

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

**Identificação e Caracterização de Genes que Codificam  
Ferroportinas em Plantas de Arroz (*Oryza sativa* L.)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Autora: Karina Letícia Lopes  
Orientadora: Profa. Dra. Janette Palma Fett  
Porto Alegre, 30 de Julho de 2013.

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

Este trabalho foi desenvolvido principalmente no Laboratório de Fisiologia Vegetal, vinculado ao Centro de Biotecnologia e ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Alguns experimentos desta Dissertação foram realizados no laboratório da Dra. Mary Lou Guerinot, no *Dartmouth College*, NH, USA de 20 de Janeiro a 20 de Março de 2013. As despesas da viagem foram financiadas pela NSF-USA (National Science Foundation of USA).

Plantas foram crescidas nos campos experimentais de Cachoeirinha-RS do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) e na casa de vegetação da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

Esta pesquisa foi financiada pelas seguintes agências: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à Profa. Janette, por ter me aceitado como mais uma de suas ‘filhas’.

Ao Prof. Arthur, pela dedicação, juntamente com a Profa. Janette, para manter a nossa ‘casa’ sempre em funcionamento.

Ao Prof. Felipe Maraschin pelas idéias, ajudas e pela coorientação, mesmo que não oficial.

Aos Professores Denise Cargnelutti, Raul Antônio Sperotto e Charley Staats por terem aceitado o convite para participarem da minha defesa como membros da banca. E à Professora Luciane Passaglia por aceitar ser membro suplente da banca.

Aos Professores Giancarlo Pasquali e Arthur Germano Fett-Neto pela participação na minha Comissão de Acompanhamento.

Ao Luciano e à Sílvia da Secretaria do PPGBCM pela eficiência e simpatia com que atendem a todas as nossas solicitações.

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, que acabaram virando grandes amigos. Às inúmeras festas, jantás, churrascos e confraternizações que alegraram minha vida, e me mantiveram bem alimentada.

Ao Felipe e à Paloma por sempre me ajudarem com idéias, sugestões e críticas referentes ao meu projeto. Mas principalmente por estarem sempre por perto quando eu mais precisava de uma voz amiga, dizendo que tudo ia dar certo e para não desanimar com os inúmeros resultados negativos. Adoro vocês !

Às minhas grandes amigas Kelly e Estela. À Kelly por ser minha ‘vó’ querida, e por sempre me receber em casa com chás e conversas reconfortantes. À Estela por sempre me entender tão bem e ser ótima companheira de festas, cinemas e compras. Amo vocês!

À minha família, que me faz ser feliz simplesmente por existirem: minhas irmãs Andréa e Ana; meus sobrinhos João Pedro, Toninho e Cicinha; e minha mãe Luiza. Vocês são tudo pra mim!!!

Ao Rafa, pela companhia e amizade nesses quase 7 anos. Certamente uma pessoa muito especial na minha vida. Te amo!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUÇÃO .....	9
IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS EM ARROZ.....	9
TRANSPORTE DE MINERAIS EM PLANTAS.....	11
FERROPORTINAS .....	15
OBJETIVOS .....	17
GERAL .....	17
ESPECÍFICOS .....	17
RESULTADOS.....	18
CAPÍTULO 1 .....	19
STRUCTURE AND METAL REGULATION OF RICE FERROPORTIN GENES .....	19
ABSTRACT .....	19
INTRODUCTION .....	20
MATERIALS AND METHODS.....	21
RESULTS AND DISCUSSION .....	24
CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES .....	34
ACKNOWLEDGEMENTS .....	35
REFERENCES.....	36
CAPÍTULO 2 .....	40
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS FERROPORTINAS DE ARROZ ( <i>ORYZA SATIVA</i> L.) .....	40
INTRODUÇÃO .....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	57
REFERÊNCIAS.....	59
DISCUSSÃO GERAL .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

At = *Arabidopsis thaliana*

ATP = adenosine triphosphate [trifosfato de adenosina]

BPDS = batho-phenanthroline disulfonic acid [ácido bato-fenantrolina disulfônico]

cDNA = complementary DNA [DNA complementar]

DMA = deoxymugineic acid [ácido deoximugineico]

DMAS = deoxymugineic acid synthase [ácido deoximugineico sintase]

DNA = desoxyribonucleic acid [ácido desoxirribonucleico]

EDTA = ethylenediamine tetracetic acid [ácido etilenodiamino tetra-acético]

EGTA = Ethylene glycol tetraacetic acid [ácido etileno glicol bis-tetra acético]

FER = ferritin [ferritina]

FIT = Fe-deficiency Induced Transcription Factor [fator de transcrição induzido por deficiência de ferro]

FPN = ferroportin [ferroportina]

GFP = green fluorescent protein [proteína fluorescente verde]

GUS = Beta Glucuronidase [beta glucuronidase]

HMA = heavy metal-associated domain proteins [proteínas com domínio associado a metal pesado]

IREG= Iron Regulated protein [proteína regulada por ferro]

IRT = iron-regulated transporter [transportador regulado por ferro]

MAR = Multiple Antibiotic Resistance protein [proteína de resistência a múltiplos antibióticos]

MARL = Multiple Antibiotic Resistance like protein [proteína do tipo de resistência a múltiplos antibióticos]

MIT = Mitochondrial Iron Transporter [transportador mitocondrial de ferro]

MTP = metal tolerance protein [proteína de tolerância a metal]

NA = nicotianamine [nicotianamine]

NAS = nicotianamine synthase [nicotianamina sintase]

NRAMP = natural resistance-associated macrophage protein [proteína de resistência natural associada a macrófago]

Os = *Oryza sativa* [arroz]

PCR = polymerase chain reaction [reação em cadeia da polimerase]

PIC = Permease in Chloroplasts [permease em cloroplasto]

PS = phytosiderophore [fitosideróforo]

qPCR = quantitative PCR [PCR quantitativo]

RAP-DB = The Rice Annotation Project Database [Base de dados do projeto de anotação do genoma de arroz]

RNA = ribonucleic acid [ácido ribonucleico]

RT = reverse transcription [transcrição reversa]

SC = synthetic complete medium [meio sintético completo]

SE = standard error [erro padrão]

T-DNA = transfer DNA [DNA de transferência]

UBQ = ubiquitin [ubiquitina]

UTR = untranslated region [região não-traduzida]

VIT = vacuolar iron transporter [transportador vacuolar de ferro]

WT = wild type [tipo selvagem]

YFP = yellow fluorescent protein [proteína fluorescente amarela]

YS = yellow stripe protein [proteína yellow stripe]

YSL = yellow stripe like protein [proteína do tipo yellow stripe]

ZIF = zinc-induced facilitator [facilitador induzido por zinco]

ZIFL = zinc-induced facilitator like protein [proteína do tipo facilitador induzido por zinco]

ZIP = zinc-regulated, iron-regulated-like protein [proteína do tipo zinco-regulada, ferro-regulada]

Zm = *Zea mays* [milho]

## RESUMO

Estudos envolvendo a homeostase de nutrientes minerais essenciais em plantas são muito importantes, pois sem eles as plantas são incapazes de completar o seu ciclo de vida. Esses nutrientes minerais são obtidos principalmente a partir do solo e suas concentrações devem ser finamente reguladas. Em arroz, esses estudos são ainda mais importantes devido ao valor econômico e nutricional desta planta. Sabe-se que o fenômeno da deficiência de um metal pode levar ao excesso de outros em diversas espécies e, portanto, as plantas devem possuir mecanismos para lidar com o influxo de metais potencialmente tóxicos durante casos de deficiência. Recentemente, foi proposto que em *Arabidopsis* a ferroportina AtFPN2 está envolvida com esse mecanismo de transporte e detoxificação de metais durante a deficiência de Fe. Nada se sabe até o momento sobre as ferroportinas de outras espécies de plantas. O objetivo desse trabalho foi contribuir para a elucidação dos mecanismos de regulação da homeostase e transporte de metais em plantas de arroz, estudando a função, regulação e localização das proteínas homólogas a ferroportinas. Foram encontrados três possíveis genes de ferroportinas no genoma do arroz: um com homologia a AtFPN1 e AtFPN2 (Os06g36450) nomeado *OsFPN1*, e dois com homologia a AtMAR1 (Os12g37530 e Os05g04120), nomeados *OsMARL1* e *OsMARL2* (MAR Like), respectivamente. A proteína OsFPN1 possui 53% de similaridade com a proteína AtFPN2 e tem predição de ser um transportador vacuolar, similar a AtFPN2. OsFPN1 conferiu tolerância a Fe quando expressa na levedura *Δccc1*, defectiva para transportadores vacuolares de Fe. A localização da proteína OsFPN1 fusionada a GFP, expressa em células de levedura, foi vacuolar. Além disso, *OsFPN1* teve expressão regulada por Fe e Ni na parte aérea de plantas de arroz. As proteínas OsMARL1 e OsMARL2 compartilham 48% e 41% de similaridade com a proteína AtMAR1. OsMARL1 tem predição de ser um transportador de cloroplasto, assim como AtMAR1, enquanto OsMARL2 tem predição de ser um transportador de mitocôndria. O gene *OsMARL1* pode produzir dois transcritos distintos, denominados *a* e *b*. O transcrito *OsMARL1a* teve expressão regulada pelos níveis de Fe e Ni na parte aérea. *OsMARL1b* apresentou regulação da expressão por Ni nas raízes. OsMARL1 não foi capaz de resgatar o crescimento de nenhuma das linhagens de leveduras mutantes testadas até o momento. O padrão de expressão de *OsFPN1*, *OsMARL1a*, *OsMARL1b* e *OsMARL2* durante o desenvolvimento reprodutivo indica um possível envolvimento das ferroportinas neste processo. Complementação de plantas de *Arabidopsis* contendo mutações nos genes de ferroportina com o gene de arroz *OsFPN1* está em andamento, assim como a análise de plantas de arroz contendo mutação no gene *Osmarl1*. Os resultados suportam a hipótese de que OsFPN1 pode ser a proteína ortóloga a AtFPN2 em arroz. Os resultados obtidos até o momento para *OsMARL1* não permitem inferir uma possível função da proteína no transporte de metais, nem confirmar sua localização. *OsMARL2* parece ter sido originado por um evento de duplicação do gene *OsMARL1*, e estar passando por um processo de perda de função. A caracterização funcional das ferroportinas de arroz pode fornecer informações a serem consideradas para o desenvolvimento de estratégias de sucesso para a biofortificação do grão de arroz com minerais essenciais.

## ABSTRACT

Studies involving the homeostasis of essential mineral nutrients in plants are very important, because without them the plants are unable to complete their life cycle. These mineral nutrients are obtained mainly from the soil and their concentrations must be finely regulated. In rice, these studies are even more important due to the nutritional and economic importance of this crop. In plants, deficiency of one metal can lead to excess of others, and therefore plants must possess mechanisms to deal with the influx of potentially toxic metals during deficiency events. Recently, it has been proposed that the *Arabidopsis* ferroportin AtFPN2 is involved with this mechanism of transport and detoxification of metals during Fe-deficiency. Nothing is known about ferroportins from other plant species. The aim of this work was contribute to the elucidation of the mechanisms of homeostasis and transport of metals in rice plants, studying the function, regulation and localization of proteins homologous to ferroportins. Three putative ferroportin genes were found in rice genome: one with homology to both *AtFPN1* and *AtFPN2* (Os06g36450) named *OsFPN1*, and two with homology to *AtMAR1* (Os12g37530 and Os05g04120), named *OsMARL1* and *OsMARL2* (MAR Like), respectively. The OsFPN1 protein shares 53% similarity with AtFPN2 and it is predicted to be a vacuolar transporter, similarly to AtFPN2. The OsFPN1 confers tolerance to Fe when expressed in the yeast strain *Δccc1*, defective in vacuolar iron transport. The localization of OsFPN1 fused to the GFP protein was vacuolar in yeast cells. In addition, *OsFPN1* had its expression regulated by Fe and Ni in plant shoots. The OsMARL1 and OsMARL2 proteins share 48% and 41% similarity with AtMAR1. OsMARL1 is predicted to be a chloroplast transporter, as AtMAR1, while OsMARL2 is predicted to be a mitochondrial transporter. *OsMARL1* gene can produce two distinct transcripts: *OsMARL1a* and *OsMARL1b*. *OsMARL1a* had expression regulated by Fe and Ni levels in plant shoots. *OsMARL1b* expression was regulated by Ni in plant roots. OsMARL1 was unable to rescue the growth of mutant yeast strains tested so far. The expression pattern of *OsFPN1*, *OsMARL1a*, *OsMARL1b* and *OsMARL2* during reproductive development indicates a possible involvement of ferroportins in this process. Complementation of *Arabidopsis* ferroportin mutants with the *OsFPN1* gene are in progress, as well as analyses of the *Osmarl1* rice mutant. These results support the hypothesis that OsFPN1 may be the ortholog of AtFPN2 in rice. The results obtained so far do not allow to infer a possible role of the OsMARL1 protein in metal transport or to confirm its intracellular localization. An evaluation of the gene structure of *OsMARL2* suggests that this gene was originated after duplication of *OsMARL1*, and this gene could be going through a process of loss of function. Functional characterization of rice ferroportins can provide useful information to be considered for designing of successful strategies for rice biofortification with essential minerals.



# INTRODUÇÃO

## Importância dos estudos em 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 (UNICEF, 2010). 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 11,83 milhões de toneladas (cerca de 2% da produção mundial) e destaca-se como único país não-asiático entre os 10 maiores produtores (FAO, 2010). O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz no Brasil, sendo responsável por 68,3% da produção nacional dessa cultura (IBGE, 2013). 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, assim como nos países asiáticos, ele fornece entre 50 e 70% das calorias diárias ingeridas (FAO, 2010). No Brasil, o consumo per capita é de 108 g 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), cujas deficiências afetam milhões de pessoas. Entre quatro e cinco bilhões de pessoas sofrem de deficiência de Fe e há estimativas de que aproximadamente dois bilhões de pessoas são anêmicas (UNICEF, 2010). O Fe serve como cofator para muitas proteínas contendo complexos heme, *clusters* de Fe-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 de Fe também causa problemas durante a gestação, redução no rendimento escolar e queda na produtividade (Zimmermann and Hurrell, 2007). Já o Zn está presente em mais de trezentas enzimas que estão envolvidas em processos metabólicos básicos nos humanos. Portanto, um consumo adequado desse mineral é necessário para o crescimento e reprodução normais. Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja sob risco de consumo

insuficiente de Zn, condição que pode resultar em crescimento retardado, imaturidade sexual, problemas cognitivos e imunodepressão (Hotz and Brown, 2004).

Várias estratégias têm sido propostas para lidar com a deficiência de micronutrientes, incluindo suplementação, fortificação de alimentos processados, aplicação de fertilizantes e a implementação de programas de cruzamentos e de engenharia genética com a finalidade de gerar grãos ricos em nutrientes minerais (Bashir et al., 2010; Cakmak et al., 2010; Gómez-Galera et al., 2010; Masuda et al., 2012; Yuan et al., 2012). O melhoramento clássico e a engenharia genética envolvem a criação de linhagens de plantas contendo genes que favorecem o acúmulo de minerais biodisponíveis. Porém os cruzamentos limitam-se a plantas sexualmente compatíveis, enquanto a engenharia genética não possui limitações taxonômicas, fazendo o uso, inclusive, de genes artificiais (Gómez-Galera et al., 2010). Uma das limitações das plantas transgênicas é que elas devem passar por uma série de avaliações dos potenciais riscos ao meio ambiente para sua liberação para produção em larga escala (Wolt et al., 2010).

Vários autores defendem a biofortificação do grão de arroz, processo que consiste em aumentar as concentrações de minerais nos grãos, como Fe e Zn, e também aumentar a biodisponibilidade de tais nutrientes em plantas cultivadas (Palmgren et al., 2008; HarvestPlus, 2006). Como alimento básico de grande parte da população humana e destacando-se 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 nos países do terceiro mundo (Ye et al., 2000; Paine et al., 2005). Linhagens transgênicas de arroz que produzem pró-vitamina A em seu endosperma, denominadas *Golden Rice*, foram obtidas com sucesso, pois os precursores dessa rota já estão presentes naturalmente no endosperma (Paine et al., 2005).

O aumento das concentrações de Fe e Zn no endosperma do arroz depende primariamente de maior eficiência no transporte dos metais do solo até o grão (White and Broadley, 2009). Abordagens para corrigir esse problema devem visar as possíveis etapas limitantes do transporte, tais como a captura dos metais a partir do solo, o carregamento e descarregamento no xilema, o carregamento e descarregamento no floema, e a translocação para o grão durante os estádios

reprodutivos. É importante notar também que qualquer intervenção nesses passos deverá prever e evitar o acúmulo inapropriado de metais em níveis tóxicos na planta, pois, por exemplo, o Fe livre por meio da reação de Fenton é altamente reativo e tóxico, podendo levar à produção de espécies reativas de oxigênio, extremamente prejudiciais às células vegetais (Morrisey and Guerinot, 2009).

Estudos mostraram que a translocação de minerais para as sementes é finamente regulada. Plantas de arroz crescidas em quantidades normais e excedentes de Zn mostraram que o acúmulo deste mineral nos grãos ocorreu, em grande parte, pela captação do mineral nas raízes após o florescimento e não pela remobilização deste a partir das folhas (Jiang et al., 2007). Um trabalho mais recente mostrou que a remobilização mineral de órgãos vegetativos pode ocorrer em plantas de arroz, a qual é fortemente dependente do equilíbrio de Fe na planta. No entanto, a remobilização não é absolutamente necessária para a aquisição de minerais pelas sementes, sugerindo que a captação e a translocação de minerais a partir das raízes seja a principal rota (Sperotto et al., 2012a).

É cada vez maior o número de trabalhos sendo realizados, em plantas de arroz, com o objetivo de caracterizar genes e mecanismos responsáveis pelos processos de 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. O presente trabalho visa gerar ferramentas para futura aplicação no melhoramento quanto a qualidade nutricional dos grãos de arroz.

## **Transporte de minerais em plantas**

As plantas necessitam de um conjunto de nutrientes minerais essenciais, sem os quais são incapazes de completar o seu ciclo de vida (Marschner, 1995). Esses nutrientes minerais são obtidos principalmente a partir do solo e são tradicionalmente classificados em macro e micronutrientes, dependendo da quantidade exigida para o desenvolvimento normal da planta. Contudo, quando presentes em excesso, os micronutrientes se tornam prejudiciais ao funcionamento do metabolismo vegetal. Portanto, a homeostase desses elementos deve ser um processo finamente regulado com o objetivo de manter níveis suficientes, mas não excessivos, dentro das células.

Dentre os micronutrientes, encontram-se os metais Fe, Zn, cobre (Cu) e manganês (Mn), sendo que todos eles ocorrem no estado de oxidação 2+ em sistemas biológicos. Alguns também ocorrem em outros estados de oxidação, como o Cu<sup>1+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, ambos encontrados no solo e nos sistemas biológicos. De qualquer modo, todos os íons metálicos são incapazes de atravessar membranas lipídicas por difusão passiva, e a ação de proteínas é necessária em cada etapa de transporte transmembrana ao longo do corpo da planta: a absorção a partir do solo; a entrada e saída de compartimentos apoplásticos, como o xilema; e o transporte através das membranas de organelas (Grotz and Guerinot, 2006).

De fato, diversos membros de diferentes famílias gênicas encontradas em genomas vegetais já foram caracterizados como transportadores desses metais: Zinc-regulated, Iron-regulated Protein (ZIP; Guerinot, 2000), Zinc-Induced Facilitator (ZIF; Haydon and Cobbett, 2007), Metal Tolerance Protein (MTP; van der Zaal, 1999), Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (NRAMP; Curie et al., 2000), Yellow Stripe Like (YSL; Curie et al., 2009) e Heavy Metal-Associated Domain Proteins (HMA; Hussain et al., 2004). Um tema recorrente no estudo desses transportadores é que a maioria deles tem um amplo espectro de substratos, ou seja, uma mesma proteína é capaz de mediar o transporte de mais de um metal essencial, mesmo que com diferentes afinidades. Além disso, muitas dessas proteínas também são capazes de transportar metais que são tóxicos e não-essenciais para as plantas, especificamente o cádmio (Cd), o cobalto (Co) e o níquel (Ni). Portanto, as plantas devem ter mecanismos para lidar com esse problema perante solos que apresentam metais tóxicos disponíveis.

Por exemplo, as dicotiledôneas e monocotiledôneas não-Poaceae quando em deficiência de Fe (Fe-) utilizam a chamada estratégia I (**Fig. 1**), que consiste em três processos coordenadamente induzidos nas raízes: (1) extrusão de prótons por bombas dependentes de ATP para acidificar a rizosfera e aumentar a solubilidade do Fe<sup>3+</sup>; (2) redução do Fe<sup>3+</sup> por ferro-redutases ligadas à membrana; e (3) absorção do Fe<sup>2+</sup> por transportadores transmembrana de Fe (Palmer and Guerinot, 2009). Essas respostas têm sido estudadas mais amplamente na planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, e a principal proteína responsável por essa absorção do Fe é a AtIRT1 (Iron-Regulated Transporter 1) pertencente à família ZIP (Connolly et al., 2002). Contudo, foi demonstrado por diferentes métodos que essa proteína não transporta apenas Fe<sup>2+</sup>, mas também Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> (Eide et al., 1996; Korshunova et al., 1999; Connolly et al., 2002; Vert et al., 2002; Schaaf et al., 2006). De fato, a análise do perfil metálico de plantas

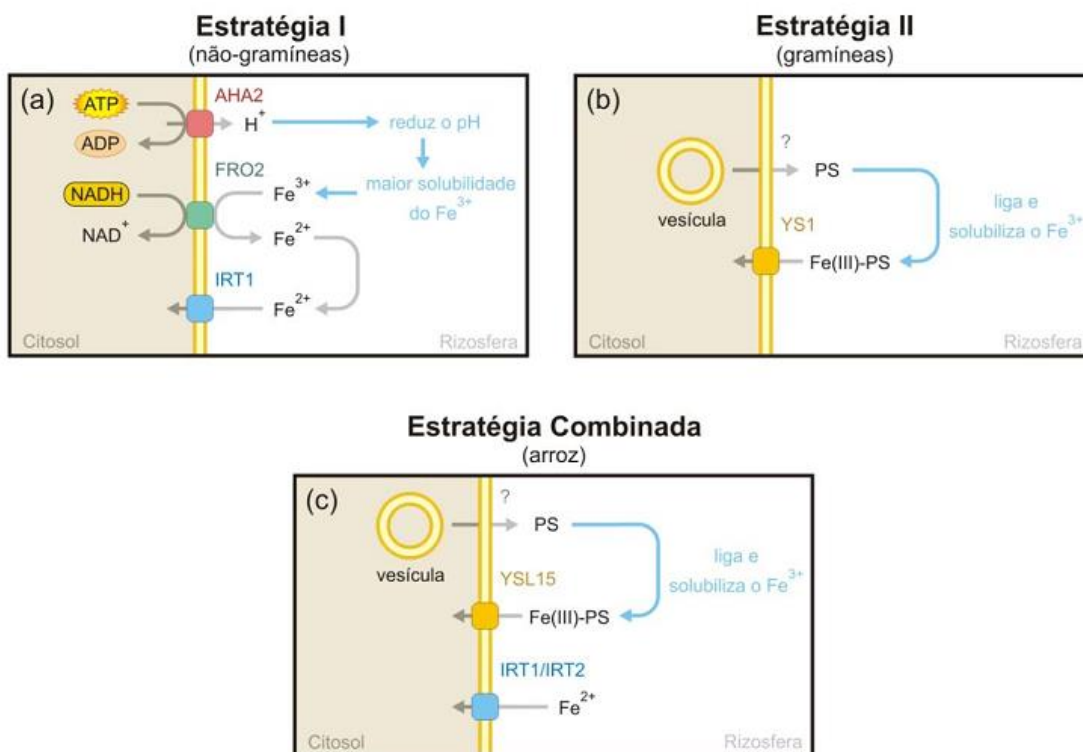
de *Arabidopsis* crescidas sob diferentes concentrações de Fe indica que o crescimento da parte aérea é reduzido pela deficiência de Fe, contudo Zn, Mn, Co e Cd continuam sendo absorvidos por AtIRT1 e a concentração desses metais acaba por aumentar na parte aérea (Baxter et al., 2007).

O arroz possui uma peculiaridade com relação às respostas a deficiência de Fe. Assim como outras Poaceae, ele faz uso da chamada estratégia II (**Fig. 1**), que envolve a liberação de compostos de baixo peso molecular na rizosfera conhecidos como fitosideróforos (PS), os quais são derivados estruturais do ácido mugineico que têm alta afinidade por  $Fe^{3+}$  (Römheld and Marchner, 1986). Esses PS liberados são capazes de quelar o  $Fe^{3+}$  do solo, e os complexos Fe(III)-PS então formados são absorvidos por transportadores homólogos ao ZmYS1 (Yellow Stripe 1) de milho (Curie et al., 2001), que no arroz é a proteína OsYSL15 (Inoue et al., 2009; Lee et al., 2009). No entanto as plantas de arroz também utilizam a estratégia I (**Fig. 1**), e são capazes de absorver diretamente o  $Fe^{2+}$ , que é abundante em solos alagados, através das proteínas OsIRT1 e OsIRT2 (Ishimaru et al., 2006). Logo, as plantas de arroz adotam uma estratégia combinada para a captação de Fe do solo.

Experimentos de expressão heteróloga em leveduras e plantas superexpressando o gene *OsIRT1* indicam que essa proteína é capaz de transportar Fe, Zn e Cd. Análises por eletrofisiologia em óocitos de *Xenopus laevis* expressando o gene *OsYSL15* testaram o transporte de Fe e Mn quelados por PS, e somente o complexo Fe(III)-DMA foi transportado. Contudo, de acordo com os estudos, não é improvável que OsYSL15 também transporte outros metais não testados, dado que seu homólogo ZmYS1 é capaz de transportar  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  (Schaaf et al., 2004; Murata et al., 2006). Portanto, o arroz também parece ser suscetível ao acúmulo colateral de outros metais quando submetido a deficiência de Fe, e deve possuir mecanismos de detoxificação. Por exemplo, já foi constatado que a deficiência de Fe causa o acúmulo de Cd em arroz mediado pelos transportadores OsIRT1 e OsIRT2 (Nakanishi et al., 2006).

O fenômeno da deficiência de um metal levar ao excesso de outros já foi observado em diversas outras espécies. Plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) sob deficiência de Mn apresentaram concentrações elevadas de Fe, Zn e Cu; enquanto que as deficiências de Fe e Cu levaram a maiores concentrações de Mn e Zn (Pedas et al., 2008). A deficiência de Zn resultou

em concentrações maiores de Fe nas raízes de arroz (*Oryza sativa* L., Ishimaru et al., 2005), e a deficiência de Fe levou a excesso de Zn em plantas de milho (*Zea mays* L., Kanai et al., 2009).



**Figura 1.** Estratégia para captura de Fe a partir do solo. (a) Estratégia I. Próton-ATPases (AHA2) liberam prótons para acidificar a rizosfera e aumentar a solubilidade do Fe<sup>3+</sup>. O Fe<sup>3+</sup> solubilizado é reduzido por ferro-redutases ligadas à membrana (FRO2), e o Fe<sup>2+</sup> é absorvido por transportadores de metal (IRT1). (b) Estratégia II. Fitosideróforos (PS) são sintetizados e liberados na rizosfera, possivelmente por um mecanismo mediado por vesículas. Os PS quelam o Fe<sup>3+</sup> rizosférico, e os complexos Fe(III)-PS são absorvidos por transportadores de oligopeptídeos (YS1). (c) Estratégia combinada. Além de capturar Fe<sup>3+</sup> pela estratégia II, o arroz também pode absorver diretamente o Fe<sup>2+</sup> por transportadores de metal (IRT1/IRT2). Os nomes dos genes em (a), (b), e (c) se referem respectivamente a Arabidopsis, milho e arroz. (Fonte: Sperotto et al., 2012b)

Portanto, as plantas devem possuir mecanismos para lidar com o inevitável efeito colateral do influxo de metais potencialmente tóxicos durante a deficiência de Fe. O vacúolo em particular parece ter um papel importante nesse processo, pois já foram demonstrados em plantas e leveduras mecanismos de sequestro de certos metais dentro dessa organela a fim de evitar níveis excessivos no citoplasma. Por exemplo, a expressão da proteína AtMTP3 é induzida em condição

de deficiência de Fe. A proteína AtMTP3 localizada no tonoplasto, pode ser responsável pelo sequestro de Zn no vacúolo, o qual é acumulado nas células da raiz durante a deficiência de Fe em *Arabidopsis* (Arrivault et al., 2006).

## **Ferroportinas**

As ferroportinas são as únicas proteínas de efluxo de Fe até hoje identificadas em animais (Muckenthaler et al., 2008). Em animais, o controle dos níveis de Fe no plasma e no fluido extracelular depende de três fluxos principais: absorção de Fe no intestino (ou no trofoblasto, no caso dos fetos), liberação do Fe armazenado no fígado, e a reciclagem do Fe das células senescentes pelos macrófagos (Ganz, 2005). A ferroportina humana (Scl40a1) está envolvida em todos os três fluxos, e mutações no gene da ferroportina já foram identificadas como causadoras da hemocromatose hereditária, condição hereditária que causa acúmulo de Fe nos tecidos em virtude de seu excesso no organismo (Fleming and Sly, 2001).

Uma busca no genoma de *Arabidopsis thaliana* por proteínas similares às ferroportinas de animais revelou duas proteínas ortólogas nessa espécie: AtFPN1/IREG1 (Ferroportin 1, Iron Regulated 1, At2g38460) e AtFPN2/IREG2 (At5g03570), além da proteína AtMAR1/FPN3/IREG3 (Multiple Antibiotic Resistance 1, At5g26820) que apresenta uma similaridade menor. O primeiro trabalho relacionando as ferroportinas de *Arabidopsis* com o status de Fe na planta foi publicado em 2004 (Collangelo and Guerinot, 2004), e mostrou que AtFPN2 é co-regulada com AtIRT1 pelo fator de transcrição FIT1 (Fe-deficiency Induced Transcription Factor 1) em condições de deficiência de Fe. Até o momento, três estudos foram publicados caracterizando funcionalmente as proteínas AtFPN1, AtFPN2 e AtMAR1, as quais possuem papéis distintos na homeostase de metais (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009; Conte et al., 2009).

AtFPN1 se localiza na membrana plasmática, é expressa principalmente nas células vasculares, não é regulada por Fe, e mutantes perda-de-função *fpn1* translocam menos Fe e Co para a parte aérea (Morrissey et al., 2009). Em contraste, AtFPN2 se localiza no tonoplasto, é expressa nas camadas externas da raiz, e é induzida por deficiência de Fe. Mutantes *fpn2* são mais sensíveis à presença de Co e Ni (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009). Com base nesses resultados, foi proposto que AtFPN1 é responsável pelo carregamento de metais nas

células vasculares, enquanto AtFPN2 é responsável pelo seqüestro vacuolar do excesso de metais que entra na raiz durante a deficiência de Fe. A proteína AtMAR1 foi isolada independentemente de plantas resistentes a antibióticos similares aos aminoglicosídeos que inibem a síntese procariótica de proteínas (Conte et al., 2009). Resultados subsequentes indicaram que AtMAR1 se localiza no cloroplasto e o gene é expresso de modo uniforme na maioria dos tecidos de plântulas. Devido a similaridade com ferroportinas e ao fato de que a superexpressão de AtMAR1 leva a clorose (típico sintoma de plantas em deficiência de Fe), foi sugerido que essa proteína poderia estar envolvida na homeostase de Fe em cloroplastos, e serviria também como uma porta de entrada oportunística de antibióticos para dentro daquela organela. De fato, a clorose observada pôde ser revertida quando as plantas foram crescidas sob quantidades elevadas de Fe (300  $\mu$ M de Fe-EDTA); e os níveis de transcritos de *AtMAR1* diminuíram sob deficiência de Fe, apesar de não terem sido alterados sob excesso de Fe. Baseado nesses resultados e no fato dos aminoglicosídeos serem estruturalmente semelhantes às poliaminas (a nicotianamina - NA, um importante quelante endógeno de Fe, é uma poliamina), foi proposto que AtMAR1 também exerce um papel importante na homeostase de Fe ao transportar Fe, NA ou Fe quelado por NA.

As ferroportinas não foram caracterizadas em nenhuma outra espécie de plantas, inclusive no arroz. Buscas no banco de transcritos de arroz utilizando a seqüência das proteínas ferroportinas de *Arabidopsis* como seqüências *query* revelaram duas proteínas putativas semelhantes à AtMAR1 (Os12g37530 e Os05g04120) e uma semelhante às duas ferroportinas já caracterizadas de *Arabidopsis*, AtFPN1 e AtFPN2 (Os06g36450). O estudo das ferroportinas em arroz pode constituir um passo importante na compreensão dos mecanismos de transporte e seqüestro de metais, e os resultados obtidos poderão ser úteis na definição de estratégias visando melhorar a qualidade nutricional do grão de arroz, com aumento da concentração de minerais essenciais e evitando o acúmulo de metais tóxicos.



# OBJETIVOS

## Geral

Contribuir para a elucidação dos mecanismos de regulação da homeostase e transporte de metais em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) estudando a função, regulação e localização das proteínas homólogas a ferroportinas de *Arabidopsis* (OsFPN1, OsMARL1 e OsMARL2).

## Específicos

- Determinar a arquitetura dos genes *OsFPN1*, *OsMARL1* e *OsMARL2*.
- Comparar as proteínas das ferroportinas de arroz com as de *Arabidopsis*.
- Analisar a expressão gênica dos genes que codificam ferroportinas em arroz, em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento reprodutivo da planta, e em resposta a diferentes suprimentos de metais.
  - Avaliar a especificidade de substratos das proteínas OsFPN1 e OsMARL1, pela expressão heteróloga em linhagens de leveduras contendo mutações em genes que codificam diferentes transportadores de metais.
  - Determinar a localização subcelular das ferroportinas de arroz (OsFPN1 e OsMARL1) através da expressão transiente do gene fusionado a proteínas fluorescentes.
  - Caracterizar funcionalmente o gene *OsFPN1* expressando-o nos mutantes perda-de-função *fpn1*, *fpn2* e *fpn1fpn2* de *Arabidopsis thaliana*.
  - Confirmar e avaliar o mutante perda-de-função para o gene de arroz *OsMARL1* obtido do banco de mutantes Postech.

## RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados em dois capítulos, conforme o descrito abaixo:

- Capítulo 1: descreve os resultados referente à análise da estrutura dos genes das ferroportinas de arroz (*OsFPN1*, *OsMARL1* e *OsMARL2*); a comparação das proteínas das ferroportinas de arroz com as de *Arabidopsis* e a análise da expressão gênica dos genes que codificam as ferroportinas de arroz em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento reprodutivo da planta, e em resposta a diferentes suprimentos de micronutrientes. Este capítulo foi redigido seguindo as regras do periódico *Plant Science*; foi utilizado para obtenção do crédito obrigatório de redação científica do PPGBCM e fará parte de um manuscrito a ser submetido futuramente.

- Capítulo 2: descreve os resultados referente à análise funcional das ferroportinas de arroz (*OsFPN1* e *OsMARL1*) através da expressão heteróloga em linhagens de leveduras contendo mutações em genes que codificam diferentes transportadores de metais; aos ensaios de expressão transiente em protoplasto de *Arabidopsis* para localização subcelular de *OsFPN1* e *OsMARL1*; e da confirmação dos mutantes *Osmarl1* obtidos do banco de mutantes Postech por PCR.

# CAPÍTULO 1

## Structure and Metal Regulation of Rice Ferroportin Genes

Karina L Lopes<sup>1</sup>, Felipe K Ricachenevsky<sup>1</sup>, Paloma K Menguer<sup>1</sup>, Ariane Vitali<sup>1</sup>, Felipe Maraschin<sup>2</sup>, Janette P Fett<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av.Bento Gonçalves 9500, P.O.Box 15005, Porto Alegre, 91501-970, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, 91501-970, Brazil.

### Abstract

**Iron (Fe) is an essential micronutrient for plants. Uptake, distribution, and storage of Fe must be tightly regulated. Recently, ferroportin genes from *Arabidopsis* were described and shown to be involved not only in transport of iron, but also of cobalt and nickel. We found three ferroportin homolog genes in rice named *OsFPN1*, *OsMARL1* and *OsMARL2*. Using quantitative RT-PCR to characterize these genes we show that transcript levels of *OsMARL1* and *OsFPN1* are up-regulated under Fe-deficiency and down-regulated under Fe-excess. The *OsFPN1* protein shares 53% similarity with *AtFPN2* and it is predicted to be a vacuolar transporter, similarly to *AtFPN2*. The *OsMARL1* protein shares 48% similarity with *AtMAR1* and it is predicted to be a chloroplast transporter, as *AtMAR1*. In conclusion, rice ferroportin genes are clear candidates to be playing important roles in iron transport in rice.**

## Introduction

Iron (Fe) is an essential micronutrient for plant growth, and plant development is significantly impaired under Fe-deficient conditions. Fe is important for several cellular processes such as respiration, chlorophyll biosynthesis, and photosynthetic electron transport [1]. Excess Fe in cells or unbound Fe can stimulate the production of free radicals that are sources of oxidative stress damage [2]. Thus uptake, distribution, and storage of Fe must be tightly regulated [3, 4]. The transporters involved in the absorption of Fe in rice have been characterized. Rice adopts a combined strategy, absorbing Fe(III) complexed with phytosiderophores efficiently, mediated by OsYSL15 (Yellow Stripe Like) transporter and also taking up Fe<sup>2+</sup> through the OsIRT1 and OsIRT2 (Iron-Regulated Transporter) transporters. These transporter proteins are expressed in roots under Fe-deficiency and increase the Fe uptake from the rhizosphere [5, 6, 7]. In *Arabidopsis*, Fe absorption into root epidermal cells depends mainly on AtIRT1. However, the substrate specificity of AtIRT1 is wide, leading to excessive accumulation of other metals in Fe-deficient plants [8]. The rice grain is a poor source of essential micronutrients such as Fe and Zn, and the deficiencies of these minerals affect over three billion people worldwide [9]. Different approaches have been used aiming to increase the amounts of edible Fe in rice seed. Plants over-expressing *FER*, an iron storage protein, accumulated more Fe in the seed endosperm compared to WT plants [10, 11]. Transgenic lines over-expressing *OsNAS3* also resulted in increased Fe accumulation in roots, shoots and seeds, suggesting that NA (nicotianamine) overproduction enhances the translocation of Fe to rice grains [12]. Rice plants overexpressing the root membrane transporter *OsYSL15* accumulated up to 29% more Fe than WT plants [13]. Recently, it was demonstrated that the expression of *OsYSL2*, also a membrane transporter in roots, when driven by the sucrose transporter promoter, resulted in a significant increase in grain Fe [14]. All the efforts aiming at biofortification of the rice grain with minerals must consider the possibility of undesired increase of toxic metals, as a consequence of the broad substrate specificity of several plant metal transporters. Ferroportins are a new class of metal transporters, possibly involved in detoxification and with potential application in biofortification strategies. It has been shown that the gene encoding the *Arabidopsis* AtIREG2/ FPN2 (IRON REGULATED 2/ Ferroportin 2) is co-regulated with AtIRT1 by transcription factor FIT1 (Fe-deficiency Induced Transcription Factor 1) under Fe-deficient conditions [15]. AtFPN2 is a member of the

ferroportin family, and is a nickel (Ni), cobalt (Co) and Fe transporter at the vacuolar membrane and is expressed in the two outermost layers of the root, suggesting a role in buffering metal influx [16, 17]. Other gene members of this family are AtIREG1/ FPN1 and AtMAR1/ IREG3/ FPN3. AtFPN1 is localized at the plasma membrane and is expressed in the stele, suggesting a role in vascular Fe and Co loading to the shoots [17]. AtMAR1 (Multiple Antibiotic Resistance1) was first described to confer resistance to multiple aminoglycoside antibiotics when mutated, and has been described as a AtIREG3/FPN3 based on sequence similarity to AtIREG1/ FPN1 and AtIREG2/ FPN2. AtMAR1 is localized at the chloroplast and is likely to be involved in cellular Fe homeostasis [18]. In search for rice genes that might be homologous to *Arabidopsis* ferroportins, we found three sequences: one with homology to both *AtFPN1* and *AtFPN2* (Os06g36450) named *OsFPN1*, and two with homology to *AtMAR1* (Os12g37530 e Os05g04120), named *OsMARL1* and *OsMARL2* (MAR Like), respectively. Nothing is known about the rice ferroportin genes yet. In this work we characterized rice ferroportin genes and evaluated their transcription patterns using quantitative RT-PCR. Understanding the function of these genes and all rice metal/ nutrient homeostasis will help to design strategies to improve the transport of micronutrients to seeds, thus contributing to the biofortification of this crop, which is extremely important for human nutrition [19].

## Materials and methods

### Bioinformatics

Protein sequences of *Arabidopsis thaliana AtFPN1* (At2g38460), *AtFPN2* (At5g03570) and *AtMAR1* (At5g26820) were obtained from The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>) database and used as queries to search the rice genome at the TIGR Rice Genome database (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) for FPN sequences using tBLASTn and BLASTp. Corresponding rice Ferroportin genomic and coding sequences were searched in two databases: MSU Rice Genome Annotation Website (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>), and Rice Annotation Project Database (RAP-DB, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp>). Rice *OsFPN1* and *OsMARL1* cDNA cloned sequences were obtained from the Rice Pipeline bank (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/PIPE>). Sequence alignment analysis was performed using the BioEdit version 7.0.0 software. Protein multiple alignments

were obtained with ClustalW [20]. In order to determine exon-intron organization, genomic and coding sequences (predicted, cDNA when available) were aligned. The prediction of protein localization and detection of N-terminal sorting signals were performed using the online Psort Prediction software (<http://psort.hgc.jp/>).

### **Plant growth**

Rice (*Oryza sativa* L.) plants of the Nipponbare cultivar were grown in soil under flooded conditions in an experimental unit of the *Instituto Rio Grandense do Arroz* (IRGA), in Cachoeirinha, RS, Brazil (29°54' 58.61''S 51°10'02.6''W), during the rice growing season (October 2011 to March 2012). Tissues were collected during R3 (panicle exertion), R4 (anthesis), R5 (grain filling) and R7 (grain dry down) stages [21], and immediately frozen in liquid nitrogen. For each organ type (flag leaves, non-flag leaves, panicles and stem), three biological samples derived from three different plants were used in gene expression analyses.

In laboratory experiments, rice seeds from the Nipponbare cultivar were germinated in sterile vermiculite soaked with distilled water and incubated at 28°C. After 7 days, plants were transferred to holders positioned over plastic pots covered with aluminum foil (4 seedlings per pot) with 0.75 liter of nutrient solution (700 µM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 µM KCl, 100 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 500 µM MgSO<sub>4</sub>, 10 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 µM MnSO<sub>4</sub>, 0.5 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.01 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, and 100 µM Fe<sup>+3</sup>-EDTA, pH 5.4) during 14 additional days. Solutions were replaced every 3 days. Plants were cultivated in a growth room at 28 ± 1°C under white light with a photoperiod of 16/8 h light/dark. Fe-deficiency treatment was initiated three weeks after germination by omitting Fe(III)-EDTA from the growth medium. Fe, Ni and Co-excess treatments were initiated three weeks after germination by adding 1.25 mM Fe(III)-EDTA, 100 µM CoCl<sub>2</sub> or 100 µM NiCl<sub>2</sub> respectively to the growth medium. Plants were harvested after 1, 3 and 6 days after each treatment. In all experiments, three biological samples composed of at least three plants each were used for gene expression analyses.

### **RNA extraction and cDNA synthesis**

Rice organs were harvested and total RNA was extracted using Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) and treated with DNase I (Invitrogen). First-strand cDNA synthesis was

performed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) using 1 µg of RNA according to the manufacturer instructions.

### **Quantitative RT-PCR and data analysis**

Quantitative RT-PCR analysis (RT-qPCR) was carried out in an Applied Biosystems StepOne real-time cycler. All primers (Table 1) were designed to amplify 100–150 bp of the genes and to have similar  $T_m$  values ( $60 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 min at  $95^\circ\text{C}$ , followed by 40 cycles of 10 s at  $95^\circ\text{C}$ , 15 s at  $60^\circ\text{C}$ , 10 s at  $72^\circ\text{C}$ ; samples were held for 2 min at  $60^\circ\text{C}$  for annealing of the amplified products and then heated from 60 to  $99^\circ\text{C}$  with a ramp of  $0.3^\circ\text{C}/\text{s}$  to provide the denaturing curve of the amplified products. RT-qPCRs were carried out in 20 µl final volumes composed of 10 µl of each cDNA sample diluted 50 times, 2 µl of 10X PCR buffer, 1.2 µl of 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 µl of 5 mM dNTPs, 0.4 µl of 10 µM primer pairs, 4.25 µl of water, 2.0 µl of SYBR green (1:10,000, Molecular Probes), and 0.05 µl of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl, Invitrogen). Obtained data were analyzed using the comparative  $C_t$  (threshold cycle) method [22]. The PCR efficiency from the exponential phase (E) was calculated for each individual amplification plot using the LinRegPCR software [23]. In each plate, the average amplification efficiency for each amplicon was determined and used in further calculations.  $C_t$  values for all genes were normalized to the  $C_t$  value of *OsUBQ5* [24]. The equation  $Q_0 \text{ target gene}/Q_0 \text{ UBQ5} = [(\text{Eff}_{\text{UBQ5}})^{C_t \text{ UBQ5}}/(\text{Eff}_{\text{target gene}})^{C_t \text{ target gene}}]$ , where  $Q_0$  corresponds to the initial amount of transcripts, was used for normalization [22]. Each data point corresponded to three true biological replicate samples.

**Table 1** Gene-specific PCR primers used in RT-qPCR

Gene	Forward primer 5' – 3'	Reverse primer 5' – 3'
<i>OsUBQ5</i>	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA
<i>OsFPN1</i>	ATGTGTACCGGGTGAGGAAG	ACGGGATGCCATATCAAG
<i>OsMARL1a</i>	ATGTTTGATCCCCATTTCCA	AGACGCTGTGACATTTTGAT
<i>OsMARL1b</i>	GATGAGCAGAGGGAAGTGT	GATACTAGAGTTCAGAGTAT
<i>OsMARL2</i>	TGTTTCAGCTCTCCTCGGGTA	CTCATCCAGCAACGCGAAAG
<i>OsYSL2</i>	GAGGGACAACGGTGTTCATTGCTGGT	TGCAGAAAAGCCCTCGACGCCAAGA
<i>OsFER</i>	TCACTCTTCACCCGCCGCG	TCGACGAACTTTTGCCTAGC

### Statistical analyses

When appropriate, data were subjected to analyses of variance (ANOVA) and mean values were compared by the Tukey Honestly Significant Differences (HSD) or Student's *t* test ( $p \leq 0.05$ ) using the SPSS Base 17.0 for Windows (SPSS Inc., USA). The Levene's test (for homogeneity of variance) was used prior to ANOVA. All analyses resulted in confirmation of homogeneity.

## Results and Discussion

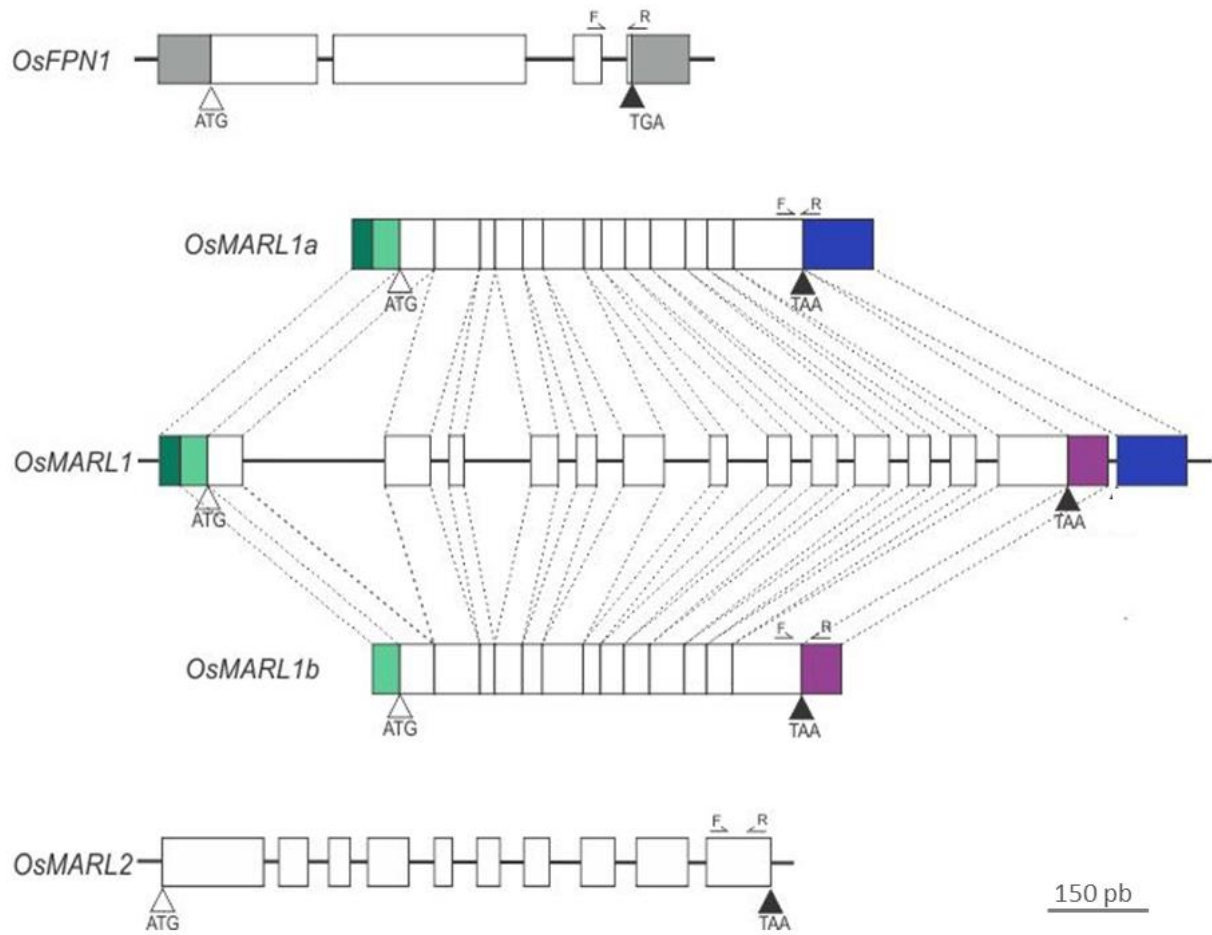
### Identification and structure of rice Ferroportins

Our searches for rice genes that might be homologous to *Arabidopsis* ferroportins resulted in three sequences: *OsFPN1* (Os06g36450) with homology to both *AtFPN1* (At2g38460) and *AtFPN2* (At5g03570), and *OsMARL1* (Os12g37530) and *OsMARL2* (Os05g04120) with homology to *AtMARI* (At5g26820). Not a single transcript with homology to the *OsMARL2* gene was found in the RAP-DB.

The *OsFPN1* (J033070C07) gene is located on rice chromosome VI and is composed of four exons with a coding sequence of 1,455 bp (**Fig. 1**). The deduced OsFPN1 protein has the highest prediction to be a vacuolar membrane transporter (Wolf Psort), like AtFPN2 [16, 17]. OsFPN1 shares 51% and 53% sequence similarity with the AtFPN1 and AtFPN2 proteins, respectively, and presents two conserved regions, indicated in **Figure 2** by two boxes, in red and blue. Based on the information above, we suggest that *OsFPN1* could be an ortholog of *AtFPN2*. The *OsMARL1* gene is located on rice chromosome XII and is composed of 13 exons with a

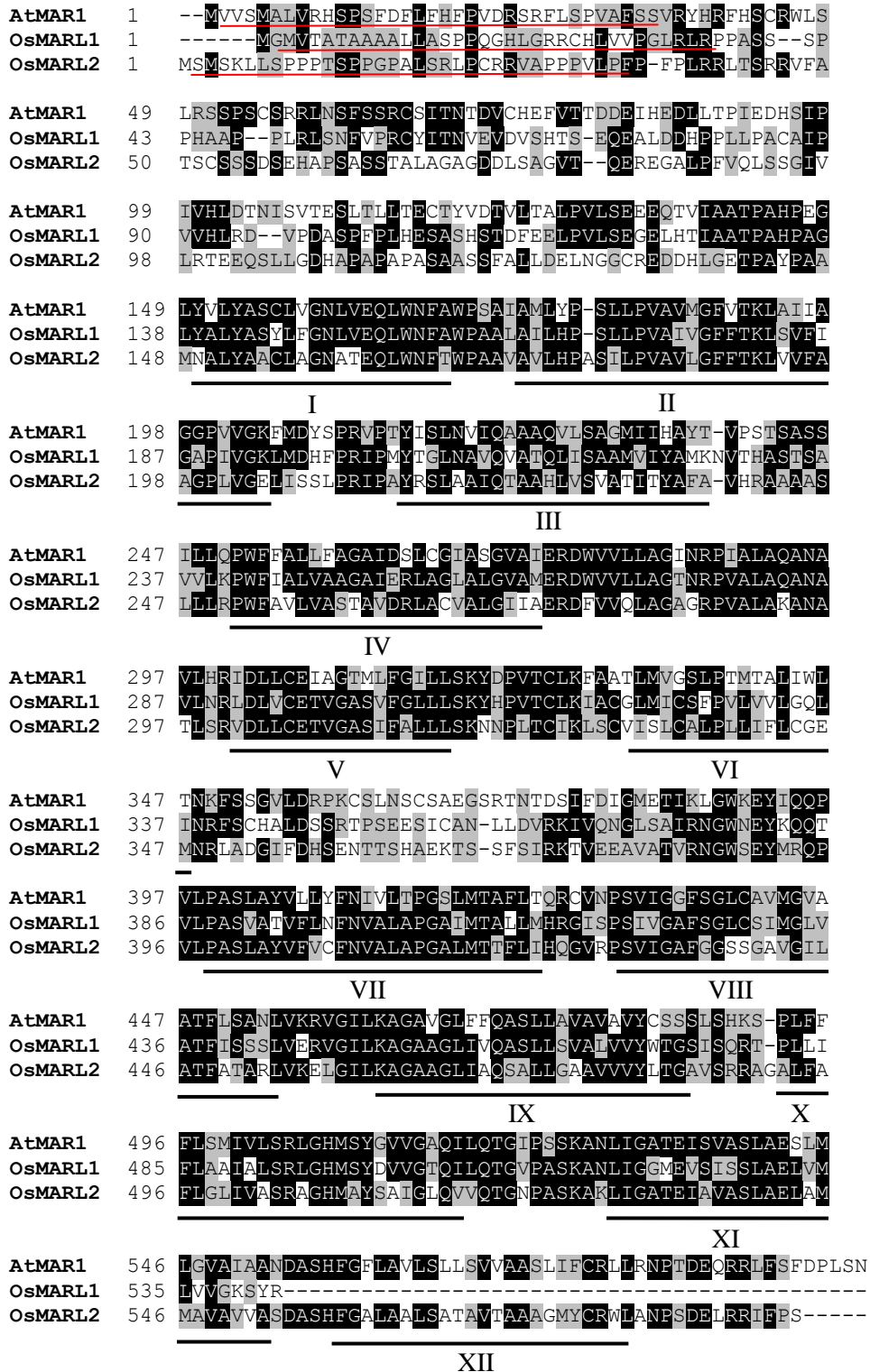


coding sequence of 1,776 bp (**Fig. 1**). According to cDNA sequences available at RAP-DB, the *OsMARL1* gene can be transcribed in two alternative ways: *OsMARL1a* (J013000F11) and *OsMARL1b* (J013042H16), as shown in **Figure 1**. However, translation of both transcripts is predicted to give rise to the same protein, since the differences are located at the non-coding regions. Primers to both transcript forms were designed and used in RT-qPCR analysis. The *OsMARL2* (Os05g04120) gene is located on rice chromosome V and is composed of ten exons with a coding sequence of 1,782 bp (**Fig. 1**). An evaluation of the gene structure of *OsMARL2* in **Figure 1** indicates that this gene may be a shorter version of *OsMARL1*, with the fusion of some exons. New genes born after duplication can undergo pseudogenization, neofunctionalization or subfunctionalization [25, 26]. One of these processes may have been important for the evolution of the *OsMARL2* gene. Both *OsMARL1* and *OsMARL2* deduced proteins have transit peptides (**Fig. 3**) and were predicted to be chloroplast- and mitochondrial-localized (iPsort), respectively. *OsMARL1* and *OsMARL2* share 48% and 41% sequence similarity with the *AtMAR1* protein (**Fig. 3**). As mentioned earlier, *AtMAR1* was shown to be localized in the chloroplast [18]. This information makes *OsMARL1* the best candidate to be an ortholog of *AtMAR1*.



**Figure 1.** Analysis of putative rice ferroportin genes. Exons are depicted as solid white boxes. The untranslated regions are depicted with different colors upstream and downstream of the start (ATG) and stop (TGA or TAA) codons, respectively. The ‘F’ and ‘R’ represent the annealing regions for the primers F (forward) and R (reverse). The *OsMARL1* gene is being shown in its two possible splicing patterns: *OsMARL1a* and *OsMARL1b*, with differences at the untranslated regions.

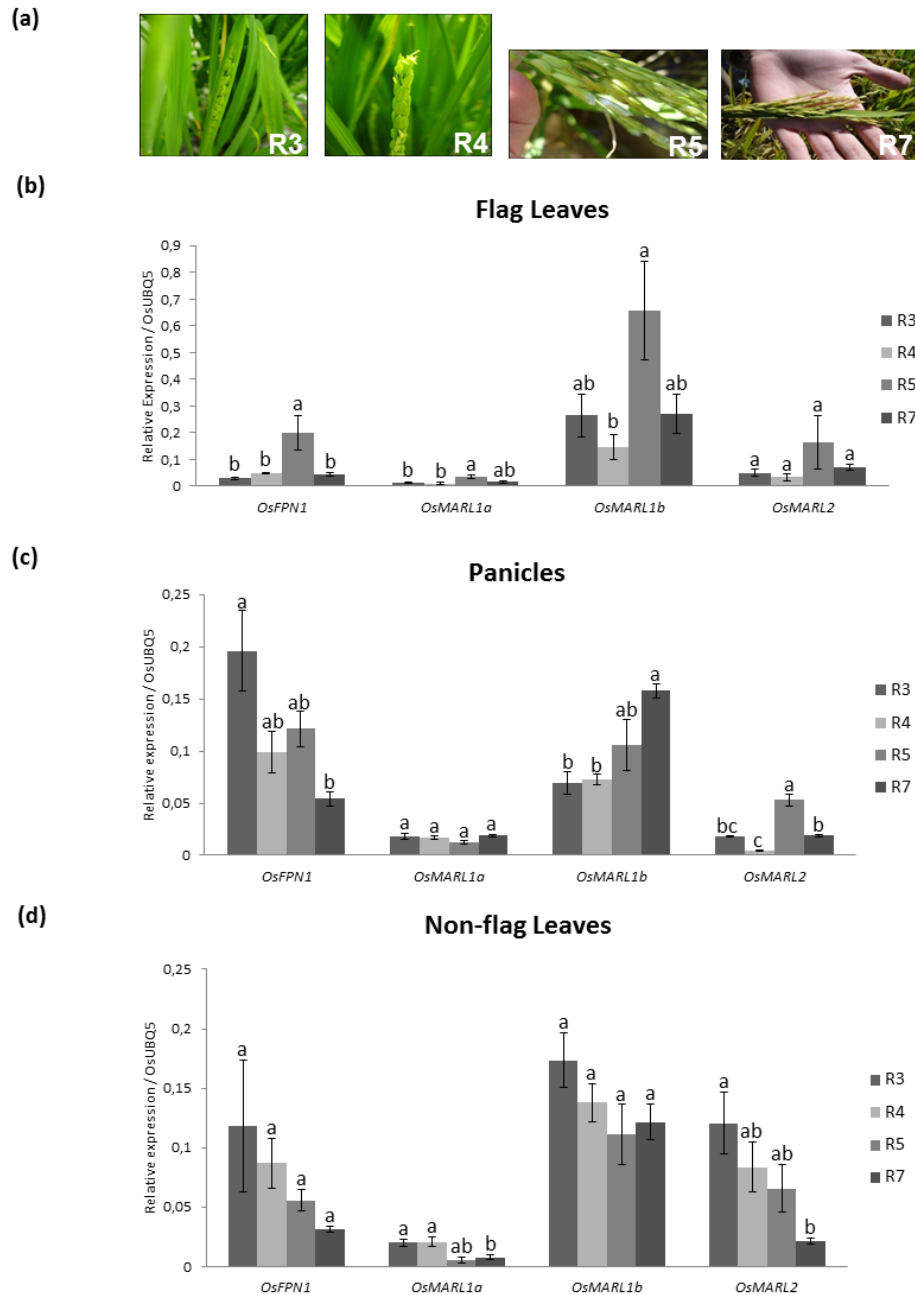




**Figure 3.** Multiple amino acid alignment of *Arabidopsis* and Rice FPN deduced proteins. Identical amino acid residues are shown in black background. Amino acid residues that are similar are shown in gray background. Alignment was performed using CLUSTALW. No conserved regions were found. The initial underlined sequences represent the transit peptides. Transmembrane domains predicted by Phobius are underlined and numbered (I – XII).

## Expression of rice ferroportin genes in different plant organs during reproductive development

A recent work demonstrated that mineral remobilization from vegetative organs, such as flag leaves and stems/ sheaths, can occur in rice plants. However, vegetative remobilization is not absolutely required for seeds to acquire minerals [27]. To investigate the possibility of involvement in mineral transport during reproductive development, the expression patterns of putative rice ferroportin genes were evaluated during four stages of reproductive development in rice plants. Differences in expression patterns were found in different plant organs (Fig. 4). Of all transcripts evaluated, the highest expression levels during reproductive development were reached by *OsMARL1b* in flag leaves. *OsFPN1* showed the highest expression in flag leaves at the R5 stage, in panicles at the R3 stage, and no significant change in expression levels in non-flag leaves. Transcript levels of *OsMARL1a* were lower than in *OsMARL1b* in all organs. *OsMARL1a* showed the highest expression in flag leaves at the R5 stage, in non-flag leaves at the R3 and R4 stages, and no significant change in expression levels in panicles. *OsMARL1b* showed the highest expression in flag leaves at the R5 stage, in panicles at the R7 stage, and constant expression levels in non-flag leaves. *OsMARL2* exhibited the highest expression in panicles at the R5 stage, in non-flag leaves at the R3 stage, and no significant change in expression levels in flag leaves (Fig. 4). The expression pattern of ferroportin genes varied among the stages, mostly in flag leaves and panicles. This could mean that rice ferroportins may somehow participate in the mineral remobilization from flag leaves to panicles, or that they play a role in mineral sequestration during translocation of minerals from the roots during reproductive development. In rice plants grown under sufficient amounts of Zn, most of the Zn accumulated in the grain originates from uptake by roots after flowering [28]. However, it is also accepted that minerals may be remobilized from vegetative sources [29, 30]. Sperotto et al. (2010) found nine rice genes which have expression levels in flag leaves during the reproductive development correlated with final Fe and/ or Zn concentrations in the grain of eight rice cultivars. From those, six are metal transporters, possibly involved with mineral remobilization [31]. Future research efforts to determine the localization of ferroportins in different organs and tissues, as well as a comparative analysis with rice plants bearing mutations in ferroportin genes, will help to understand the role of these proteins during the reproductive development of rice plants, providing useful information to be considered for designing strategies for rice biofortification.



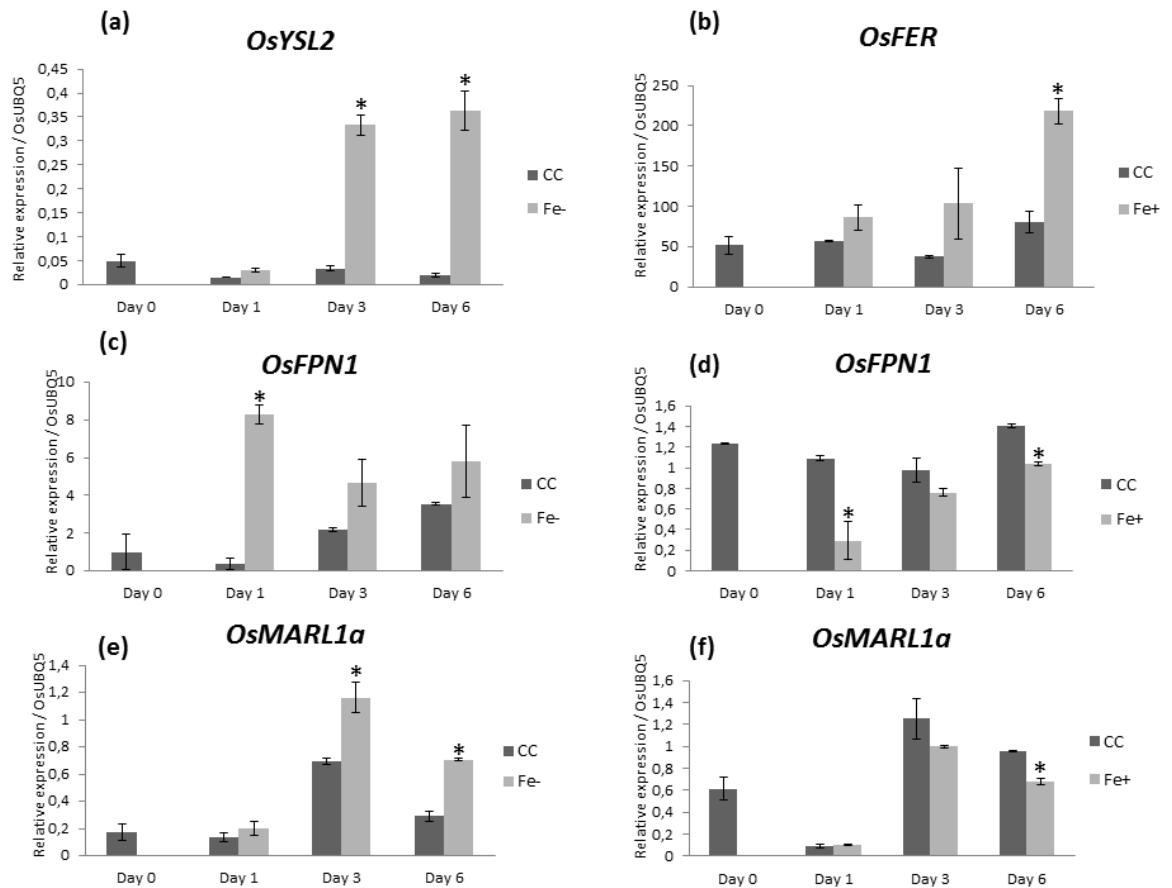
**Figure 4.** Relative expression levels of putative rice ferroportin genes during plant reproductive development assessed by RT-qPCR. Samples from all organs (flag leaves, panicles and non-flag leaves) were collected at R3 (panicle exertion), R4 (anthesis), R5 (grain filling) and R7 (grain dry down) stages of development (a). Gene expression levels relative to a rice ubiquitin (*OsUBQ5*) gene are shown for flag leaves (b), panicles (c) and non-flag leaves (d). Values are the averages of three samples  $\pm$  SE. Different letters indicate that the mean values are different by the Tukey HSD test ( $p \leq 0.05$ ).

## Transcript levels of putative rice ferroportin genes are regulated by Fe and Ni

AtFPN2 is a member of the ferroportin protein family in *Arabidopsis* and is known to be a Ni, Co and Fe transporter [16, 17]. Based on this information, we decided to evaluate the expression pattern of the putative rice ferroportin genes (*OsFPN1*, *OsMARL1a*, *OsMARL1b* and *OsMARL2*) in the Nipponbare rice cultivar under Fe-deficiency and after Fe-, Ni- and Co-excess treatments under laboratorial conditions. In this experiment, expression of *OsYSL2* and *OsFER* genes was evaluated to confirm the efficiency of Fe-deficiency (Fig. 5a) and Fe-excess (Fig. 5b) treatments, respectively. *OsYSL2* is expressed in the phloem, up-regulated in shoots of Fe deficient plants, and transports Fe(II)-NA [32]. Expression of *OsFER* genes are known to be induced by Fe excess in rice shoots [33].

*OsFPN1* showed the highest transcript levels in the first day of Fe-deficiency treatment in shoots (Fig. 5c). This up-regulation resulted in transcript levels higher than the ones observed for all the other ferroportin genes tested, under all treatments. Lower transcript levels were observed after 1 and 6 days after Fe-excess treatment than in the control condition (CC) (Fig. 5d). *OsMARL1a* showed the highest transcript levels after 3 and 6 days of Fe-deficiency treatment in shoots (Fig. 5e), and lower transcript levels than under the control condition (CC) after 6 days of Fe-excess treatment (Fig. 5f). Therefore, it seems that transcription levels of *OsFPN1* and *OsMARL1a* are up-regulated by Fe-deficiency and down-regulated by Fe-excess in shoots. It has been reported that *AtMARI* transcript levels are also regulated by Fe limitation [18]. However, this regulation was seen in the opposite direction: Conte et al. (2009) showed that *AtMARI* is expressed in all tissues of young *Arabidopsis* seedlings, and its expression is decreased under Fe limitation (300  $\mu$ M Ferrozine). Considering that *AtMARI* over-expression leads to chlorosis, which can be rescued by excess iron, and that expression of *AtMARI* is down-regulated under limiting iron conditions, the authors suggested that MARI may play a role in iron chelation, storage, or sequestration. The expression pattern of another *Arabidopsis* transporter, *OsVIT1*, is similar to what we found for *OsFPN1* and *OsMARL1a*. *OsVIT1* expression was quickly induced after 7 days under Fe starvation treatment in rice seedling roots, although no significant induction was observed in Fe-excess [34]. The authors suggested that OsVIT1 may be necessary for a housekeeping mechanism of Fe accumulation in vacuoles. Experimental data about the subcellular localization of rice ferroportin proteins is necessary to compare to known transporters and to suggest possible roles in Fe homeostasis.

No differences in transcript levels of *OsFPN1*, *OsMARL1a* and *OsMARL1b* were detected in roots. Levels of the *OsMARL1b* transcripts did not change also in shoots (data not shown).

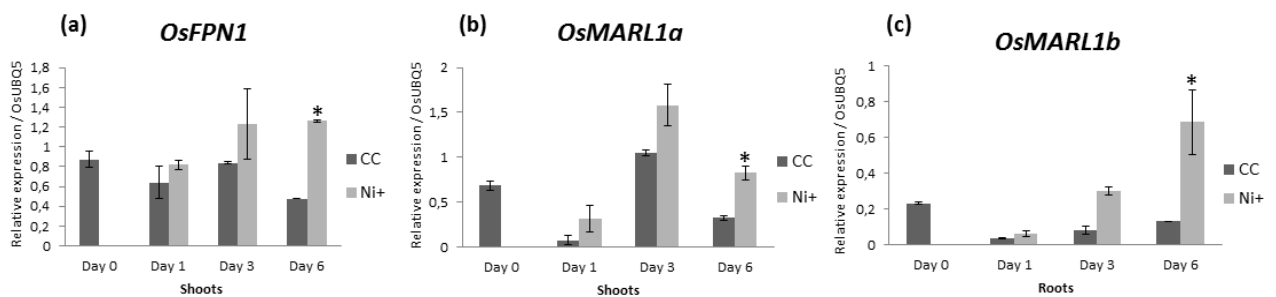


**Figure 5.** Expression of putative rice ferroportin genes in response to Fe-deficiency and Fe-excess in shoots. Relative expression levels of *OsYSL2* (a), *OsFER* (b), *OsFPN1* (c, d), *OsMARL1a* (e, f) and in detached shoots of the Nipponbare rice cultivar maintained under Fe-deficiency (a, c, e) or Fe-excess (b, d, f) were assessed by RT-qPCR. Organ samples were collected 1, 3 and 6 days after treatments. The dark grey bars represent plants under control condition (CC), and the light grey bars represent plants under Fe-deficiency (Fe-) or Fe-excess (Fe+) treatment. Values are the averages of three samples  $\pm$  SE. Mean values with one asterisk are different by *t* test ( $p \leq 0.05$ ) from the respective controls.

The Ni-excess treatment influenced expression of *OsFPN1* and *OsMARL1a* in shoots and of *OsMARL1b* in roots (Fig. 6). *OsFPN1* and *OsMARL1a* transcript levels were higher in shoots than control condition after 6 days under treatment (Fig. 6a, b), and *OsMARL1b* in roots after 6 days under treatment (Fig. 6c). The highest transcript levels of *OsFPN1* and *OsMARL1a*, induced



by Ni excess, resembles the plants response to Fe deficiency. Ni is required in vegetative tissues of plants only in trace amounts of between 4-90 ng g<sup>-1</sup> dry biomass in barley [35, 36]. Ni toxicity can be observed above concentrations between 10 and 50 µg g<sup>-1</sup> dry biomass. In this work, 100 µM NiCl<sub>2</sub> was used to promote de Ni-excess treatment. This amount of Ni, like other divalent metals in excess, can compete with Fe for transport by the OsIRT1 protein [37], simulating Fe-deficiency. Schaaf et al. (2006) previously reported that AtFPN2 transported Ni into the vacuole and postulated that AtFPN2 expression was upregulated during Fe-deficiency to sequester the Ni that enters the root through IRT1 [16]. The same was proposed about the MTP1 vacuolar protein from *Thlaspi goesingense*, which mediates cellular Ni(II) efflux, but is also able to transport Zn(II) [38, 39]. No transporters specifically mediating Ni uptake or translocation have been identified. Moreover, no metal transporter that is also capable of Ni transport has been shown to be transcriptionally regulated by Ni levels.



**Figure 6.** Expression of putative rice ferroportin genes in response to Ni-excess in rice shoots and roots. Relative expression levels of *OsFPN1* (a) and *OsMARL1a* (b) in shoots and *OsMARL1b* (c) in roots of rice plants from the Nipponbare cultivar maintained under Ni-excess. Organ samples were collected 1, 3 and 6 days after treatment. Values are the averages of three samples  $\pm$  SE. Mean values with one asterisk are different by t test ( $p \leq 0.05$ ) from the respective controls.

No differences in transcript levels of *OsFPN1*, *OsMARL1a* and *OsMARL1b* were detected in shoots and roots under Co-excess treatment (data not shown). No changes in expression were expected for the rice ferroportins under Ni and Co treatments. Considering the *Arabidopsis* ferroportins, only AtFPN2 has its expression regulated by Fe-deficiency in roots [10, 11]. However, AtFPN1 and AtFPN2 are transporters of Fe, Ni and Co. Although a clear regulation of expression isn't observed in rice ferroportins under Ni and Co treatments, we can not rule out the possibility that these proteins can transport Ni and Co.

No differences were detected in shoots in transcript levels of *OsMARL2*, and no transcript were detected in roots, in all laboratory experiments. Considering the structure of this gene and its expression pattern, it is possible to suggest that *OsMARL2* resulted from a duplication of *OsMARL1*. *OsMARL2* could be the result of a neofunctionalization, where one copy maintains the ancestral function and the other can explore new evolutionary terrain; a pseudogenization, where one copy accumulates mutations and lose function while the other maintains the ancestral function; or subfunctionalization, in which deleterious mutations make one copy to be partially functional, but complementary to the ancestral copy gene [40, 41]. It is common that duplicated genes show different patterns of expression. When analyzing the gene pair *OsZIFL4* and *OsZIFL9*, it was observed that *OsZIFL4* is almost specifically expressed in roots during reproductive development, showing only little expression in panicles during the R7 stage, and was up-regulated in roots of Fe-deficiency treated plants; while *OsZIFL9* was detected only at low levels in panicles during R5 and at higher levels during R7, but not under Fe-deficiency treatment [26]. *OsMARL2* expression was detected by RT-qPCR experiments during the reproductive development of field grown plants, but not in young stages in laboratory experiments, suggesting a case of duplication. However, additional investigation is necessary to confirm this hypothesis.

## Conclusions and Perspectives

Rice plants seem to have three putative Ferroportin genes, here named *OsFPN1*, *OsMARL1* and *OsMARL2*. Two distinct transcripts can be produced from the *OsMARL1* gene, which we designated as *OsMARL1a* and *OsMARL1b*.

*OsFPN1* protein shares the highest similarity with the *Arabidopsis* *AtFPN2* (53%), has its expression induced by Fe-deficiency (although in shoots, not in roots as *AtFPN2*), and is predicted to be a vacuolar transporter, similarly to *AtFPN2*. We suggest that *OsFPN1* is the corresponding ortholog to *AtFPN2* in rice.

The *OsMARL1* protein shares 48% of similarity with the *Arabidopsis* *AtMAR1*, and is predicted to be a chloroplast transporter as well as *AtMAR1*. Transcription levels of *OsMARL1* and *AtMAR1* are responsive to Fe levels, although in opposite ways [18]. It is possible that *OsMARL1* is a rice ortholog to *AtMAR1*, but this hypothesis needs further investigation.

*OsMARL2* seems to be the result of a duplication event of *OsMARL1*, and its expression was detected only during reproductive development. Further work is needed to understand its evolution and possible roles.

Both *OsFPN1* and *OsMARL1a* transcripts may play important roles in Fe homeostasis in shoots, since their expression is up-regulated by Fe deficiency and down-regulated by Fe excess. Levels of these two transcripts are also up-regulated by Ni excess in shoots, suggesting a possible role in detoxification. Expression of *OsMARL1b* in roots is increased under Ni excess, what could be related to an indirect effect of Ni excess, resulting in Fe deficiency. To clarify all these possibilities, the four proteins should be expressed in yeast strains defective in transport of different metals, to test their capacity to complement those defects. Strains with mutations in genes that encode plasma membrane and vacuolar transporters must be tested. The transport capacity and the affinity of each one of the rice ferroportins for different metals still needs to be determined.

Additional experiments are also needed to show the localization of the proteins encoded by the putative rice ferroportins, both in specific organs, tissues or cell types (possibly in fusion with GUS) and in specific cellular compartments (in fusion with GFP). The complementation of *Arabidopsis* ferroportin mutants with rice homologs (see chapter 2) could also be performed as a good way to elucidate the functions of these genes. Additional investigations about the regulation of the two transcript forms of the *OsMARL1* gene still needs to be done. *Osmarl1* mutant plants were recently made available by the Rice Genome Resource Center (RGRC, <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/>), and our group is presently growing mutant plants to produce seeds.

Functional characterization of ferroportin rice genes will provide useful information to be considered for designing of successful strategies for rice biofortification with essential minerals.

## **Acknowledgements**

This research was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation – research grant to JPF and scholarships to FKR and PKM), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de*

*Nível Superior* (CAPES, Brazilian Ministry of Education – scholarship to KLL) and *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS, State Government of Rio Grande do Sul – scholarship to AV). The authors thank *Instituto Rio-Grandense do Arroz* (IRGA) for technical support.

## References

- [1] H. Marschner, Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd Edition, Acad. Press., Boston (1995) 674 p.
- [2] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Biologically relevant metal iondependent hydroxyl radical generation, *FEBS Letters* 307 (1992) 108-112.
- [3] E.L. Walker, E.L. Connolly, Time to pump iron: iron-deficiency signaling mechanisms of higher plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (2008) 530-535.
- [4] R.F.H. Giehl, A.R. Meda, N. von Wiren, Moving up, down, and everywhere: signaling of micronutrients in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (2009) 320-327.
- [5] R.A. Sperotto, F.K. Ricachenevsky, V.A. Waldow, J.P. Fett, Iron biofortification in rice: It's a long way to the top, *Plant Sci.* 190 (2012) 24- 39.
- [6] D. Eide, M. Broderius, J.P. Fett, M.L. Guerinot, A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5624-5628.
- [7] H. Inoue, T. Kobayashi, T. Nozoye, M. Takahashi, Y. Kakei, K. Suzuki, M. Nakazono, H. Nakanishi, S. Mori, N.K. Nishizawa, 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 (2009) 3470-3479.
- [8] E.E. Rogers, D.J. Eide, M.L. Guerinot, Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 12356-12360.
- [9] UNICEF (2010) [www.unicef.org/nutrition/index\\_iodine.html](http://www.unicef.org/nutrition/index_iodine.html) (access in June 2013).
- [10] F. Goto, T. Yoshihara, N. Shigemoto, S. Toki, F. Takaiwa, Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene, *Nat Biotechnol.* 17 (1999) 282–286.

- [11] M. Vasconcelos, K. Datta, N. Oliva, M. Khalekuzzaman, L. Torrizo, S. Krishnan, M. Oliveira, F. Goto, S.K. Datta, Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene, *Plant Sci.* 164 (2003) 371–378.
- [12] S. Lee, U.S. Jeon, S.J. Lee, Y.K. Kim, D.P. Persson, S. Husted, J.K. Schjorring, Y. Kakei, H. Masuda, N.K. Nishizawa, G. An, Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (2009) 22014–9.
- [13] S. Lee, J.C. Chiecko, S.A. Kim, E.L. Walker, Y. Lee, M.L. Guerinot, G. An, Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol.* 150 (2009) 786–800.
- [14] Y. Ishimaru, H. Masuda, K. Bashir, H. Inoue, T. Tsukamoto, M. Takahashi, H. Nakanishi, N. Aoki, T. Hirose, R. Ohsugi, N.K. Nishizawa, Rice metal–nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for long distance transport of iron and manganese, *Plant J.* 62 (2010) 379–390.
- [15] E.P. Colangelo, M.L. Guerinot, The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response, *Plant Cell* 16 (2004) 3400-3412.
- [16] G. Schaaf, A. Honsbein, A.R. Meda, s. Krichner, D. Wipf, N. von Wiren, *AtIREG2* encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots, *J. Biol. Chem.* 35 (2006) 25532-25540.
- [17] J. Morrissey, I.R. Baxter, J. Lee, L. Li, B. Lahner, N. Grotz, J. Kaplan, D.E. Salt, M.L. Guerinot, The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21 (2009) 3326-3338.
- [18] S. Conte, D. Stevenson, I. Furner, A. Lloyd, Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein, *Plant Physiol.* 151 (2009) 559-573.
- [19] K. Bashir, R. Takahashi, H. Nakanishi, N.K. Nishizawa, The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) Article 15.
- [20] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947-2948.
- [21] P.A. Counce, T.C. Keisling, A.J. Mitchell, A uniform, objective and adaptative system for expressing rice development, *Crop Sci.* 40 (2000) 436-443
- [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, *Methods* 25 (2001) 402-408.

- [23] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H. Deprez, A.F. Moorman, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neurosci. Lett.* 339 (2003) 62-66.
- [24] M. Jain, A. Nijhawan, A.K. Tyagi, J.P. Khurana, Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 646-651.
- [25] S. Ohno, *Evolution by gene duplication*, New York, Springer (1970).
- [26] F.K. Ricachenevsky, R.A. Sperotto, P.K. Menguer, E.R. Sperb, K.L. Lopes, J.P. Fett, Zinc-induced facilitator-like family in plants: lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs, *BMC Plant Biol.* 11 (2011) 20.
- [27] R.A. Sperotto, M.W. Vasconcelos, M.A. Grusak, J.P. Fett, Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.), *Rice* 5 (2012) 27.
- [28] W. Jiang, P.C. Struik, J. Lingna, H. van Keulen, Z. Ming, T.J. Stomph, Uptake and distribution of root-applied or foliar-applied <sup>65</sup>Zn after flowering in aerobic rice, *Ann. Appl. Biol.* 150 (2007) 383–391.
- [29] P.J. Hocking, J.S. Pate, Mobilization of minerals to developing seeds of legumes, *Ann. Bot.* 41 (1977) 1259–1278.
- [30] E. Himmelblau, R.M. Amasino, Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence, *J. Plant Physiol.* 158 (2001) 1317–1323.
- [31] R.A. Sperotto, T. Boff, G.L. Duarte, L.S. Santos, M.A. Grusak, J.P. Fett, Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains, *J. Plant Physiol.* 167 (2010) 1500–1506.
- [32] S. Koike, H. Inoue, D. Mizuno, M. Takahashi, H. Nakanishi, S. Mori, N.K. Nishizawa, OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem, *Plant J.* 39 (2004) 415-424.
- [33] R.J. Stein, F.K. Ricachenevsky, J.P. Fett, Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2), *Plant Sci.* 177 (2009) 563–569.
- [34] Y. Zhang, Y.H. Xu, H.Y. Yi, J.M. Gong, Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice, *Plant J.* 72 (2012) 400–410.

- [35] A.D. Dalton, S.A. Russell, H.J. Evans, Nickel as a micronutrient element for plants, *Biofactors* 1 (1988) 11-16.
- [36] P.H. Brown, R.M. Welch, E.E. Cary, Nickel: a micronutrient essential for all higher plants. *Plant Physiol.* 85 (1987) 801-803.
- [37] S. Lee, G. An, Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice, *Plant Cell Environ.* 32 (2009) 408-416.
- [38] M.W. Persans, K. Nieman, D.E. Salt, Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 9995-10000.
- [39] D. Kim, J.L. Gustin, B. Lahner, M.W. Persans, D. Baek, D.J. Yun, D.E. Salt, The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* 39 (2004) 237-251.
- [40] L.E. Flagel, J.F. Wendel, Gene duplication and evolutionary novelty in plants, *New Phytol.* 183 (2009) 557-564.
- [41] R.C. Moore, M.D. Purugganan, The evolutionary dynamics of plant duplicate genes, *Curr Opin Plant Biol.* 8 (2005) 122-128.

## CAPÍTULO 2

### **Caracterização Funcional e Localização Subcelular das Ferroportinas de Arroz (*Oryza sativa* L.)**

#### **Introdução**

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 (UNICEF, 2010). Porém, o grão de arroz é pobre em nutrientes minerais, como o ferro (Fe) e zinco (Zn), cuja deficiência afeta milhões de pessoas. Várias estratégias têm sido propostas para lidar com a deficiência de micronutrientes, incluindo suplementação, fortificação de alimentos processados, aplicação de fertilizantes e a implementação de programas de cruzamentos e de engenharia genética com a finalidade de gerar grãos ricos em nutrientes minerais (Bashir et al., 2010; Cakmak et al., 2010; Gómez-Galera et al., 2010; Masuda et al., 2012; Yuan et al., 2012). Abordagens para corrigir esse problema devem visar as possíveis etapas limitantes no transporte desses metais do solo até o grão: (1) absorção dos metais a partir do solo, (2) carregamento e descarregamento no xilema, (3) carregamento e descarregamento no floema, e (4) translocação para o grão durante os estádios reprodutivos (White and Broadley, 2009). Diversos trabalhos têm sido realizados, em plantas de arroz, com o objetivo de caracterizar genes e mecanismos responsáveis pelos processos de absorção de minerais pelas raízes, transporte entre os diferentes órgãos, distribuição intracelular e armazenamento, alocação para o grão e distribuição entre os diferentes tecidos dentro do grão. O estudo das ferroportinas em arroz pode constituir um passo importante na compreensão dos mecanismos de transporte e sequestro de metais, que em última análise pode auxiliar os esforços para melhorar a qualidade nutricional do grão de arroz, através do uso de técnicas de biofortificação. São essenciais estudos para análise estrutural dos genes, comparados com membros da mesma família em outras espécies já descritas (ver capítulo 1); para análise da expressão gênica, identificando os tratamentos que alteram a sua expressão (ver capítulo 1); assim como estudos visando à análise funcional e de localização das proteínas. Este capítulo apresenta alguns dados obtidos na caracterização funcional dos genes *OsFPNI* e



*OsMARL1*, que codificam ferroportinas de arroz. Foram realizados experimentos de expressão heteróloga das ferroportinas de arroz em linhagens de levedura contendo mutações em genes que codificam diferentes transportadores de metais, a localização subcelular das proteínas OsFPN1 e OsMARL1 em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, a transformação de mutantes perda-de-função *fpn1*, *fpn2* e *fpn1fpn2* de *Arabidopsis* com as ferroportinas de arroz, e a análise de uma linhagem de arroz contendo mutação no gene *OsMARL1*.

## Material e Métodos

### Crescimento de plantas de arroz para extração de RNA foliar e amplificação de *OsMARL1*

Plantas de arroz da cultivar Nipponbare foram crescidas em laboratório em solução nutritiva contendo 100 µM de KCl, 100 µM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 700 µM de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 500 µM de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µM de MnSO<sub>4</sub>, 0,01 µM de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>27</sub>O<sub>24</sub>, 10 µM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5 µM de ZnSO<sub>4</sub>, 0,2 µM de CuSO<sub>4</sub> e 100 µM de Fe (III)- EDTA por 15 dias. A solução nutritiva controle teve o pH ajustado para 5,4 e foi trocada a cada 3 dias. Após 15 dias, amostras de folhas foram coletadas para extração de RNA total utilizando o reagente *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen). A seguir as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen) e a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) foi utilizada para a síntese da primeira fita a partir de 1 µg de RNA total.

### Amplificação de *OsFPN1* e *OsMARL1* para clonagem em pENTR/D-TOPO

A sequência codificante de *OsMARL1* foi amplificado a partir do pool de cDNA de folhas de plantas crescidas em condição controle, obtido a partir de extração de RNA total. A sequência codificante completa (*full-length*) foi amplificada com a enzima Pfx50 Taq DNA polymerase (Invitrogen) utilizando o *forward primer* 5'-CACCATGGGGATGGTCACCG e o *reverse primer* 5'- TTACATTGGTTCAACTTGGAAATGGGG. O *reverse primer* 5'- CATTGGTTCAACTTGGAAATGGGG foi utilizado para a amplificação da sequência codificante de *OsMARL1* sem o códon de terminação (TAA). Este fragmento foi designado *OsMARL1 non-stop*. A sequência codificante de *OsFPN1* foi amplificada a partir de vetor contendo o cDNA do gene de arroz (número de acesso J033070C07), adquirido do banco Rice

Pipeline (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/PIPE>). A sequência codificante completa foi amplificada com a enzima Pfx50 Taq DNA polymerase (Invitrogen) utilizando o *forward primer* 5'-CACCATGGCGAGTGATGGCC e o *reverse primer* 5'-TCAAGAAGCTTTGATCCAGTTCATCTT. O *reverse primer* 5'-AGAAGCTTTGATCCAGTTCATCTTGG foi utilizado para a amplificação da sequência codificante de *OsFPNI* sem o códon de terminação (TGA). O fragmento resultante foi designado *OsFPNI non-stop*. As quatro sequências amplificadas foram clonadas no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen), utilizando a tecnologia Gateway. Vetores pENTR/D-TOPO contendo as sequências codificantes das ferroportinas de arroz foram sequenciados para confirmar a fidelidade de amplificação da sequência nucleotídica de cada gene.

### **Transformação de *OsFPNI* e *OsMARLI* em vetores de expressão em leveduras e transformação de leveduras**

Utilizando a tecnologia Gateway, *OsMARLI full-length*, e *OsFPNI* e *OsMARLI non-stop* foram transferidos do vetor de entrada para o vetor de expressão em levedura pAG426-GFP (Alberti et al., 2007) utilizando a enzima LR Clonase II (Invitrogen). A confirmação da correta transferência para o vetor de expressão foi feita pela clivagem do vetor utilizando as enzimas de restrição *BamHI* (Promega) para clivar *OsFPNI* e *EcoRV* (Invitrogen) para clivar *OsMARLI* e por PCR utilizando a enzima Taq Polimerase (Invitrogen) e os *primers* de clonagem. O Vetor pAG426-GFP vazio ou contendo *OsFPNI non-stop* foi transformado em *Saccharomyces cerevisiae: Δcot1* mutante ( $\Delta cot1::KanMX$ ) para análises de complementação do transporte vacuolar de cobalto (Co), *zrc1cot1* duplo mutante ( $zrc1::natMX cot1::kanMX4$ ) para análises de complementação de transporte vacuolar de zinco (Zn) e Co,  $\Delta ccc1$  mutante ( $\Delta ccc1::HIS3$ ) para análises de complementação de transporte vacuolar de ferro (Fe). O Vetor pAG426-GFP vazio ou contendo *OsMARLI full-length* foi transformado em *S. cerevisiae: fet3fet4* ( $fet3::LEU2 fet4::HIS3$ ), *zrt1zrt2* ( $zrt1::LEU2 zrt2::HIS3$ ) e *smf1* ( $smf1::URA3$ ) para análises de complementação de transporte de Fe, Zn e manganês (Mn) pela membrana plasmática, respectivamente, e  $\Delta mrs3\Delta mrs4$  para transporte mitocondrial de Fe. O Vetor pAG426-GFP vazio foi transformado nas linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae: DY150*, *BY4741* e *BY1457*. O mutante *zrc1cot1* foi cedido pela Dra. Ute Kramer (Ruhr University, Bochum,

Alemanha), os mutantes *Δcot1* e *Δccc1* e o tipo selvagem *DY150* foram cedidos pela Dra. Mary Lou Guerinot (Dartmouth College, NH, USA), enquanto as outras linhagens foram adquiridas do Euroscarf (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/yeast.html>). A transformação foi realizada utilizando o método LiAc/SS carrier DNA/PEG (Gietz and Schiestl, 2007). Os transformantes foram selecionados em meio sintético completo (SC) sem uracila contendo a cada litro: 5 g de sulfato de amônio, 1,7 g de base nitrogenada de levedura, 1,92 g de suplemento para meio sintético de levedura sem uracila (Sigma), 20 g de glicose e 18 g de ágar (Difco technical<sup>®</sup>), com ajuste de pH para 5.3 antes da adição do ágar (Mills et al., 2010 e 2012) e seguido de autoclavagem a 121°C por 15 minutos a 1 bar de pressão. As placas foram incubadas a 30°C por três dias para o aparecimento das colônias transformantes.

### **Ensaio de complementação em leveduras**

As linhagens de levedura contendo o vetor pAG426-GFP foram crescidas *overnight* a 30°C em meio SC líquido sem uracila (descrição acima), com agitação de 200 rpm. As culturas resultantes foram centrifugadas por 4 min a 4000 rpm e ressuspensas em meio SC líquido sem uracila, com a adição de 2% galactose, sem a presença de glicose. Foram então incubadas por 4 h a 30°C, com agitação de 200 rpm para a indução do promotor *GALI* (Mills et al., 2010 e 2012). Foram preparadas diluições em série a partir das culturas ajustadas para OD<sub>600</sub> = 0,4 (1 X), sendo as diluições de 0,1 X (1:10), 0,01 X (1:100) e 0,001 X (1:1000) em meio SC líquido sem uracila e presença de galactose a 2%. As placas teste foram preparadas utilizando meio SC sem uracila, contendo galactose 2% e ágar 1,8% (descrição acima), além da adição de diferentes concentrações de metais ou quelantes de metais dependendo da linhagem testada: ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), EGTA (ácido etileno glicol bis-tetra acético) ou BPDS (ácido bato-fenantrolina disulfônico). Placas inoculadas com as diferentes linhagens de leveduras transformadas foram incubadas a 30°C por 3 a 4 dias para avaliação dos resultados.

### **Crescimento de plantas mutantes de Arabidopsis**

Plantas mutantes de *Arabidopsis* foram crescidas em solo contendo proporções iguais de vermiculita e substrato de turfa autoclavado a 121°C por 15 minutos a 1 bar de pressão (Mills et al., 2010; Jaffé et al., 2012). As plantas cresceram por aproximadamente um mês, regadas apenas

com água destilada, em sala com ambiente controlado com ciclo dia/ noite (22°C, 16 h luz; 18°C, 8 h noite). As linhagens mutantes, geradas em *background* Columbia (Col) por inserção de T-DNA, denominadas *fpn1-2* e *fpn2-2* (Alonso et al., 2003), assim como a linhagem duplo-mutante *fpn1fpn2* (Morrissey et al., 2009), foram gentilmente cedidas pela Dra. Mary Lou Guerinot (Dartmouth College, NH, USA).

### **Expressão de *OsFPN1* em mutantes de *Arabidopsis fnp1-2*, *fnp2-2* e *fnp1fnp2***

Utilizando a tecnologia Gateway, *OsFPN1 full-length* foi transferido do vetor de entrada para o vetor de expressão pMDC32 utilizando a enzima LR Clonase II (Invitrogen). A confirmação da correta transferência de *OsFPN1* para o vetor de expressão foi obtida pela clivagem do vetor utilizando a enzima de restrição *HindIII* (Promega) e por PCR utilizando a enzima Taq Polimerase (Invitrogen) e os *primers* de clonagem. O vetor de expressão foi transformado na linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico (Brasileiro e Carneiro, 1998). A linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* foi gentilmente cedida pelo Dr. Giancarlo Pasquali (UFRGS, RS, Brasil). As plantas mutantes *fnp1-2*, *fnp2-2* e *fnp1fnp2* foram transformadas usando o método *floral dip* (Clough and Bent, 1998).

### **Clonagem de *OsFPN1* e *OsMARL1* em vetores para expressão em protoplasto**

Utilizando a tecnologia Gateway, *OsFPN1* e *OsMARL1 non-stop* foram transferidos do vetor de entrada para o vetor de expressão pART7-YFP (Galvan-Ampudia and Offringa 2007), cedido pelo Dr. Felipe dos Santos Maraschin (UFRGS, RS, Brasil), utilizando a enzima LR Clonase II (Invitrogen). A seguir, as construções foram transformadas em *E. coli* TOP10 e plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico de seleção, ampicilina. A confirmação da correta transferência de *OsFPN1* e *OsMARL1* para o vetor de expressão foi realizada com a amplificação dos fragmentos por PCR, utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e os *primers* de clonagem, de pelo menos 10 colônias de cada construção. Uma colônia de cada construção foi purificada, utilizando kit de miniprep (Invitrogen) e enviada para sequenciamento.

### **Localização de *OsFPN1* e *OsMARL1* em protoplastos de *Arabidopsis***

Plantas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia (Col) foram crescidas como descrito acima. Folhas de aproximadamente 2 cm de largura e 5 cm de comprimento foram coletadas. Os

protoplastos foram isolados utilizando a técnica '*Tape-Arabidopsis Sandwich*' (Wu et al., 2009). A técnica consiste na remoção da epiderme abaxial das folhas de *Arabidopsis* para posterior liberação dos protoplastos em solução de enzima contendo 1% cellulase 'Onozuka' R10 (Yakult<sup>®</sup>), 0,25% macerozyme 'Onozuka' R10 (Yakult<sup>®</sup>), 0,4 M mannitol, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0,1% BSA e 20 mM MES, em pH 5,7. As folhas (cerca de 10) foram mantidas em agitação leve (40 rpm), em placas contendo 10 mL de solução de enzima, no escuro por 2 h para a liberação dos protoplastos. A solução de protoplastos foi centrifugada a 100 g por 3 min em tubos falcon de 50 mL. Em seguida os protoplastos foram lavados em 25 mL de solução W5 gelada (154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 5 mM glucose e 2 mM MES, pH 5,7) e incubados em gelo por 30 min. Durante a incubação os protoplastos foram contados usando um hematocítmetro em microscópio óptico. Os protoplastos foram centrifugados novamente e ressuspensos em solução MMg (0,4 M mannitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub> e 4 mM MES, pH 5,7) para uma concentração final de 2 a 5 × 10<sup>5</sup> células/mL. Para a transformação dos protoplastos foi utilizado o protocolo descrito por Zhang et al., 2011. Foram adicionados em um tubo de 1,5 mL: 200 µL de solução MMg, 10 µg do vetor pART7-GFP vazio ou pART7-YFP contendo *OsFPN1* ou *OsMARL1 non-stop* e 200µL de solução PEG 40% (PEG 4000, Sigma) contendo 0,1 M CaCl<sub>2</sub> e 0,2 M manitol. A mistura foi incubada por 5 min em temperatura ambiente. Após a incubação os protoplastos foram centrifugados a 100 g por 1 min. Os protoplastos foram ressuspensos em 1 mL de solução W5 e incubados em placas de 12 poços, pré-revestidos com BSA 1%, a temperatura ambiente, no escuro por 16 h. A observação da fluorescência de GFP e YFP foi feita em microscópio de fluorescência Axioplan. As proteínas GFP e YFP foram excitadas com o comprimento de onda de 488 nm e 514 nm, e a detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 505 a 530 nm e de 530 a 560 nm, respectivamente.

### **Localização de OsFPN1 e OsMARL1 em leveduras**

A localização subcelular das proteínas OsFPN1 e OsMARL1 *non-stop* em leveduras foi avaliada pela fusão *in-frame* da proteína GFP na extremidade C-terminal das proteínas OsFPN1 e OsMARL1 proporcionada pelo vetor de expressão pAG426-GFP (Alberti et al., 2007). Para induzir a expressão da proteína GFP, as leveduras foram crescidas *overnight* a 30°C em meio SC líquido sem uracila, contendo 2% de glicose. A seguir foram transferidas para meio SC líquido

sem uracila com 2% de galactose e incubadas por 24 h, a 30°C com agitação de 200 rpm. A observação da fluorescência de GFP foi realizada em microscópio confocal Olympus FluoView 1000. A proteína GFP foi excitada com o comprimento de onda de 488 nm, e sua detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 505 a 530 nm.

### **Crescimento de plantas de arroz mutantes *Osmar11* e extração de DNA foliar**

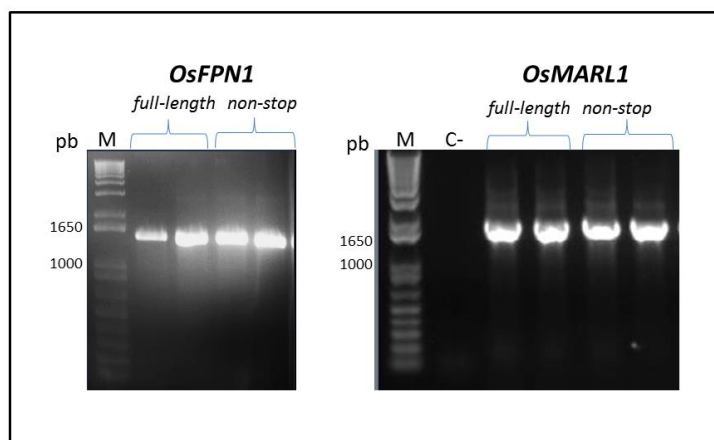
Sementes de plantas contendo mutação no gene *OsMARLI* foram obtidas do banco de mutantes Postech (<http://www.postech.ac.kr/life/pfg/>), localizado na Coreia do Sul. As plantas mutantes *Osmar11* foram crescidas em laboratório em solução nutritiva (como descrito acima) por aproximadamente um mês. Para confirmação da inserção do T-DNA nos prováveis mutantes, amostras de folhas foram coletadas para extração de DNA genômico, utilizando o protocolo Dellaporta DNA Miniprep (Dellaporta et al., 1983). A amplificação foi realizada por PCR, utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e os *primers*: *forward* 5'-AACAGATTCTCCTGCCATGC, *reverse* 5'-GGAAATGGGGATCAAACATG e T-DNA\_RB1 5'-TTGGGGTTTCTACAGGACGTAAC, simultaneamente. Após confirmação, os mutantes foram transferidos para substrato (terra preta) e estão sendo mantidos em casa de vegetação até a maturação das sementes. A casa de vegetação pertence à Faculdade de Agronomia da UFRGS-RS/ Brasil.

## **Resultados e Discussão**

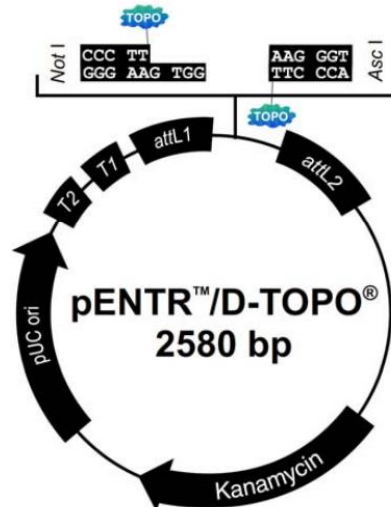
### **Amplificação de *OsFPN1* e *OsMARLI* para clonagem em pENTR/D-TOPO**

A sequência codificante de *OsFPN1* e *OsMARLI* foram amplificadas por PCR utilizando a enzima Pfx50 Taq DNA polymerase (Invitrogen) e os *primers* projetados conforme as instruções do fabricante do vetor pENTR/D-TOPO (**Fig. 1**). O *forward primer* contém quatro nucleotídeos extra na extremidade 5' (CACC), que são necessários para promover a integração, no vetor de entrada (**Fig. 2**), do produto amplificado por PCR. A integração do gene de interesse ocorreu em 5 minutos, à temperatura ambiente (T.A.), devido à atividade da enzima Topoisomerase I presente nas extremidades do vetor, que fosforila o mesmo e promove a ligação. Após a ligação das sequências de interesse, a Topoisomerase é liberada. Em seguida os clones de pENTR/D-

TOPO contendo *OsFPN1* (*full-length* ou *non-stop*) e *OsMARL1* (*full-length* ou *non-stop*) foram transformados em células termo-competentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. As células de TOP10 transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico de seleção, canamicina. Pelo menos 10 colônias para cada construção foram testadas por PCR, utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e os *primers* usados para a amplificação dos fragmentos clonados no vetor, para confirmação da ligação. Colônias confirmadas positivas para a inserção das construções por PCR foram purificadas, utilizando kit de miniprep (Invitrogen), clivadas utilizando a enzima de restrição *MluI* (Invitrogen), para todas as construções. Uma colônia de cada construção foi enviada para sequenciamento para confirmar a fidelidade de amplificação da sequência nucleotídica de interesse. Cada construção foi sequenciada em 5 reações diferentes: uma com o *forward primer* do gene, uma com o *reverse primer* (*full-length* ou *non-stop*), uma com o *primer forward-seq* (que anela na metade da sequência do gene), uma com o *forward primer* M13 e uma com o *reverse primer* M13 (sendo esses dois últimos, *primers* recomendados pelo fabricante, que anelam no vetor pENTR/D-TOPO, em regiões adjacentes ao sítio de clonagem). Os primers utilizados para o sequenciamento dos vetores de entrada, contendo os genes das ferroportinas de arroz, estão listados na **Tabela 1**.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação das ferroportinas de arroz por PCR para clonagem no vetor pENTR/D-TOPO. *OsFPN1* e *OsMARL1* foram amplificados nas formas *full-length* (sequência codificante completa) ou *non-stop* (sequência codificante sem o códon de terminação). M: marcador de peso molecular, pb (pares de base referentes ao tamanho de fragmento indicado pelo fabricante - Invitrogen). Os tamanhos dos produtos de PCR são: *OsFPN1 full-length* (1455 pb), *OsFPN1 non-stop* (1452 pb), *OsMARL1 full-length* (1776 pb) e *OsMARL1 non-stop* (1773 pb).



**Figura 2.** Representação do vetor de entrada pENTR/D-TOPO da tecnologia Gateway (Invitrogen). No esquema do vetor estão representados: o gene de resistência ao antibiótico canamicina (Kanamycin), a origem do vetor (*pUC ori*), as duas sequências terminadoras (T1 e T2), os sítios de recombinação do vetor de entrada (*attL1* e *attL2*) com os vetores de expressão de destino e o sítio de inserção do gene de interesse, representado entre as duas regiões de atividade da topoisomerase I (TOPO).

**Tabela 1.** Lista de *primers* usados para o sequenciamento das sequências codificadoras das ferroportinas de arroz clonadas no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen).

Nome do primer	Seqüência do primer (sentido 5' – 3')
<i>OsFPN1 forward</i>	CACCATGGCGAGTGATGGCC
<i>OsFPN1 reverse (full-length)</i>	TCAAGAAGCTTTGATCCAGTTCATCTT
<i>OsFPN1 reverse (non-stop)</i>	AGAAGCTTTGATCCAGTTCATCTTGG
<i>OsFPN1 forward-seq</i>	GTGCTGACGGGATCAACT
<i>OsMARL1 forward</i>	CACCATGGGGATGGTCACCG
<i>OsMARL1 reverse (full-length)</i>	TTACATTGGTTCAACTTGGAAATGGGG
<i>OsMARL1 reverse (non-stop)</i>	CATTGGTTCAACTTGGAAATGGGG
<i>OsMARL1 forward -seq</i>	CCTGTGGCTATTGTCGGTTT
<i>M13 forward</i>	GTAAAACGACGGCCAG
<i>M13 reverse</i>	CAGGAAACAGCTATGAC



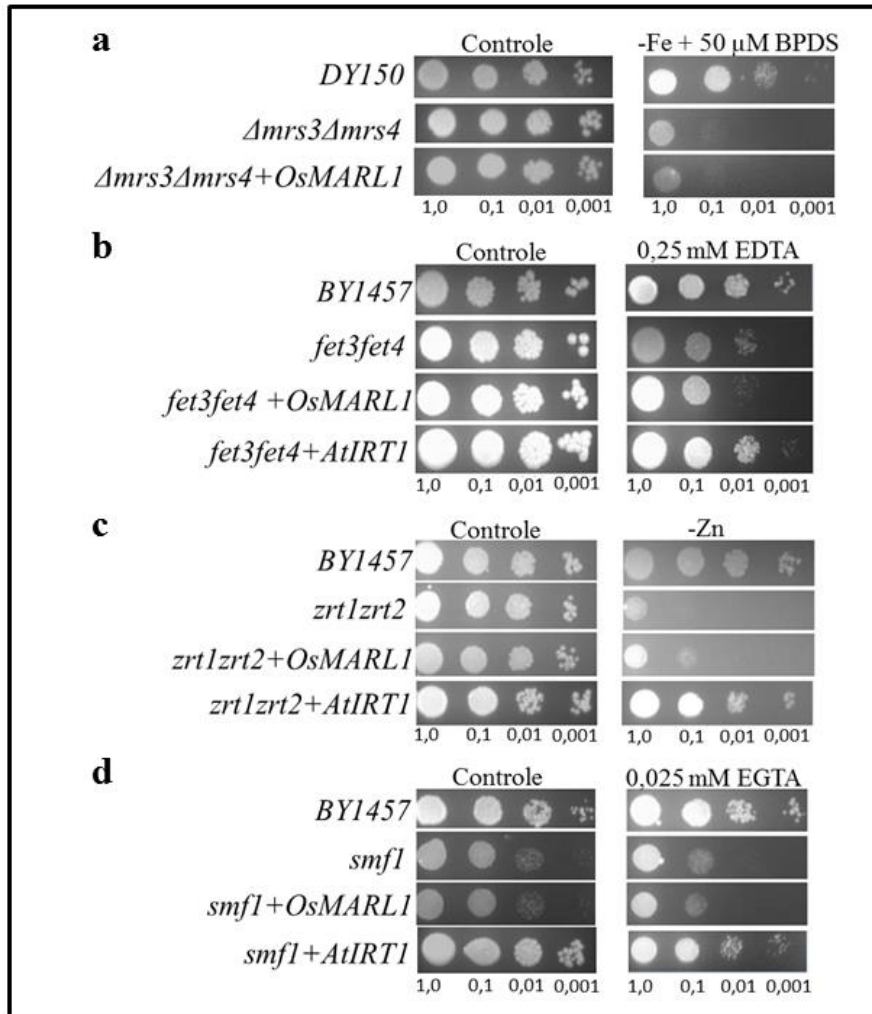
## Ensaio de complementação em leveduras

Estudos com as ferroportinas de *Arabidopsis* mostram que AtFPN1 e AtFPN2 são proteínas de membrana plasmática e membrana vacuolar, respectivamente, e são transportadoras de Fe, Co e Ni em diferentes partes da planta (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009), enquanto AtMAR1 pode estar envolvida na homeostase de Fe em cloroplastos, e sua super-expressão leva a clorose em plântulas (Conte et al., 2009).

Um importante passo a ser dado para a caracterização funcional das ferroportinas de arroz é a expressão em leveduras mutantes para genes transportadores de metais, e assim possivelmente inferir sobre sua função, afinidade por diferentes metais e localização subcelular. Pouco se sabe sobre as ferroportinas de arroz (ver capítulo 1). Com base na sequência do seu peptídeo sinal, e utilizando-se o programa de predição iSort, foi previsto que a proteína OsMARL1 localiza-se no cloroplasto, assim como a proteína de *Arabidopsis* AtMAR1 (Conte et al., 2009). Naquele trabalho, o cDNA *AtMAR1* foi usado para complementar a levedura mutante *fet3fet4*, deficiente no transporte de Fe através da membrana plasmática. Não houve complementação do fenótipo mutante da levedura, como era esperado, pois a localização da proteína AtMAR1, em levedura, foi mitocondrial. Devido a localização mitocondrial de AtMAR1 em leveduras, o primeiro teste de complementação com *OsMARL1 full-length* foi com o mutante  $\Delta mrs3\Delta mrs4$ , deficiente para o transporte de Fe através da membrana mitocondrial (Bashir et al., 2011) (**Fig. 3a**). As condições usadas foram: ausência de fonte de Fe e 50  $\mu$ M de BPDS, um quelante de metais divalentes. *OsMARL1* não apresentou capacidade de resgate do fenótipo mutante. A proteína OsMIT1 (Mitochondrial Iron Transporter), cuja localização mitocondrial foi demonstrada por Bashir et al. (2011) é capaz de complementar o mutante  $\Delta mrs3\Delta mrs4$  no transporte de Fe para a mitocôndria. É possível que OsMARL1 não tenha sido funcional em mitocôndrias por ser uma proteína específica de cloroplastos.

Existe uma proteína de *Arabidopsis* que, apesar de ser cloroplastídica, é capaz de complementar a levedura mutante *fet3fet4* no transporte de Fe. A proteína AtPIC1 (Permease In Chloroplasts 1) transporta Fe através de membrana do cloroplasto em células da planta, mas mostrou-se funcional também na membrana plasmática das células de levedura (Duy et al., 2007). Com base neste fato, decidimos testar a capacidade de *OsMARL1* complementar mutantes deficientes no transporte de Fe (*fet3fet4*), Zn (*zrt1zrt2*) e Mn (*smf1*) através da membrana plasmática (**Fig. 3b, c, d**). *AtIRT1* foi utilizado como um controle positivo, pois a proteína

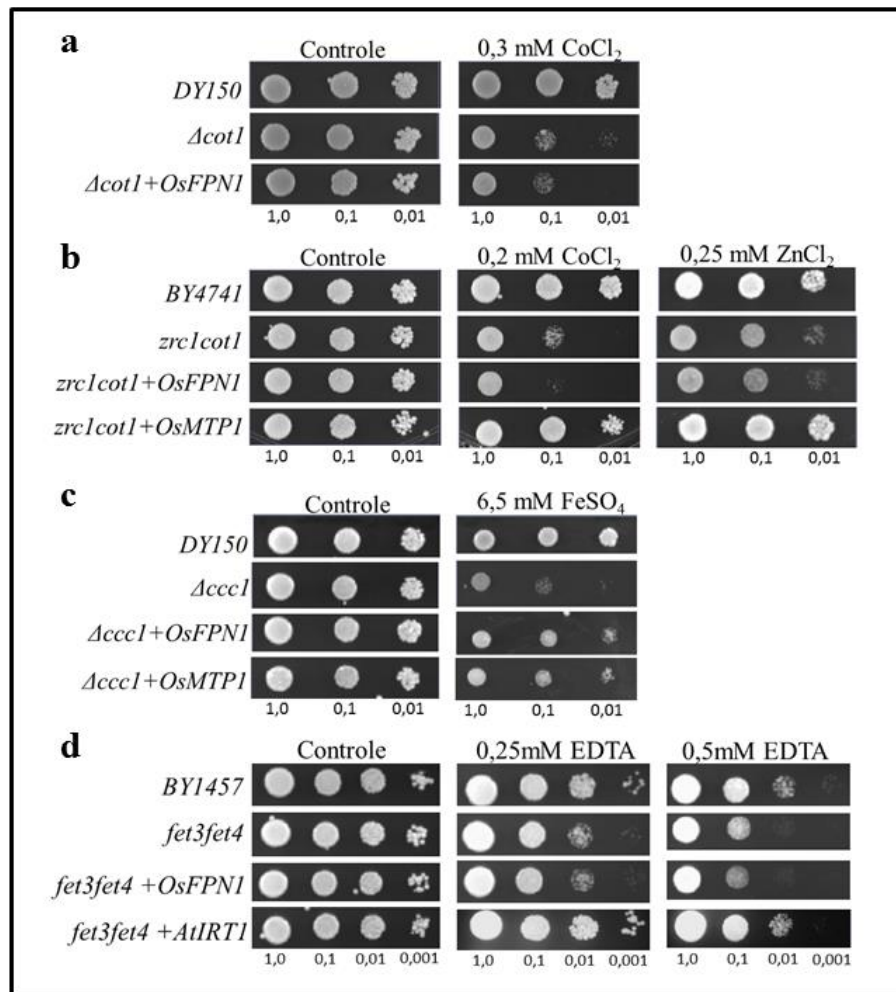
*AtIRT1* é capaz de mediar o transporte de múltiplos metais, incluindo Fe, Mn, Zn e Cd quando expressa em leveduras (Korshunova et al., 1999; Eide et al., 1996). Os resultados mostraram, como esperado, a complementação do fenótipo mutante nas células transformadas com *AtIRT1*, mas nenhuma complementação ficou evidente para *OsMARL1 full-length*, quando comparado com os mutantes transformados com o vetor vazio. No mutante com deficiência no transporte de Zn (*zrt1zrt2*), foi possível observar um crescimento levemente superior nas células contendo o gene *OsMARL1 full-length*. A repetição dos testes não mostrou nenhuma diferença em relação os resultados já apresentados na **Figura 3**. Assim, com os resultados obtidos até o momento, não é possível inferir uma possível função no transporte de metais em leveduras para o gene *OsMARL1*. A construção *OsMARL1 non-stop* não foi utilizada para os testes de complementação de transporte em leveduras, pois a perda do códon de terminação de uma proteína e a adição de uma proteína pequena de GFP na porção C-terminal podem diminuir a eficiência do transporte de metais, como constatado pelo nosso grupo para a proteína OsMTP1 (Metal Tolerance Protein), embora não ocorra alteração na especificidade por metais ou localização subcelular (Menguer et al., 2013).



**Figura 3.** Análise funcional de OsMARL1 em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Os mutantes deficientes no transporte de Fe através da membrana mitocondrial ( $\Delta mrs3\Delta mrs4$ ) ou Fe (*fet3fet4*), Zn (*zrt1zrt2*) e Mn (*smf1*) através da membrana plasmática foram transformados com o vetor pAG426-GFP vazio ou expressando *OsMARL1 full-length*. As linhagens selvagem *DY150* e *BY1457* foram transformadas somente com o vetor pAG426-GFP vazio. Os números na base das figuras representam as diluições em série das culturas. As diluições em série foram feitas a partir das culturas ajustadas para  $OD_{600} = 0,4$  (1 X), sendo as diluições de 0,1 X (1:10), 0,01 X (1:100) e 0,001 X (1:1000) em meio SC líquido sem uracila e presença de galactose a 2%. Foram inoculadas gotas sequenciais de 5  $\mu$ L nas placas de meio SC sem uracila, com 2% de galactose. Na placa teste do mutante  $\Delta mrs3\Delta mrs4$ , além da ausência de fonte de Fe, 50  $\mu$ M de BPDS (*ácido bato-fenantrolina disulfônico*) foi adicionado. Diferentes concentrações de quelantes de metais foram adicionadas nas placas testes dos mutantes deficientes no transporte através da membrana plasmática: 0,25 mM de EDTA (*ácido etileno diamino tetraacético*) para *fet3fet4* e 0,025 mM de EGTA (*ácido etileno glicol bis-tetraacético*) para *smf1*. Para crescimento da linhagem *zrt1zrt*, foram adicionados 20  $\mu$ M de  $ZnCl_2$  nas placas controle, enquanto na placa teste nada foi adicionado. As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 4 dias.

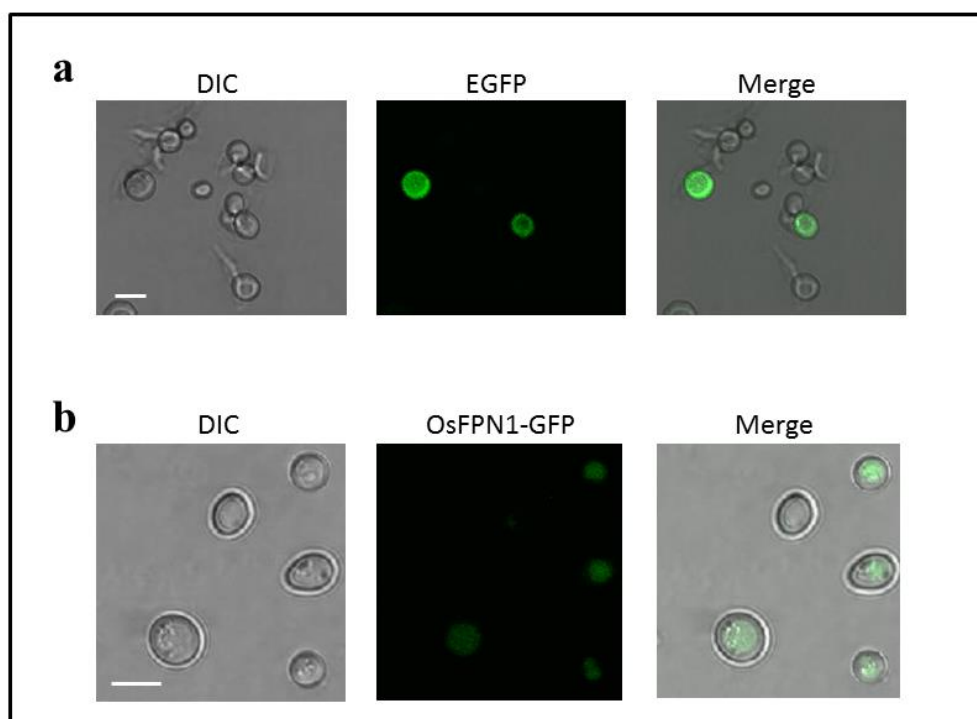
A proteína OsFPN1 de arroz parece ter localização vacuolar, segundo o programa de predição Wolf Psort (ver capítulo 1), assim como a proteína AtFPN2 de *Arabidopsis* (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009). AtFPN2 é capaz de recuperar o fenótipo do mutante  $\Delta cot1$  para o transporte de Ni (Schaaf et al., 2006), do mutante  $\Delta cot1$  para o transporte de Co e do mutante  $\Delta ccc1$  para o transporte de Fe vacuolar (Morrissey et al., 2009). Os primeiros testes de complementação com OsFPN1 foram nos mutantes para transportadores vacuolares de Co ( $\Delta cot1$  e  $zrc1cot1$ ), Zn ( $zrc1cot1$ ) e Fe ( $\Delta ccc1$ ) (**Fig. 4a, b, c**). Foi utilizada construção *OsFPN1 non-stop* no vetor de expressão em leveduras pAG426-GFP. Até este momento, não foram obtidas colônias positivas para a versão *OsFPN1 full-length* após a recombinação no vetor de expressão pAG426-GFP com o vetor de entrada.

*OsMTP1* foi utilizado como controle positivo para o transporte de Zn e Fe vacuolar nos mutantes  $zrc1cot1$  e  $\Delta ccc1$ , conforme Menguer et al. (2013) (**Fig. 4b, c**). O ensaio realizado com o mutante deficiente no transporte de Zn ( $zrc1cot1$ ) expressando *OsFPN1 non-stop* não apresentou nenhuma diferença em relação ao mutante com o vetor vazio na presença de 0,25 mM de  $ZnCl_2$  (**Fig. 4b**). Foram testados dois mutantes deficientes no transporte de Co vacuolar:  $\Delta cot1$  e o duplo mutante  $zrc1cot1$  (**Fig. 4a, b**). Foi observada maior sensibilidade ao cobalto nos mutantes transformados com *OsFPN1 non-stop* do que nos mutantes com o vetor vazio. Para testar se essa sensibilidade poderia ser resultante de transporte de Co através da membrana plasmática, a capacidade de transporte de metais através da membrana plasmática pela proteína OsFPN1 foi investigada. O mutante  $fet3fet4$  foi transformado com *OsFPN1 non-stop*. A transformação não foi capaz de resgatar a capacidade de transporte de Fe através da membrana plasmática nas células mutantes (**Fig. 4d**). Nenhuma diferença em relação ao mutante com o vetor vazio foi observada, tanto com a adição de 0,25 mM quanto de 0,5 mM de EDTA, utilizado para diminuir a disponibilidade de Fe. Com base nos resultados obtidos, foi descartada uma possível função da proteína OsFPN1 no transporte de metais através da membrana plasmática, reforçando a hipótese de que atua como transportador vacuolar. Diferenças foram observadas nos testes com o mutante  $\Delta ccc1$ , defectivo para o transporte de Fe vacuolar (**Fig. 4c**). O crescimento do mutante  $\Delta ccc1$  é inibido em 6,5 mM  $FeSO_4$  quando comparado com o tipo selvagem. OsFPN1 parece complementar o mutante  $\Delta ccc1$ , assim como AtFPN2 (Morrissey et al., 2009), indicando que OsFPN1 pode transportar Fe quando expresso em leveduras, e é candidato a gene ortólogo a FPN2 de *Arabidopsis*.



**Figura 4.** Análise funcional de OsFPN1 em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Os mutantes deficientes no transporte vacuolar de Co ( $\Delta cot1$  e  $zrc1cot1$ ), Zn ( $zrc1cot1$ ) e Fe ( $\Delta ccc1$ ) ou deficiente no transporte de Fe através da membrana plasmática ( $fet3fet4$ ) foram transformados com o vetor pAG426-GFP vazio ou expressando *OsFPN1 non-stop*. As linhagens selvagens *DY150*, *BY4741* e *BY1457* foram transformadas somente com o vetor pAG426-GFP vazio. Os números na base das figuras representam as diluições em série das culturas. As diluições em série foram feitas a partir das culturas ajustadas para  $OD_{600} = 0,4$  (1 X), sendo as diluições de 0,1 X (1:10), 0,01 X (1:100) e 0,001 X (1:1000) em meio SC líquido sem uracila e presença de galactose a 2%. Foram inoculadas gotas sequenciais de 5  $\mu$ L nas placas de meio SC sem uracila, com 2% de galactose e diferentes concentrações de metais: 0,3 mM de  $CoCl_2$  para  $\Delta cot1$ , 0,2 mM de  $CoCl_2$  para  $zrc1cot1$ , 0,25 mM de  $ZnCl_2$  para  $zrc1cot1$  e 6,5 mM de  $FeSO_4$  para  $\Delta ccc1$ ; ou 0,25 e 0,5 mM do quelante EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) para  $fet3fet4$ . As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 4 dias.

O teste de localização subcelular de OsFPN1 foi realizado utilizando o vetor pAG426-GFP, que fusiona a proteína fluorescente GFP na porção C-terminal do gene e permite a localização por fluorescência. Foram testadas as linhagem *Δccc1* e *zrc1cot1* de levedura. O resultado do ensaio realizado com a linhagem *Δccc1* pode ser visto na **Figura 5**. A fluorescência da construção OsFPN1-EGFP se co-localiza com o vacúolo, que aparece como uma depressão na imagem de DIC (**Fig. 5b**). A localização da proteína OsFPN1 em leveduras constituiu um importante passo na caracterização das ferroportinas de arroz.

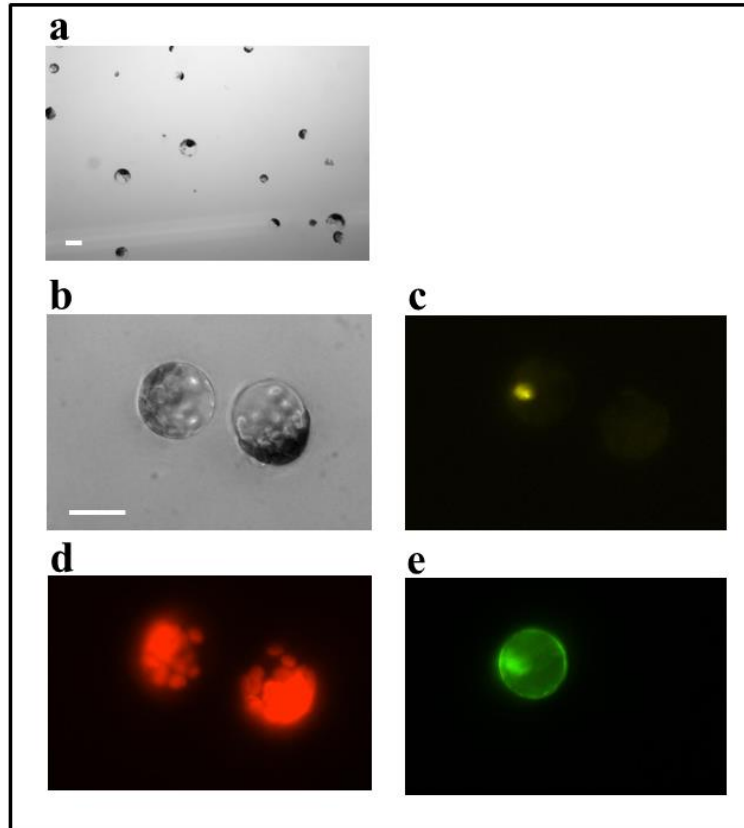


**Figura 5.** OsFPN1 tem localização vacuolar quando expresso em leveduras. OsFPN1–EGFP localizou-se no vacúolo de células da levedura mutante *Δccc1* utilizando o vetor pAG426-GFP (a) Proteína EGFP (verde) sozinha é distribuída por todo o citoplasma. (b) OsFPN1–EGFP (verde) co-localiza com o vacúolo, que aparece como uma depressão na imagem de DIC. Imagens obtidas em microscópio confocal. Barra de escala= 25  $\mu$ m.

### Localização de OsFPN1 e OsMARL1 em protoplastos de Arabidopsis

Ensaio de expressão transitória são uma alternativa para a análise funcional de expressão de genes em plantas, e são usados há pelo menos duas décadas (Dekeyser et al., 1990; Sheen, 2001). Estes ensaios são vistos como uma alternativa vantajosa em relação a transgenia, pois é

possível observar os resultados em menor tempo (Kapila et al., 1997). De acordo com programas de predição de localização subcelular baseados nas seqüências nucleotídicas das proteínas, OsMARL1 localiza-se no cloroplasto e OsFPN1 no vacúolo (ver capítulo 1). Visando confirmar (ou não) estas localizações, tentou-se realizar ensaios de expressão transiente de OsMARL1-YFP e OsFPN1-YFP em protoplastos de *Arabidopsis*, utilizando o vetor de expressão em plantas pART7 (Galvan-Ampudia and Offringa 2007). Os ensaios foram realizados no laboratório da Dra. Mary Lou Guerinot, no *Dartmouth College*, NH, USA. A **Figura 6** mostra que a extração de protoplastos e a transformação dos mesmos foram realizadas com sucesso, podendo ser observadas células viáveis 24 h após a realização dos protocolos (**Fig. 6a**). Foram observadas células expressando a proteína fluorescente GFP somente no controle positivo (**Fig. 6e**, expressando somente GFP, sem fusão com proteínas de arroz). Nenhuma célula expressando OsMARL1-YFP ou OsFPN1-YFP foi observada nos ensaios. Nenhum erro na seqüência nucleotídica da construção *OsMARL1 non-stop* foi observada nos resultados do sequenciamento. O sequenciamento da construção *OsFPN1 non-stop* apresentou uma qualidade ruim na região inicial e final da seqüência nucleotídica, mas na região com boa qualidade de sequenciamento, nenhum erro foi observado. Ainda não se tem uma explicação para o não funcionamento do experimento utilizando o vetor pART7, pois este já foi utilizado com sucesso em trabalhos de outros autores (Galvan-Ampudia and Offringa 2007; Arenhart et al., 2013). Estes experimentos deverão ser repetidos utilizando outros vetores da tecnologia Gateway.



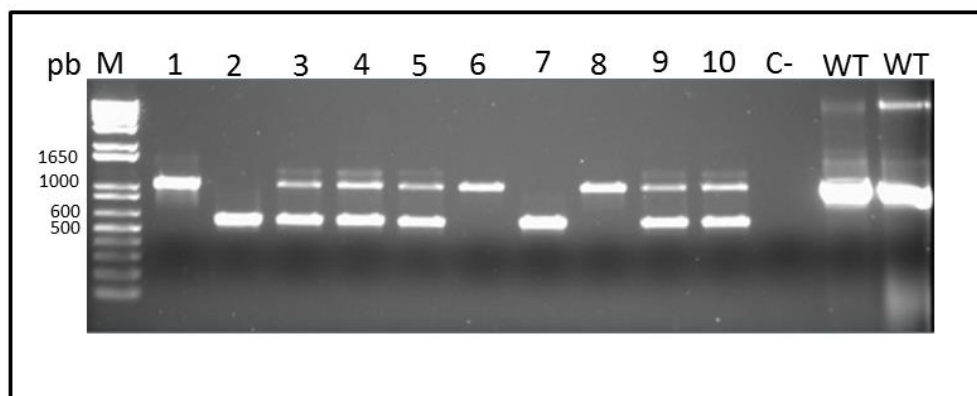
**Figura 6.** Ensaio de expressão transiente em protoplastos de *Arabidopsis*. (a) células controle não transformadas. (b) células observadas em campo claro 24 h após transformação com pART7-GFP. (c) Célula expressando a proteína nuclear H2B-RFP. (d) Autofluorescência dos cloroplastos. (e) Célula transformada com pART7-GFP expressando a proteína fluorescente (controle positivo). Barra de escala= 10  $\mu$ m.

### **Identificação de mutantes *Osmar11* e Expressão de OsFPN1 em mutantes de *Arabidopsis***

As sementes recebidas do banco Postech (da linhagem contendo inserção de T-DNA no gene *OsMARL1*) foram germinadas, e as plântulas tiveram DNA genômico extraído e analisado por PCR, para identificação de indivíduos contendo a inserção em homozigose ou em heterozigose. Foram identificados cinco mutantes heterozigotos (**Fig. 7**, canaletas 3, 4, 5, 9 e 10) e dois homozigotos (**Fig. 7**, canaletas 2 e 7) para a inserção de T-DNA na região codificante do gene *Osmar11*. As plantas mutantes foram transferidas para casa de vegetação, onde serão mantidas até a obtenção das sementes. As sementes serão utilizadas para a realização de testes comparando o padrão de expressão gênica e características fenotípicas dos mutantes *Osmar11* com plantas do tipo selvagem (WT), submetidas ou não a tratamento de deficiência de Fe. A



análise dos mutantes *Osmar11* será importante para a caracterização funcional das ferroportinas de arroz.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação dos mutantes *Osmar11* por PCR. As reações foram realizadas utilizando três *primers* simultaneamente: *forward* e *reverse* do gene *OsMARL1* e *reverse primer* do T-DNA inserido no mutante. Foram testadas dez plantas numeradas de 1 a 10. M: marcador de peso molecular, pb (pares de base referentes ao tamanho de fragmento indicado pelo fabricante - Invitrogen), C-: controle negativo do PCR; WT: plantas do fenótipo selvagem utilizadas como controle positivo. Os tamanhos dos produtos amplificados por PCR são: 1100 pb para o produto amplificado com os *primers forward* e *reverse* do gene *OsMARL1* e 550 pb para produto amplificado com os *primers forward* do gene *OsFPN1* e *reverse primer* do T-DNA.

As plantas mutantes *fpn1-2*, *fpn2-2* e *fpn1fpn2* de *Arabidopsis* foram transformadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal (UFRGS/RS-Brasil) usando o método *floral dip* descrito por Clough and Bent (1998). As plantas transformadas com a construção *OsFPN1 full-length* estão sendo crescidas em sala climatizada adequada até a maturação completa das sementes. Após a coleta das sementes, estas serão germinadas em placas contendo o antibiótico de seleção em plantas, higromicina. Espera-se a obtenção de sementes transformadas, que permitirão a caracterização funcional de *OsFPN1*.

## Conclusões e Perspectivas

Devido a grande importância nutricional e econômica do arroz, é cada vez maior o número de trabalhos sendo realizados com o objetivo de caracterizar genes e mecanismos responsáveis pelos processos de homeostase de nutrientes minerais, especialmente os metais essenciais para a saúde humana Fe e Zn. Até o momento, somente as ferroportinas de *Arabidopsis* foram

caracterizadas em plantas, tendo sido demonstrado que estão envolvidas na homeostase de Fe, Co e Ni. Este trabalho teve como objetivo a caracterização funcional das ferroportinas de arroz através da expressão heteróloga dos cDNAs em linhagens de levedura contendo mutações em genes que codificam diferentes transportadores de metais, a localização subcelular das proteínas OsFPN1 e OsMARL1 em protoplastos de *Arabidopsis*, e a transformação de mutantes perda-de-função *fpn1*, *fpn2* e *fpn1fpn2* de *Arabidopsis*.

Os resultados obtidos até o momento para a expressão do gene *OsMARL1 full-length* em leveduras não permitiram inferir uma possível função da proteína OsMARL1 no transporte de metais. Novas tentativas serão realizadas, utilizando-se um vetor de expressão constitutiva. A expressão da proteína OsFPN1 em fusão com GFP pareceu resgatar o fenótipo do mutante  $\Delta ccc1$ , assim como a expressão da proteína de *Arabidopsis* AtFPN2 (Morrissey et al., 2009), indicando que OsFPN1 pode transportar Fe quando expresso em leveduras, e o gene *OsFPN1* é candidato a ortólogo de *AtFPN2*. Testes para localização subcelular com a construção *OsFPN1-GFP* no vetor pAG426-GFP serão realizados, visando testar a hipótese de localização vacuolar.

Após diversas tentativas, o protocolo de extração de protoplastos resultou em células viáveis após o evento de transformação. Não foram observadas células expressando OsMARL1-YFP ou OsFPN1-YFP utilizando o vetor pART7. Novos ensaios de expressão transiente serão realizados para os genes *OsMARL1* e *OsFPN1* em protoplastos, utilizando os vetores de expressão em plantas pEarleyGate 101 (YFP) e 103 (GFP) (Earley et al., 2006), ambos da tecnologia Gateway (Invitrogen).

As plantas de *Arabidopsis* mutantes *fpn1-2*, *fpn2-2* (Alonso et al., 2003) e *fpn1fpn2* (Morrissey et al., 2009) foram transformadas usando o método *floral dip* (Clough and Bent, 1998) com a construção *OsFPN1 full-length* utilizando o vetor de expressão em plantas pMDC32 da tecnologia Gateway (Invitrogen). As plantas estão em fase de maturação das sementes, e serão coletadas no final do mês de julho de 2013. Quando obtidas as plantas transformantes, estas serão cruzadas até a geração de plantas expressando *OsFPN1 full-length* em homozigose. As plantas homozigotas serão testadas para o resgate do fenótipo selvagem na presença de concentrações consideradas tóxicas de metais como Fe, Co e Ni, de acordo com os trabalhos caracterizando as ferroportinas de *Arabidopsis* (Shaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009).

## Referências

- Alberti, S.; Gitler A.D.; Lindquist, S. (2007) A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24: 913–919.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N.; Leisse, T.J.; Kim, C.J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D.K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadrinab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C.C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Karnes, M.; Mulholland, C.; Ndubaku, R.; Schmidt, I.; Guzman, P.; Aguilar-Henonin, L.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D.E.; Marchand, T.; Risseuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W.L.; Berry, C.C.; Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301: 653–657.
- Arenhart, R.A.; de Lima, J.C.; Pedron, M.; Carvalho, F.E.L.; da Silveira, J.A.G.; Rosa, S.B.; Caverzan, A.; Andrade, C.M.B.; Schunemann, M.; Margis, R.; Margis-Pinheiro, M. (2013) Involvement of ASRgenes in aluminium tolerance mechanisms in rice. *Plant, Cell and Environment*, 36:52–67.
- Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Nishizawa, N.K. (2010) Iron Uptake and Loading into Rice Grains. *Rice* 3: 122-130
- Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Shimo, H.; Nagasaka, S.; Fujimoto, M.; Takanashi, H.; Tsutsumi, N.; An, G.; Nakanishi H.; Nishizawa, N.K. (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nature Communications*, 2: 322.
- Clough, S.J., Bent, A.F.(1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16: 735–743.
- Conte, S.; Stevenson, D.; Furner, I.; Lloyd, A. (2009) Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiology*, 151: 559-573.
- Dekeyser, A.; Claes, B.; De Rycke, R.; Habets, M.; Van Montagu, M.; Caplan, A. (1990) Transient gene expression in intact and organized rice tissue. *The Plant Cell*, 2: 591– 602.

- Dellaporta, S.L.; Wood, J.; Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.
- Duy, D.; Wanner, G.; Meda, A.R.; von Wieren, N.; Soll, J.; Philippar, K. (2007) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *The Plant Cell*, 19: 986–1006.
- Earley, K.W.; Haag, J.R.; Pontes, O.; Opper, K.; Juehne, T.; Song, K.; Pikaard, C.S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45: 616–629.
- 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. *PNAS*, 93: 5624-5628.
- Galvan-Ampudia, C.S.; Offringa, R. (2007) Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. *Trends in Plant Science*, 12: 541–547.
- Gietz, R.D.; Schiestl, R.H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2: 1.
- Gómez-Galera, S.; Rojas, E.; Sudhakar, D.; Zhu, C.; Pelacho, A. M.; Capell, T. and Christou, P. (2010) Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Research*, 19: 165-180.
- Jaffé, F.W.; Freschet, G.E.; Valdes, B.M.; Runions, J.; Terry, M.J.; Williams, L.E. (2012) G protein-coupled receptor-type G proteins are required for light-dependent seedling growth and fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24: 3649–3668.
- Kapila, J.; De Rycke, R.; Van Montagu, M.; Angenon, G. (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122: 101–108.
- Korshunova, Y.O.; Eide, D.; Clark, W.G.; Guerinot, M.L.; Pakrasi, H.B. (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with broad specificity. *Plant Molecular Biology*, 40: 37–44.

Masuda, H.; Ishimaru, Y.; Aung, M.S.; Kobayashi, T.; Kakei, Y.; Takahashi, M.; Higuchi, K.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. (2012) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Scientific Reports*, 2: 543.

Menguer, P.K.; Farthing, E.; Peaston, K.A.; Ricachenevsky, F.K.; Fett, J.P.; Williams, L.E. (2013) Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *Journal of Experimental Botany*, 64: 2871–2883.

Mills, R.F.; Peaston, K.A.; Runions, J.; Williams, L.E. (2012) HvHMA2, a P(1B)-ATPase from barley, is highly conserved among cereals and functions in Zn and Cd transport. *PLoS One*, 7: e42640.

Mills, R.F.; Valdes, B.; Duke, M.; Peaston, K.A.; Lahner, B.; Salt, D.E.; Williams, L.E. (2010) Functional significance of AtHMA4 C-terminal domain in planta. *PLoS One* 5: e13388.

Morrissey, J.; Baxter, I.R.; Lee, J.; Li, L.; Lahner, B.; Grotz, N.; Kaplan, J.; Salt, D.E.; Guerinot, M.L. (2009) The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3326-3338.

Schaaf, G.; Honsbein, A.; Meda, A.R.; Krichner, S.; Wipf, D.; von Wiren, N. (2006) *AtIREG2* encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 25532-25540.

Sheen, J. (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 127: 1466–1475.

UNICEF (2010) [www.unicef.org/nutrition/index\\_iodine.html](http://www.unicef.org/nutrition/index_iodine.html) (acesso em junho de 2013).

White, P.J.; Broadley, M.R. (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49-84.

Wu, F.H.; Shen, S.C.; Lee, L.Y.; Lee, S.H.; Chan, M.T.; Lin, C.S. (2009) Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*, 5:16.

Yuan, L.; Wu, L.; Yang, C.; Lv, Q. (2012) Effects of iron and zinc foliar applications on rice plants and their grain accumulation and grain nutritional quality. *Journal of the science of food and agriculture*, 93: 254-261.

Zhang, Y.; Su, J.; Duan, S.; Ao, Y.; Dai, J.; Liu, J.; Wang, P.; Li, Y.; Liu, B.; Feng, D.; Wang, J.; Wang, H. (2011) A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7: 30.

## DISCUSSÃO GERAL

Foi proposto que as ferroportinas de *Arabidopsis* estão envolvidas com os mecanismo de transporte e detoxificação de metais (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009; Conte et al., 2009), acrescentando esses genes na lista de possíveis alvos para manipular as concentrações de nutrientes minerais em sementes. As ferroportinas não foram caracterizadas em nenhuma outra espécie de planta. Na busca por genes de arroz que pudessem ser homólogos das ferroportinas de *Arabidopsis*, nos encontramos três sequências: uma com homologia a *AtFPN1* e *AtFPN2* (Os06g36450) nomeada *OsFPN1*, e duas com homologia a *AtMAR1* (Os12g37530 e Os05g04120), nomeadas *OsMARL1* e *OsMARL2* (MAR Like).

A arquitetura das ferroportinas de arroz foi determinada pelo alinhamento das sequências genômica, de cDNA e sequência codificadora de cada um dos genes. *OsFPN1* possui 4 éxons e uma sequência codificante de 1455 pb. *OsMARL1* possui 13 éxons e uma sequência codificante de 1776 pb. *OsMARL2* apresenta 10 éxons e uma sequência codificante de 1782 pb. A proteína *OsFPN1* compartilha 51% e 53% de similaridade com as proteínas *AtFPN1* e *AtFPN2* de *Arabidopsis*, respectivamente, e tem localização vacuolar predita pelo software Wolf Psort, assim como *AtFPN2* (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009). As proteínas *OsMARL1* e *OsMARL2* compartilham 48% e 41% de similaridade com a proteína *AtMAR1*. *OsMARL1* tem localização cloroplástica predita pelo software iPsort, assim como *AtMAR1* (Conte et al., 2009), enquanto a de *OsMARL2* é mitocondrial. O gene *OsMARL1* pode ser transcrito de duas formas distintas, nomeadas *OsMARL1a* e *OsMARL1b*, e a expressão destes transcritos parece ser regulada de forma distinta por diferentes tratamentos e durante o desenvolvimento reprodutivo.

*OsFPN1* apresentou um padrão de expressão variante durante o desenvolvimento reprodutivo em diferentes órgãos. The todos os transcritos avaliados, *OsMARL1b* apresentou os mais altos níveis em folhas-bandeira. Os níveis de transcritos de *OsMARL1a* foram mais baixos que *OsMARL1b* em todos os órgãos. Em panículas, somente a expressão de *OsMARL1b* apresentou uma elevação gradual nos estágios finais de desenvolvimento reprodutivo. Foi mostrado por Sperotto et al. (2010) que genes com expressão variante durante o desenvolvimento reprodutivo em plantas de arroz podem ter relação com as concentrações de nutrientes finais nos grãos. Sendo assim, o padrão de expressão de *OsFPN1*, *OsMARL1a*, *OsMARL1b* e *OsMARL2*

durante o desenvolvimento reprodutivo pode indicar um possível envolvimento das ferroportinas neste processo.

*OsFPN1* e *OsMARL1a* tiveram expressão induzida por deficiência de Fe e diminuída por excesso de Fe em parte aérea. *OsFPN1* apresentou os mais altos níveis de transcritos, dentre as ferroportinas de arroz, na condição de deficiência de Fe. Estes resultados sugerem fortemente que *OsFPN1* e *OsMARL1a* tem expressão regulada pelos níveis de Fe na planta, assim como *AtFPN2* e *AtMARI*, embora de forma e em órgãos diferentes (Schaaf et al., 2006; Morrissey et al., 2009; Conte et al., 2009). No tratamento com excesso de Ni, *OsFPN1* e *OsMARL1a* apresentaram níveis elevados de transcritos em parte aérea, e *OsMARL1b* em raízes. Estes resultados sugerem que o Ni pode estar induzindo indiretamente uma resposta característica de deficiência de Fe, e um possível papel das ferroportinas de arroz na detoxificação do Ni.

Considerando todos os resultados de análise de expressão, é possível sugerir que os genes de ferroportina de arroz são regulados de formas distintas em plantas jovens e durante o desenvolvimento reprodutivo. *OsMARL2* parece ter sido originado por um evento de duplicação do gene *OsMARL1*, de acordo com uma análise superficial da estrutura dos genes (Fig. 1, capítulo 1), e pode estar passando por um evento de perda de função ou de aquisição de uma nova função, pois seu padrão de expressão mostrou-se bastante diferente do apresentado por *OsMARL1*. Mais estudos para entender a evolução e possíveis papéis de cada gene são necessários.

As análises funcionais das ferroportinas de arroz realizadas mostraram que *OsMARL1 full-length* quando transformado nas leveduras mutantes defectivas para o transporte de Fe pela membrana mitocondrial (*Δmrs3Δmrs4*) e de Fe (*fet3fet4*), Zn (*zrt1zrt2*) e Mn (*smf1*) pela membrana plasmática, não apresentou nenhum incremento no crescimento comparado às linhagens mutantes transformadas com o vetor vazio. Não foi possível observar a proteína de fusão OsMARL1-GFP quando expressa em leveduras. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento não permitem inferir uma possível função da proteína OsMARL1 no transporte de metais, nem confirmar a previsão de localização cloroplastídica.

As análises funcionais de *OsFPN1 non-stop* mostraram que OsFPN1-GFP resgata o fenótipo de *Δccc1* para o transporte de Fe vacuolar, indicando que OsFPN1 pode transportar Fe quando expressa em leveduras. A proteína localiza-se no vacúolo quando expressa em leveduras. Assim, sugere-se que o gene *OsFPN1* é candidato a gene ortólogo de *AtFPN2* (Morrissey et al.,



2009). Testes utilizando um vetor de expressão constitutiva em leveduras estão previstos para o futuro.

Os ensaios de expressão transiente para localização das proteínas OsMARL1 e OsFPN1 em protoplastos de *Arabidopsis* não tiveram resultados positivos até o momento, utilizando o vetor pART7. O protocolo de extração de protoplastos foi bem sucedido, resultando em células viáveis após o evento de transformação, mas não foram observadas células expressando OsMARL1-YFP ou OsFPN1-YFP. Novos testes de localização serão realizados, utilizando os vetores de expressão em plantas pEarleyGate 101 (YFP) e 103 (GFP) da tecnologia Gateway (Invitrogen), já utilizados com sucesso por outros membros do grupo.

As plantas de *Arabidopsis* mutantes *fpn1-2*, *fpn2-2* e o duplo-mutante *fpn1fpn2* foram transformadas com a construção *OsFPN1 full-length* utilizando o vetor de expressão em plantas pMDC32 da tecnologia Gateway (Invitrogen). As plantas estão em fase de maturação das sementes, e serão coletadas no final do mês de julho de 2013. Se forem obtidas plantas transformantes, estas terão as plantas T2 testadas quanto ao resgate do fenótipo selvagem, quando expostas a concentrações de metais consideradas tóxicas para os mutantes. Os resultados de complementação dos mutantes de *Arabidopsis*, assim como a análise dos mutantes *Osmarl1* de arroz, compreendem passos importantes para a caracterização funcional das ferroportinas de arroz e podem contribuir de forma efetiva para a caracterização do papel das ferroportinas no transporte de metais.

O trabalho realizado permite concluir que plantas de arroz possuem três genes semelhantes a ferroportinas de *Arabidopsis* *OsFPN1*, *OsMARL1* e *OsMARL2*. Com base nos resultados obtidos até o momento, sugire-se que a proteína OsFPN1 é um transportador vacuolar de Fe, tem expressão regulada pelos níveis de Fe na planta e pode participar da detoxificação de metais tóxicos em eventos de deficiência de Fe. OsMARL1 é um transportador de Fe localizado na membrana do cloroplasto e tem expressão regulada pelos níveis de Fe na planta. OsMARL2 é uma proteína de mitocôndria, não tem regulação por Fe e parece ser um gene gerado por um evento de duplicação do gene *OsMARL1* e estar passando por uma subfuncionalização. A conclusão dos experimentos em andamento e a realização de novos experimentos são necessárias para que tais hipóteses sejam adequadamente testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arrivault, S.; Senger, T.; Krämer, U. (2006) The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*, 46: 861-879.

Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Nishizawa, N.K. (2010) Iron Uptake and Loading into Rice Grains. *Rice* 3: 122-130

Baxter, I.; Ouzzani M.; Orcun, S.; Kennedy, B.; Jandhyla S.S.; Salt, D.E. (2007) Purdue ionomics information management system. An integrated functional genomics platform. *Plant Physiology*, 143: 600-611.

Cakmak, I.; Pfeiffer, W.H.; McClafferty, B. (2010) Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry* 87: 10-20.

Colangelo, E.P.; Guerinot, M.L. (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *The Plant Cell*, 16: 3400-3412.

Connolly, E.; Fett, J.P.; Guerinot, M.L. (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *The Plant Cell*, 14: 1347-1357.

Conte, S.; Stevenson, D.; Furner, I.; Lloyd, A. (2009) Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiology*, 151: 559-573.

Curie, C.; Alonso, J.M.; Le Jean, M.; Ecker, J.R.; Briat, J-F. (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*, 347: 749-755.

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

Curie, C.; Cassin, G.; Couch, D.; Divol, F.; Higuchi, K.; Le Jean, M.; Misson, J.; Schikora, A.; Czernic, P.; Mari, S. (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, 103: 1-11.

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. *PNAS*, 93: 5624-5628.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2010) Statistical databases. Disponível na Internet: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-trade/en/>

Fleming, R.E.; Sly, W.S. (2001) Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function, gain in understanding. *Journal of Clinical Investigation*, 108: 521-522.

Ganz, T. (2005) Cellular iron: Ferroportin is the only way out. *Cell Metabolism*, 1: 155-157.

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

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

Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1645: 190-198.

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

Haydon, M.J.; Cobbett, C.S. (2007) A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143: 1705-1719.

Hotz, C.; Brown, K.H. (2004) Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin*, 25: S99-203. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG).

Hussain, D.; Haydon, M.J.; Wang, Y.; Wong, E.; Sherson, S.M.; Young, J.; Camakaris, J.; Harper, J.F.; Cobbett, C.S. (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16, 1327-1339.

IBGE (2010) <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm> (acesso em junho de 2013).

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. *The Journal of biological chemistry*, 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.; Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2005) OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *Journal of Experimental Botany*, 56: 3207-3214.

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

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 <sup>65</sup>Zn after flowering in aerobic rice. *Annals of Applied Biology*, 150: 383-391

Kanai, M.; Hirai, M.; Yoshiba, M.; Tadano, T.; Higuchi, K. (2009) Iron deficiency causes zinc excess in *Zea mays*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55: 271-276.

Kennedy, G.; Burlingame, B.; Nguu Nguyen (2002) Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. *International Rice Commission Newsletter*, 51: 33-42.

Korshunova, Y.O.; Eide, D.; Clark, W.G.; Guerinot, M.L.; Pakrasi, H.B. (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*, 40: 37-44.

Lee, S.; Chiecko, J.C.; Kim, S.A.; Walker, E.L.; Lee, Y.; Guerinot, M.L.; An, G. (2009) Disruption of *OsYSL15* leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiology*, 150: 786-800.

Masuda, H.; Ishimaru, Y.; Aung, M.S.; Kobayashi, T.; Kakei, Y.; Takahashi, M.; Higuchi, K.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. (2012) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Scientific Reports*, 2: 543.

Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd Edition. Academic Press, Boston, 674 p.

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

Morrissey, J.; Baxter, I.R.; Lee, J.; Li, L.; Lahner, B.; Grotz, N.; Kaplan, J.; Salt, D.E.; Guerinot, M.L. (2009) The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3326-3338.

Muckenthaler, M.U.; Galy, B.; Hentze, M.W. (2008) Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/ iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual Reviews of Nutrition*, 28: 197-213.

Murata, Y.; Ma, J.F.; Yamaji, N.; Ueno, D.; Nomoto, K.; Iwashita, T. (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *The Plant Journal*, 46: 563-572.

Nakanishi, H.; Ogawa, I.; Ishimaru, Y.; Mori, S.; Nishizawa, N.K. (2006) Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe<sup>2+</sup> transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52: 464-469.

- Paine, J.A.; Shipton, C.A.; Chaggar S.; Howells, R.M.; Kennedy, M.J.; Vernon, G.; Wright, S.Y.; Hinchliffe, E.; Adams, J.L.; Silverstone, A.L.; Drake, R. (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology*, 23: 482-487.
- Palmer, C.M.; Guerinot, M.L. (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology*, 5: 333-340.
- 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.
- Pedas, P.; Ytting, C.K.; Fuglsang, A.T.; Jahn, T.P.; Schjoerring, J.K.; Husted, S. (2008) Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiology*, 148: 455-466.
- Römheld, V.; Marchner, H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80: 175-180.
- Schaaf, G.; Ludewig, U.; Erenoglu, B.E.; Mori, S.; Kitahara, T.; von Wiren, N. (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 9091-9096.
- Schaaf, G.; Honsbein, A.; Meda, A.R.; Krichner, S.; Wipf, D.; von Wiren, N. (2006) *AtIREG2* encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 25532-25540.
- Sperotto, R.A.; Vasconcelos, M.W., Grusak M.A., Fett, J.P. (2012a) Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*, 5:27.
- Sperotto, R.A.; Ricachenevsky, F.K.; Waldow, V.A.; Fett, J.P. (2012b) Iron biofortification in rice: It's a long way to the top, *Plant Science*, 190: 24- 39.
- Theil, E.C. (2004) Iron, ferritin and nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 24: 327-343.

UNICEF (2010) [www.unicef.org/nutrition/index\\_iodine.html](http://www.unicef.org/nutrition/index_iodine.html) (acesso em junho de 2013).

van der Zaal, B.J.; Neuteboom, L.W.; Pinas, J.E.; Chardonens, A.N.; Schat, H.; Verkleij, J.A.C.; Hooykaas, P.J.J. (1999) Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*, 119: 1047-1055.

Vert, G.; Grotz, N.; Dédaldéchamp, 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. *The Plant Cell*, 14: 1223-1233.

White, P.J.; Broadley, M.R. (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49-84.

Wolt, J.D; Keese, P.; Raybould, A.; Fitzpatrick, J.W.; Burachik, M.; Gray, A.; Olin, S.S.; Schiemann, J.; Sears, M.; Wu, F. (2010) Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic Research*, 19:425-436.

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

Yuan, L.; Wu, L.; Yang, C.; Lv, Q. (2012) Effects of iron and zinc foliar applications on rice plants and their grain accumulation and grain nutritional quality. *Journal of the science of food and agriculture*, 93: 254-261.

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

## *CURRICULUM VITAE*

### **KARINA LETÍCIA LOPES**

Nascimento: 12/09/1984 - Porto Alegre/RS - Brasil

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências  
Av. Bento Gonçalves, 9500, Instituto de Biociências, Dep. de Botânica, Lab. de Fisiologia  
Vegetal, Bairro Agronomia, CEP: 91501970 - Porto Alegre/ RS - Brasil

Telefone: 51 33087637

E-mail: karinallopes\_poa@yahoo.com.br

### FORMAÇÃO

2011 - 2013 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Identificação e Caracterização de Genes que Codificam Ferroportinas em Plantas de Arroz (*Oryza sativa* L.)

Orientador: Janette Palma Fett

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2006 - 2011 Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

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

Orientador: Janette Palma Fett

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

2002 - 2006 Ensino Profissional de nível técnico em Controle e Monitoramento Ambiental.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Bolsista da Fundação de Apoio à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAURGS)

### ESTÁGIOS

11/2002 - 07/2004 Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFRGS

Cargo: Estagiária Administrativa

Responsável: Bernadete Neckel

Bolsa: SAE (Secretaria de Assuntos Estudantis da UFRGS)

Principais atividades: Atendimento ao telefone, atendimento ao público, arquivamento, agendamento de reuniões, elaboração de ofícios, auxílio em eventos, fotocópias, controle de almoxarifado, análise de processos.



08/2004 - 07/2007 Laboratório de Ecotoxicologia da UFRGS - Departamento de Ecologia

Cargo: Bolsista Técnica Ambiental

Responsável: Alexandre Arenzon

Bolsa: FAURGS

Principais atividades: Cultivo e manutenção de peixes exóticos (*Pimephales promelas*) utilizados em ensaios de toxicidade; e realização de ensaios de sensibilidade e toxicológicos de amostras ambientais com peixes.

03/2008 - 07/2011 Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS - Departamento de Botânica

Cargo: Bolsista de Iniciação Científica

Responsável: Janette Palma Fett

Bolsa: FAPERGS

Principais atividades: Montagem de experimentos com plantas de arroz (*Oryza sativa*), preparação de soluções nutritivas para crescimento de plantas, extração de RNA e DNA, síntese de cDNA, análise da expressão de genes por RT-qPCR, preparação e análise de amostras por eletroforese em gel de agarose e transformação de bactérias e leveduras para análise funcional de genes de arroz.

02/2011 - 08/2011 Gerência de Segurança, Meio Ambiente e Saúde da Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP S/A) - Coordenação de Meio Ambiente

Cargo: Estagiária de Graduação em Biologia

Responsável: Adelaide Tinoco Essinger

Bolsa: REFAP S/A

Principais atividades: elaboração de apresentações de PowerPoint sobre assuntos relacionados ao meio ambiente; atualização de planilha e pasta de Licenças de Operação; leitura e revisão de relatórios de serviços contratados pela coordenação; auxílio na elaboração de relatórios FEPAM; auxílio na revisão e elaboração de procedimentos específicos (PEs); compilação dos dados atmosféricos e geração de gráficos de emissões; auxílio na organização e digitação dos documentos enviados à ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis); atualização do banco de dados de análises de efluentes e águas superficiais.

### ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Ricachenevsky, F.K.; Sperotto, R.A.; Menguer, P.K.; Sperb, E.R.; **Lopes, K.L.**; Fett, J.P. Zinc-induced facilitator-like family in plants: lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs, BMC Plant Biol. 11 (2011) 20.

Sperotto, R.A.; Ricachenevsky, F.K.; Duarte, G.L.; Boff, T.; **Lopes, K.L.**; Sperb, E.R.; Grusak, M.A.; Fett, J.P. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, 230 (2009).985 - 1002.

#### TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (COMPLETO)

Menguer, P.K.; Ricachenevsky, F.K.; **Lopes, K.L.**; Santos, L.S.; Sperotto, R.A.; Fett, J.P. Differential regulation of two putative rice vacuolar iron transporter genes (OsVIT1 and OsVIT2) In: 8th International Symposium on Rice Functional Genomic, 2010, Bento Gonçalves.

Santos, L.S.; Menguer, P.K.; Ricachenevsky, F.K.; **Lopes, K.L.**; Sperotto, R.A.; Fett, J.P. Expression analysis of the vacuolar metal transporter OsNRAMP7 In: 8th International Symposium on Rice Functional Genomic, 2010, Bento Gonçalves.

Duarte, G.L.; Sperb, E.R.; **Lopes, K.L.**; Sperotto, R.A.; Boff, T.; Fett, J.P. Expression analysis of iron homeostasis related genes in rice YSL15 mutant plants In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de plantas, 2009, Búzios.

Sperotto, R.A.; Ricachenevsky, F.K.; Duarte, G.L.; Boff, T.; **Lopes, K.L.**; Sperb, E.R.; Grusak, M.A.; Fett, J.P. Rice grain filling: identification of novel induced genes and characterization of OsNAC5 In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Búzios.

#### TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

Ricachenevsky, F.K.; Sperotto, R.A.; Menguer, P.K.; Sperb, E.R.; **Lopes, K.L.**; Fett, J.P. ZINC-INDUCED FACILITATOR-LIKE family in plants: lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs In: III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011, Ilhéus.

Sperb, E.R.; Ricachenevsky, F.K.; Sperotto, R.A.; **Lopes, K.L.**; Fett, J.P. Identificação e análise de genes da família ZIF-LIKE em plantas de arroz (*Oryza sativa*) In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

Sperb, E.R.; Duarte, G.L.; Sperotto, R.A.; **Lopes, K.L.**; Boff, T.; Fett, J.P. Correlação entre expressão do gene OsNAC5 com a concentração de ferro, zinco e proteínas no grão de arroz In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.

## APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

**Lopes, K.L.;** Ricachenevsky, F.K.; Menguer, P.K.; Fett, J.P. Estudo e caracterização das ferroportinas de arroz (*Oryza sativa*) – Resultados In. Encontro Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre.

**Lopes, K.L.;** Fett, J.P. Estudo e caracterização das ferroportinas de arroz (*Oryza sativa*) - Projeto, In. Encontro Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.

**Lopes, K.L.;** Menguer, P.K.; Ricachenevsky, F.K.; Fett, J.P. Análise da expressão dos genes da Família VIT em plantas de arroz (*Oryza sativa*), In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2010, Porto Alegre.

**Lopes, K.L.;** Ricachenevsky, F.K.; Sperotto, R.A.; Sperb, E.R.; Fett, J.P. Busca e análise de expressão de genes da família SNAC (stress-responsive NACs) em plantas de arroz (*Oryza sativa*), In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

**Lopes, K.L.;** Sperotto, R.A.; Duarte, G.L.; Sperb, E.R.; Ricachenevsky, F.K.; Boff, T.; Fett, J.P. Possível função do gene OsNAC5 em processos de senescência em plantas de arroz (*Oryza sativa*), In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.