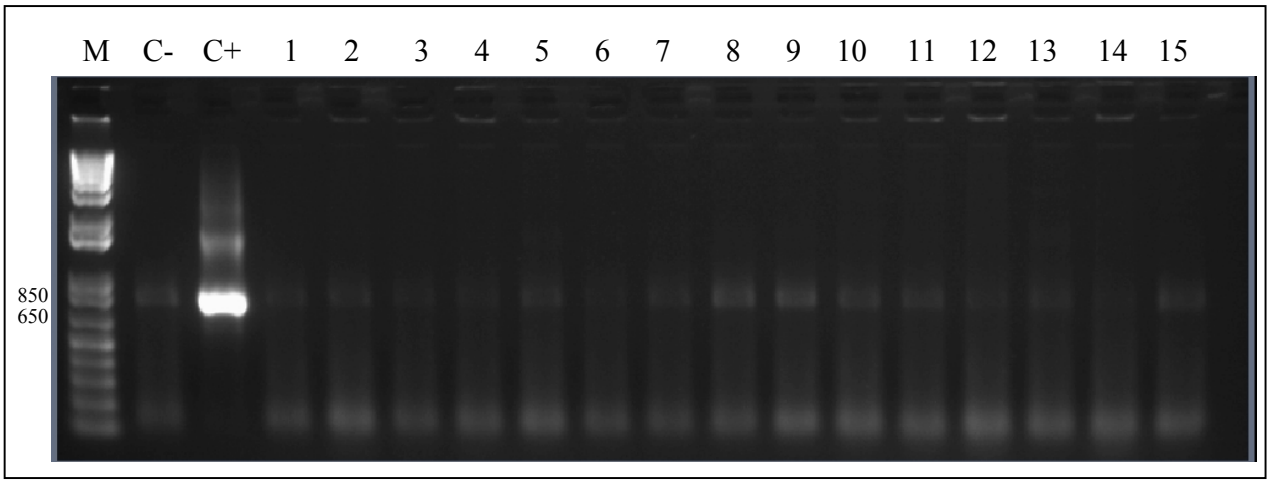

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de colônias. M: marcador, C-: controle negativo, C+: controle positivo, 1 a 15: produtos de PCR obtidos de diferentes colônias isoladas.

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/ml) e canamicina (25µg/ml) e crescidas por 24 horas a 30°C com agitação. Apenas a colônia 10 não apresentou crescimento. As outras 5 colônias passaram pela etapa de extração de plasmídeo (miniprep) e foram analisadas novamente por PCR (Figura 11). A colônia 8 apresentou a melhor banda de amplificação e foi a selecionada para uma extração ultra-purificada de plasmídeo (midiprep) utilizando o kit Pure Link™ HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen®). O produto desta midiprep foi usado para a transformação de leveduras mutantes para o transporte vacuolar de ferro.

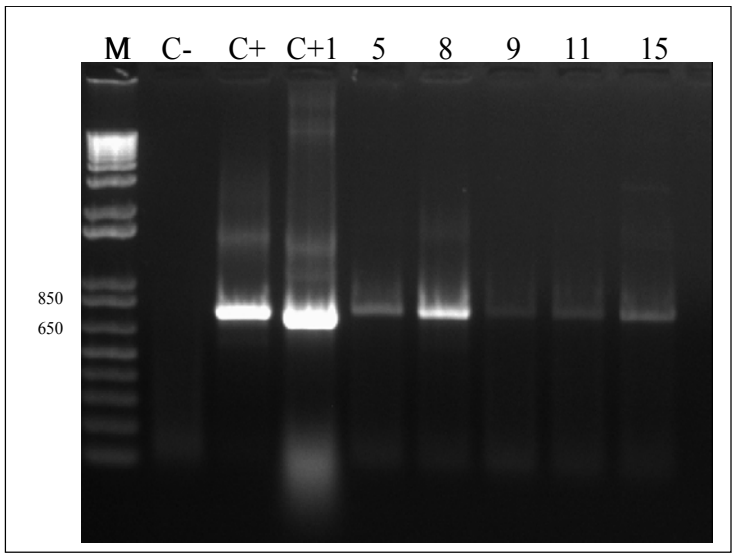

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de plasmídeo isolado. M: marcador, C-: controle negativo, C+: controle positivo, C+1: controle positivo (antes da adição das sequências da recombinação homóloga), 5/8/9/11/15: produtos de PCR obtidos a partir da extração do plasmídeos de diferentes colônias.

4.2.2. Seleção de leveduras mutantes

A seleção ocorreu como o esperado, o que pode ser observado na Figura 12. Tanto a linhagem selvagem (DY150) quanto a mutante (*Δccc1*) de *S. cerevisiae* são capazes de crescer em placa contendo meio completo (Figura 12A) e são resistentes à canavanina (Figura 12B). Ambas linhagens não são capazes de sintetizar alguns de seus nutrientes essenciais. Assim, na ausência de qualquer um deles do meio, as leveduras não apresentam crescimento (Figura 12-C a F). A linhagem *Δccc1* ao ter o gene *CCC1* mutado recupera a capacidade de sintetizar histidina, por isso ela é capaz de crescer em meio com ausência deste aminoácido (Figura 12G), mas o mesmo não ocorre para a linhagem selvagem (DY150). Estes resultados viabilizam o uso destas leveduras para o experimento de transformação com o plasmídeo recombinante contendo o gene *OsVIT1*.

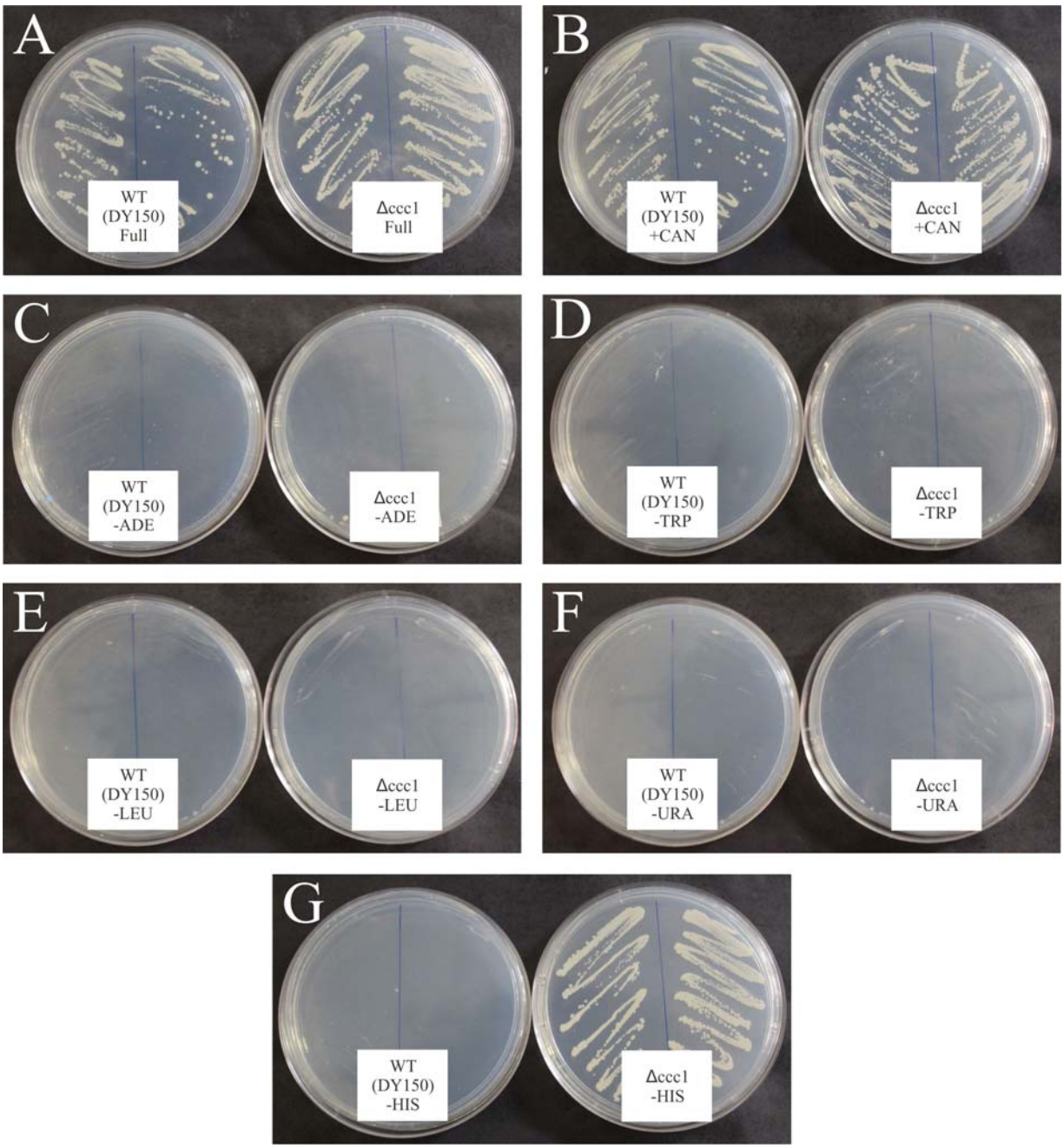

Figura 12: Placas de seleção de leveduras. WT (DY150): linhagem selvagem, *Δccc1*: linhagem mutante para transportadores de ferro, full: meio contendo todos os nutrientes, +CAN: meio contendo todos os nutrientes + canavanina, -ADE: meio sem adenina, -TRP: meio sem triptofano, -LEU: meio sem leucina, -URA: meio sem uracila, -HIS: meio sem histidina.

4.2.3. Transformação de leveduras

A etapa de complementação de leveduras mutantes com o gene *OsVIT1* está em andamento. Até o momento, a transformação foi realizada duas vezes. Somente na segunda vez obtivemos resultado positivo, com o crescimento de três colônias de *S. cerevisiae.* As três colônias foram inoculadas em meio de seleção –URA (sem uracila) para estoque (Figura 13). Após, as leveduras transformantes foram crescidas em meio contendo diferentes concentrações de Fe para avaliar a atividade da proteína OsVIT1 na complementação do fenótipo das leveduras mutantes *Δccc1*, defectivas no transporte de Fe vacuolar (Figura 14). O resultado observado não foi o esperado, pois as células transformadas apresentaram comportamento igual ao das células defectivas no transporte de Fe vacuolar, se mostrando sensíveis à exposição a altas concentrações de Fe. Outros experimentos serão realizados como extração de plasmídeo de leveduras para confirmar a presença do gene *OsVIT1* nas células transformadas, assim como confirmar se o plasmídeo usado na transformação é o ideal para expressão em leveduras. Após, as leveduras transformantes serão novamente crescidas em meio contendo diferentes concentrações de Fe. Se for necessário, a etapa de transformação será repetida, utilizando outro plasmídeo recombinante, que seja mais apropriado.

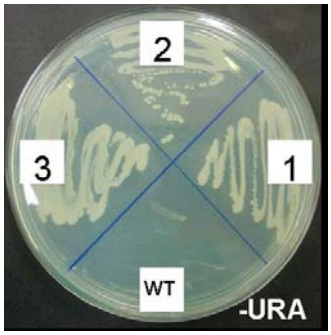

Figura 13: Placa de seleção -URA (sem uracila), contendo as leveduras WT (DY150): linhagem selvagem, e de 1 a 3: colônias resultantes da etapa de transformação de leveduras mutantes *Δccc1* com plasmídeo recombinante contendo o gene *OsVIT1*.

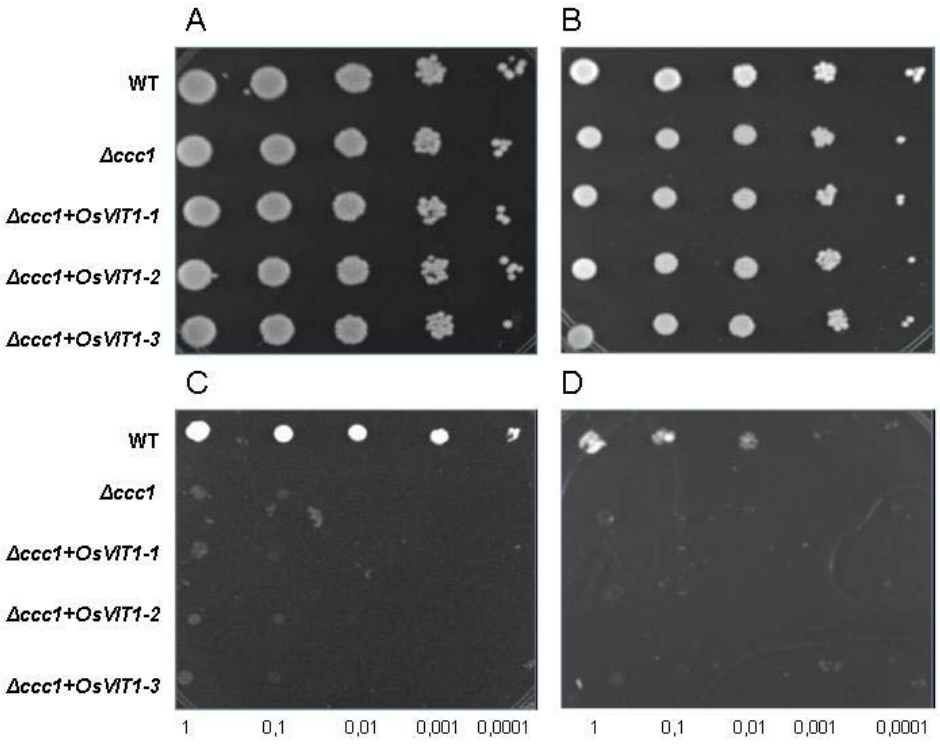

Figura 14: Teste de gota. (A) meio controle, (B) 2mM de FeSO4, (c) 5mM de FeSO4 e (D) 10mM de FeSO4. As células foram aplicadas no meio em 5 diluições diferentes: 1; 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001. WT: levedura selvagem, *Δccc1*: linhagem mutante e *Δccc1+OsVIT1* de 1 a 3: leveduras após transformação.

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho indicam uma possível relação entre a expressão de *OsVIT1* e os níveis de Fe intracelular nas folhas, devido ao fato de sua expressão ser induzida quando as plantas são expostas a excesso de Fe. O mesmo não ocorre para este gene em raízes expostas a excesso de Fe, onde sua expressão não apresentou um padrão que permita inferir este tipo de relação, ou quando exposto a excesso de outros metais como Zn e Mn, quando os transcritos de *OsVIT1* não foram detectados, tanto em raízes, quanto em folhas. Devido ao fato de leveduras Δccc1, mutantes no transporte vacuolar de ferro, expressando *VIT1* de *Arabidopsis* apresentarem o conteúdo de ferro e manganês vacuolar aumentado, conforme o descrito por Kim et al (2006), nós esperávamos que *OsVIT1* também tivesse sua expressão regulada por Mn. O fato deste resultado não ter sido observado não descarta a possibilidade do gene *OsVIT1* transportar Mn de maneira secundária, durante o transporte de Fe para dentro do vacúolo, para diminuir os efeitos deletérios que o excesso desses metais causa nas células. Testes complementares com a quantificação de metais em vacúolos isolados de plantas submetidas a excesso de Fe poderiam esclarecer esta possível função em plantas de arroz.

O gene *OsVIT2*, apesar de ter sido detectado em todos os tratamentos em folhas e raízes, não apresentou resultados claros que permitam inferir uma possível função em situações de estresse. Somente *OsVIT2* teve sua expressão detectada durante o processo de germinação, que coincidiu com o surgimento de tecidos fotossinteticamente ativos no embrião. Assim, podemos sugerir que *OsVIT2* apresenta um padrão de expressão constante, sendo constantemente expresso pela planta para manter os níveis de Fe (e talvez outros metais) não tóxicos no citosol. Por outro lado, é possível que *OsVIT1* seja requisitado em situações de estresse, quando a quantidade de metais pode ser extremamente elevada, transportando metais para dentro do vacúolo.

Os picos de expressão de *OsVIT1* em panícula no estágio R5 e de *OsVIT2* em folha-bandeira no estágio R4 possivelmente correspondem a momentos de grande mobilização e acúmulo de metais nestes órgãos. Estes metais podem ser remobilizados, em outro momento, para o grão. Assim, esclarecer os mecanismos de regulação desses genes poderá ser interessante para futuros trabalhos visando a biofortificação de grãos de arroz.

É possível que a existência de duas cópias do gene *VIT* em plantas de arroz seja resultante de um evento de duplicação, após o qual houve divergência dos padrões de expressão. Estes dois genes podem estar sofrendo um processo de subfuncionalização ou de neofuncionalização. O processo de subfuncionalização foi descrito por Hughes (1994) e sugere que genes duplicados adquirem mutações deletérias, que causam a perda de função em regiões reguladoras (Force *et al.*, 1999), de forma que os genes gerados por duplicação acabam compartilhando funções antes exercidas pelo ancestral. Já no processo de neofuncionalização, uma cópia do gene pode manter a função ancestral, enquanto o outro pode acumular mutações até eventualmente adquirir uma nova função (Jaillon *et al*., 2009).

Experimentos visando a complementação de leveduras mutantes para o transporte de ferro vacuolar com o gene *OsVIT1* estão sendo realizados. Esperamos que a capacidade de crescer em meio contendo diferentes concentrações de ferro seja recuperada. Este resultado contribuirá para a caracterização do gene *OsVIT1* como transportador de ferro para dentro do vacúolo, tendo como objetivo evitar os efeitos tóxicos do excesso desse metal para a célula, quando acumulado no citoplasma.

A caracterização dos genes da família *VIT* e a compreensão dos mecanismos que regulam a sua expressão em arroz são essenciais para um melhor entendimento do transporte e homeostase de ferro nesta planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

Buchman A.L. (2006) Specific Dietary Components; manganese. In: Shils M.E., Shike M., Ross A.C., Caballero B., Cousins R.J. Modern nutrition in health and disease. 10ª ed., Lippincott Williams & Wilkins. p.326-331.

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

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

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006) Statistical databases. Disponível na Internet: http://www.fao.org.

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

FNB – Food and Nutrition Board (2004) Recommended Intakes for Individuals Elements, Institute of Medicine, National Academies.

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

Foy, C.D. (1984) Physiological effects of hydrogen, aluminium, and manganese toxicities in acid soils. In: Adams F., ed. Soil acidity and liming, Agron Monograph 12. Madison, WI: ASA-CSSSA, 57–97.

Foy, C.D.; Chaney, R.L.; White, M.C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. Annual Review of Plant Physiology 29: 511–567.

Führs, H.; Hartwig, M.; Molina, L.E.B.; et al. (2008) Early manganese-toxicity response in Vigna unguiculata L. – a proteomic and transcriptomic study. Proteomics 8: 149–159.

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

Gietz, R.D. & Schiestl, R.H. (2007) High-efficience yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols, vol.2, n.1.

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

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

Grotz, N. & Guerinot, M.L. (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1763: 595–608.

Grusak, M.A.; DellaPenna, D. (1999) Improving the nutrient composition of to enhance human nutrition and health. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology Vol. 50: 133-161.

Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. Biochim Biophys Acta 1645: 190-198.

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

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

Heenan, D.P. & Carter, O.G. (1976) Tolerance of soybean cultivars to manganese toxicity. Agronomy Journal 16: 389–391.

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

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

IBGE (2010) http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm (acesso em setembro de 2010).

Inoue H., Kobayashi T., Nozoye T., Takahashi M., Kakei Y., Suzuki K., Nakazono M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K. (2009) Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. J Biol Chem 284: 3470-3479.

IRGSP - International Rice Genome Sequencing Project. (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436: 793 – 800.

Ishimaru, Y.; Suzuki M.; Tsukamoto, T.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Kobayashi, T.; Wada, Y.; Watanabe, S.; Matsuhashi, S.; Takahashi M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; & Nishizawa, N.K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe^{+3}-phytosiderophore and as Fe^{+2}. The Plant Journal, 45: 335-346.

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

Jaillon, O.; Aury, J.-M.; Wincker, P. (2009) "Changing by doubling", the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes. Comptes Rendus Biologies 332: 241–253

Jeong J., Guerinot M.L. (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. Trends Plant Sci 14: 280-285.

Jiang, W.; Struik, P.C.; Lingna, J.; van Keulen, H.; Ming, Z.; Stomph, T.J. (2007) Uptake and distribution of root-applied or foliar-applied ^{65}Zn after flowering in aerobic rice. Ann Appl Biol 150: 383-391

Kennedy G., et al. (2002) Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. International Rice Commission Newsletter, v.51, p.33-42.

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

Kramer, U.; Talke, I.N.; Hanikenne, M. (2007) Transition metal transport. FEBS Lett 581: 2263-2272.

Li, L.; Chen, O.S.; Ward, D.M.; Kaplan, J. (2001) CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 276, N 31, pp. 29515–29519.

Lidon, F.C. (2001) Tolerance of rice to excess manganese in the early stages of vegetative growth. Characterization of manganese accumulation. Journal of Plant Physiology 158: 1341–1348.

Lidon, F.C. & Teixeira, M.G. (2000) Rice tolerance to excess Mn: implications in the chloroplast lamellae and synthesis of a novel Mn protein. Plant Physiology and Biochemistry 38: 969–978.

Lidon, F.C.; Barreiro, M.G.; Ramalho, J.C. (2004) Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. Journal of Plant Physiology 161: 1235–1244.

Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 -ΔΔCt method. Methods 25:402–408

Loneragan J.F. (1988) Distribution and movement of Manganese in plants In: Graham R.D., Hannam R.J., Uren N.C. Manganese in soils and plants. Netherlands, Kluwer Academic, p.113-124.

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

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

Momonoi K., Yoshida K., Mano S., Takahashi H., Nakamori C., Shoji K., Nitta A., Nishimura M. (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. The Plant Journal. Vol.59, 437-447.

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

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

Moura, D.J.; Castilhos, B.; Immich, B.F.; Cañedo, A.D.; Henriques, J.A.P.; Lenz, G.; Saffi, J. (2010) Kin3 protein, a NIMA-related kinase of Saccharomyces cerevisiae, is involved in DNA adduct damage response. Cell Cycle, 9: 2220–2229.

Paine, J.A.; Shipton, C.A.; Chaggar S.; et al. (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. Nature Biotechnology 23: 482-487.

Palmgren, M.G.; Clemens, S.; Williams, L.M.; Krämer, U.; Borg, S.; Schjorring, J.K.; Sanders, D. (2008) Zinc Biofortification of cereals: Problems and solutions. Trends in Plant Science 13:1-10.

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

Reuter D.J., Alston A.M., Mcfarlane J.D. (1988) Occurrence and Correction of Manganese Deficiency in Plants. In: Graham R.D., Hannam R.J., Uren N.C. Manganese in soils and plants. Netherlands, Kluwer Academic, p.205-218.

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

Römheld, V. & Marchner, H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderofores in roots of grases. Plant Physiology, 80: 175-180.

Schlichting, E. & Sparrow, L.A. (1988) Distribution and amelioration of manganese toxic soils. In: Graham, R.D., Hannam, R.J., Uren, N.C., eds. Manganese in soils and plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 277–292.

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

Sperotto, R.A.; Ricachenevsky, F.K.; Duarte, G.L.; Boff, T.; Lopes, K.L.; Sperb, E.R.; Grusak, M.A.; Fett, J.P. (2009) Identication of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling

and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta, 230:985–1002.

Stein, R.J.; Ricachenevsky, F.K.; Fett, J.P. (2009) Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). Plant Scienci 177: 563–569.

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

UNICEF (2010) www.unicef.org/nutrition/index_iodine.html (acesso em setembro de 2010).

Walter M.; Marchezan E.; Avila L.A. (2008) Arroz: composição e características nutricionais. Ciência Rural, v.38, n.4, p.1184-1192. ISSN 0103-8478

Ye, X.; Al-Babili, S.; Klöti, A.; Zhang, J.; Lucca, P.; Beyer, P.; Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287:303-305.

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

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