

RS - IBIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Análise de linhagens mutantes por inserção do
retrotransposon *Tos17* em genes da família ZIP em arroz
(*Oryza sativa* L.)**

Vinicius de Abreu Waldow

Trabalho apresentado como um dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Janette Palma Fett

Porto Alegre, dezembro de 2007

BIO
BIO
401

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

The truth may be puzzling. It may take some work to grapple with. It may be counterintuitive. It may contradict deeply held prejudices. It may not be consonant with what we desperately want to be true. But our preferences do not determine what's true.

Carl Sagan

If you want to do evil, science provides the most powerful weapons to do evil; but equally, if you want to do good, science puts into your hands the most powerful tools to do so. The trick is to want the right things, then science will provide you with the most effective methods of achieving them.

Richard Dawkins

I'd take the awe of understanding over the awe of ignorance any day.

Douglas Adams

AGRADECIMENTOS

À professora Janette Fett.

A todos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial o Ricardo, o Guilherme, a Marta, o Raul, a Tatiana e o Júlio.

Aos professores Giancarlo Pasquali e Luciane Passaglia, por terem aceito o convite de participar da Banca Examinadora.

À equipe do professor Johnny Ferraz Dias do Laboratório de Implantação Iônica, IF – UFRGS, em especial a Liana Boufleur e a Carla Santos, pela ajuda com o PIXE.

À equipe do pesquisador Sérgio Gindri Lopes, do IRGA, Cachoeirinha – RS.

A todos os amigos.

À minha família, em especial a minha mãe e os meus avós Percy e Eloah.

RESUMO

O zinco (Zn) é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, e a sua deficiência prejudica diversas funções metabólicas e reduz o crescimento. O Zn também é um micronutriente essencial para os humanos, e alimentos produzidos a partir de plantas com baixo teor de Zn podem causar a deficiência desse elemento em humanos. A deficiência de Zn é provavelmente a deficiência mineral mais comum em cereais, em particular no arroz e no trigo. Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na homeostase de Zn deverá auxiliar na produção de linhagens mais eficientes na captura e transporte desse metal. Diversos genes relacionados com a homeostase do Zn já foram identificados no genoma de arroz (*Oryza sativa* L.). Entre eles, onze genes da família ZIP (*Zinc regulated transporter / Iron regulated transporter Protein*). A fim de desvendar a função *in vivo* desses genes, foram realizadas buscas no banco de mutantes do Rice Genome Resource Center (www.rgrc.dna.affrc.go.jp). Quatro linhagens mutantes por inserção do retrotransposon *Tos17* foram encontradas: *OsZIP2* (NG2551), *OsZIP3* (NE0018), *OsZIP4* (NE1520) e *OsZIP7* (ND7016). Para obtenção de linhagens homozigotas, sementes obtidas do banco foram germinadas e o DNA genômico foi extraído. A identificação de linhagens homozigotas foi feita por PCR com uso de três pares de *primers*: dois deles complementares a regiões genômicas próximas à inserção, e um complementar à cauda 3' do retroelemento *Tos17*. Homozigotos foram identificados para todas linhagens, exceto para a linhagem NG2551. Essas plantas foram crescidas em casa de vegetação para obtenção de sementes. Visando verificar se a inserção do *Tos17* afeta a transcrição dos genes interrompidos, plantas homozigotas foram submetidas à ausência de Zn e tiveram RNA extraído. De fato, o nível de transcritos foi reduzido pela inserção, como se observou por qPCR. A taxa de germinação de sementes do tipo selvagem e das três linhagens mutantes foi avaliada, e somente a linhagem NE0018 apresentou uma redução na taxa de germinação. Plantas do tipo selvagem e homozigotas das três linhagens mutantes foram crescidas sob três concentrações diferentes de Zn (0,02; 0,2; e 2 μ M) e tiveram determinadas as concentrações de Zn, Fe, Cu e Mn.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Zinco na nutrição vegetal	1
1.2. Deficiência de zinco em plantas	2
1.3. Zinco na nutrição humana	3
1.4. Arroz	3
1.5. Captura de zinco pelas plantas	5
1.6. Família ZIP	6
2. OBJETIVO	9
2.1. Objetivos específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Busca e obtenção de linhagens mutantes	10
3.2. Identificação de plantas homozigotas	10
3.3. Extração de RNA e síntese de cDNA	13
3.4. qPCR	13
3.5. Taxa de germinação	14
3.6. Concentração de cátions divalentes	14
3.7. Análise estatística	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Obtenção de linhagens mutantes	16
4.2. Identificação de plantas homozigotas	16
4.3. Análise da expressão dos genes interrompidos	18
4.4. Taxa de germinação	19
4.5. Concentração de cátions divalentes	20
5. DISCUSSÃO	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. O zinco na nutrição vegetal

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

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

As funções metabólicas do Zn são baseadas na sua forte tendência em formar complexos tetraédricos com ligantes N, O e especialmente S. Três sítios primários de ligação para o Zn⁺² em proteínas são reconhecidos: estrutural, catalítico e cocatalítico (Maret, 2005). Os sítios estruturais servem para o Zn garantir o dobramento correto da proteína. Nos sítios catalíticos, o Zn está diretamente envolvido na função catalítica da enzima. Em sítios cocatalíticos, o Zn pode ser utilizado para funções catalíticas, regulatórias e estruturais. Mais de setenta metaloproteínas contendo Zn já foram identificadas (Barak & Helmke, 1993), entre elas: álcool desidrogenase, anidrase carbônica,

CuZn-superóxido dismutase, fosfatase alcalina, fosfolipase, carboxipeptidase e RNA polimerase.

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

1.2. Deficiência de zinco em plantas

Quando o suprimento de Zn disponível para a planta é inadequado (deficiência de Zn), uma ou mais das importantes funções fisiológicas do Zn é incapaz de operar normalmente e o crescimento da planta é prejudicado (Alloway, 2004). As mudanças no metabolismo causadas pela deficiência de Zn são complexas, mas algumas dessas mudanças são típicas e podem ser relativamente bem explicadas pelas funções do Zn em reações enzimáticas específicas (Marschner, 1995).

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

1.3. Zinco na nutrição humana

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

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

1.4. Arroz

A deficiência de Zn é uma das deficiências nutricionais mais comuns em plantas utilizadas na alimentação humana, especialmente em cereais (Marschner, 1995). E entre os

cereais, o arroz e o trigo são particularmente suscetíveis a essa deficiência (Cakmak *et al.*, 1998).

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

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11,1 milhões de toneladas por ano para um consumo de 11,7 milhões de toneladas. Cerca de metade da produção nacional é originária das lavouras de arroz irrigado no Rio Grande do Sul: 5,8 milhões de toneladas por ano, o que equivale à cerca de 50% da produção total brasileira e 3,1% do Produto Interno Bruto (Menezes *et al.*, 2004).

Uma estratégia possível para resolver o problema da deficiência de Zn é a aplicação de fertilizantes no solo. Contudo, essa é uma abordagem ineficiente a longo prazo do ponto de vista econômico e ambiental. Isso se deve ao fato de apenas 20% do Zn aplicado se tornar disponível para captura e o restante terminar por ser adsorvido no solo (Singh *et al.*, 2005).

Uma abordagem alternativa consiste na biofortificação de cereais, de modo a torná-los mais eficientes em capturar o Zn, utilizá-lo para seu crescimento e alocá-lo para as partes consumidas pelos humanos. A produção dessas linhagens pode ser alcançada por cruzamento, utilizando a variabilidade genética já existente, ou por engenharia genética. Os

dois métodos irão se beneficiar de uma melhor compreensão dos processos fisiológicos envolvidos na homeostase do Zn. Progresso considerável já foi feito na identificação de mecanismos que diferentes espécies e genótipos possuem para a eficiente captura de Zn a partir de solos deficientes (Singh *et al.*, 2005).

1.5. Captura de zinco pelas plantas

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

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

ligar-se não só ao Fe^{+3} , como também efetivamente quelam o Zn^{+2} (e também Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2}) (Buchanan *et al.*, 2000).

1.6. Família ZIP

O genoma completo do arroz já foi seqüenciado, e vários genes de função desconhecida foram revelados por meio da análise em larga escala de etiquetas de seqüências expressas (IRGS, 2005). Dentre esses genes putativos, vários foram relacionados à homeostase do Zn por homologia com genes de outras espécies já caracterizados (Gross *et al.*, 2003).

Onze genes da família ZIP foram encontrados pelo nosso grupo no genoma do arroz (Gross *et al.*, 2003). Essa família deriva seu nome dos primeiros membros identificados: *ZRT*, *IRT-like Protein*. O gene *IRT1* (*iron-regulated transporter*) codifica um transportador de cátions expresso em raiz de *Arabidopsis thaliana* submetido à deficiência de Fe (Eide *et al.*, 1996), e *ZRT1* e *ZRT2* (*zinc-regulated transporter*) são respectivamente transportadores de alta e baixa afinidade em leveduras (Zhao & Eide, 1996a; 1996b). Membros dessa família de transportadores de Zn e Fe já foram encontrados em plantas, bactérias, fungos e humanos (Gaither & Eide, 2001).

Prevê-se que a maioria das proteínas ZIP tem oito domínios transmembrana, e as extremidades carboxi e aminoterminais localizadas no exterior da membrana plasmática (Fig. 1). Também é estimado que as proteínas ZIP tenham entre 300 e 500 aminoácidos, e essa variação se deve em grande parte à região de tamanho variável entre os domínios transmembrana 3 e 4 (Guerinot, 2000).

A função dos genes ZIP é o transporte de cátions através de membranas, em particular o Fe^{+2} e o Zn^{+2} . Contudo, já foi observado que alguns desses genes também são

capazes de transportar outros cátions, tais como Cd^{+2} , Cu^{+2} e Mn^{+2} (Guerinot, 2000). A função exata de vários genes dessa família já foi caracterizada em bactérias, leveduras, humanos e plantas. Em plantas, os transportadores ZIP foram descritos principalmente em dicotiledôneas, incluindo *Arabidopsis thaliana* e *Thlaspi caerulescens* (Grotz *et al.*, 1998; Pence *et al.*, 2000).

Em arroz, Ramesh *et al.* (2003) já confirmaram os genes *OsZIP1* e *OsZIP3* como transportadores de Zn por testes de complementação de leveduras mutantes. Esse mesmo trabalho detectou a expressão desses dois genes em raízes e partes aéreas após 96 horas sob ausência de Zn. O gene *OsZIP2* além de não complementar a levedura mutante, também apresentou níveis muito baixos de transcrição.

Ishimaru *et al.* (2005) também conseguiram caracterizar o gene *OsZIP4* como transportador de Zn por complementação de leveduras mutantes. *OsZIP4* também é expresso em raízes e partes aéreas e é induzido em deficiência de Zn. *OsZIP5* e *OsZIP7* foram induzidos por deficiência de Zn em raízes e partes aéreas respectivamente. Contudo, os autores não conseguiram replicar os resultados de Ramesh *et al.* (2003), pois não foi detectada a indução da expressão de *OsZIP1* e *OsZIP3* por deficiência de Zn.

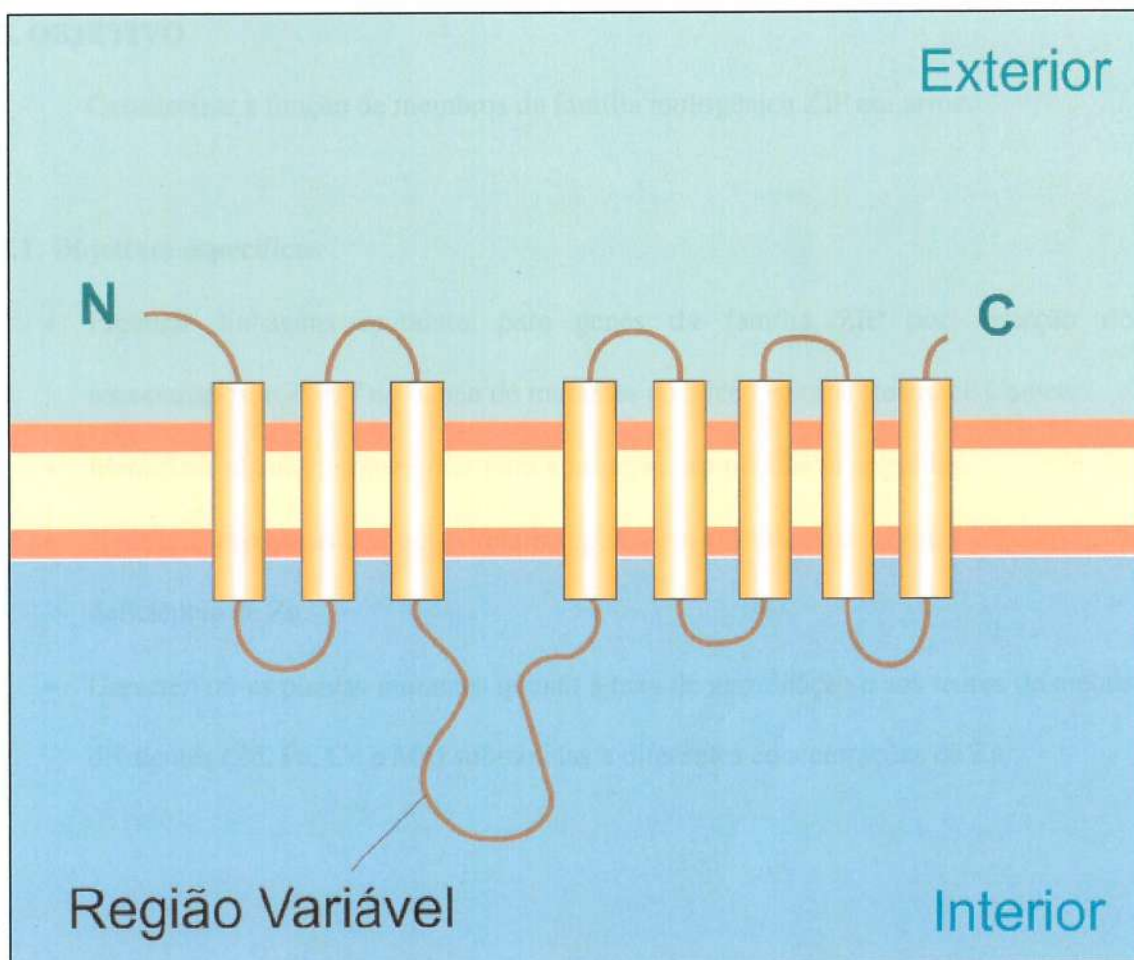


Figura 1 – Topologia provável de um membro da família ZIP. Prevê-se que as proteínas da família ZIP tenham oito domínios transmembrana, e uma região variável entre os domínios transmembrana 3 e 4 (adaptado de Guerinot, 2000).

2. OBJETIVO

Caracterizar a função de membros da família multigênica ZIP em arroz.

2.1. Objetivos específicos

- Procurar linhagens mutantes para genes da família ZIP por inserção do retrotransposon *Tos17* no banco de mutantes do Rice Genome Resource Center.
- Identificar plantas homozigotas para a inserção em plantas segregantes.
- Avaliar a expressão dos genes interrompidos em plantas homozigotas submetidas à deficiência de Zn.
- Caracterizar as plantas mutantes quanto à taxa de germinação e aos teores de metais divalentes (Zn, Fe, Cu e Mn) submetidas a diferentes concentrações de Zn.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Busca e obtenção de linhagens mutantes

As seqüências genômicas dos genes putativos da família ZIP identificados por Gross *et al.* (2003) em arroz foram utilizadas como seqüências *query* para buscas no banco de mutantes por inserção do retrotransposon *Tos17* do Rice Genome Resource Center – RGRC (www.rgrc.dna.affrc.go.jp), utilizando-se a ferramenta BLAST. A fim de determinar o local da inserção do *Tos17* em cada gene interrompido, a seqüência genômica, a seqüência do cDNA e a seqüência flanqueadora da inserção foram alinhadas com o programa DIALIGN (Morgenstern *et al.*, 1998). Sementes para as linhagens encontradas foram solicitadas junto ao RGRC.

3.2. Identificação de plantas homozigotas

As sementes de arroz (*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare) obtidas do banco de mutantes e do tipo selvagem foram submetidas ao seguinte processo de assepsia: lavagem com água e detergente neutro, quinze minutos em hipoclorito de sódio 2,5%, cinco minutos em etanol 70% e três lavagens de dez minutos em água destilada. As sementes foram então distribuídas em placas de Petri com papel filtro embebido em 5 ml de água destilada. Essas placas foram mantidas por uma semana em uma câmara de germinação a 28°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro. As sementes germinadas foram transferidas para solo e regadas com água destilada conforme necessário (Fig. 2A). Folhas dessas plantas foram coletadas após três semanas e armazenadas a -20°C.

O DNA genômico foi extraído das folhas pelo método de SDS (Dellaporta *et al.*, 1983). A integridade do extrato de DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de

agarose (1%). A identificação de linhagens homozigotas foi feita através de uma estratégia baseada em PCR com três *primers* (Miyao *et al.*, 1998): dois deles complementares a regiões genômicas próximas à inserção, e um complementar à cauda 3' do retroelemento Tos17. Dois amplicons poderão resultar dessa reação: um de tamanho maior na ausência da inserção do *Tos17*, e um de tamanho menor na presença da inserção (Fig. 2C). Desse modo, plantas sem a inserção deverão apresentar somente a banda relativa ao amplicon maior, plantas heterozigotas deverão apresentar as duas bandas e plantas homozigotas para a inserção deverão apresentar somente a banda relativa ao amplicon menor.

Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%). As plantas identificadas como homozigotas para a inserção do *Tos17* foram transferidas para casa de vegetação no Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) em Cachoeirinha, RS (Fig. 2B). As sementes produzidas por essas plantas foram coletadas para utilização nos experimentos subsequentes.

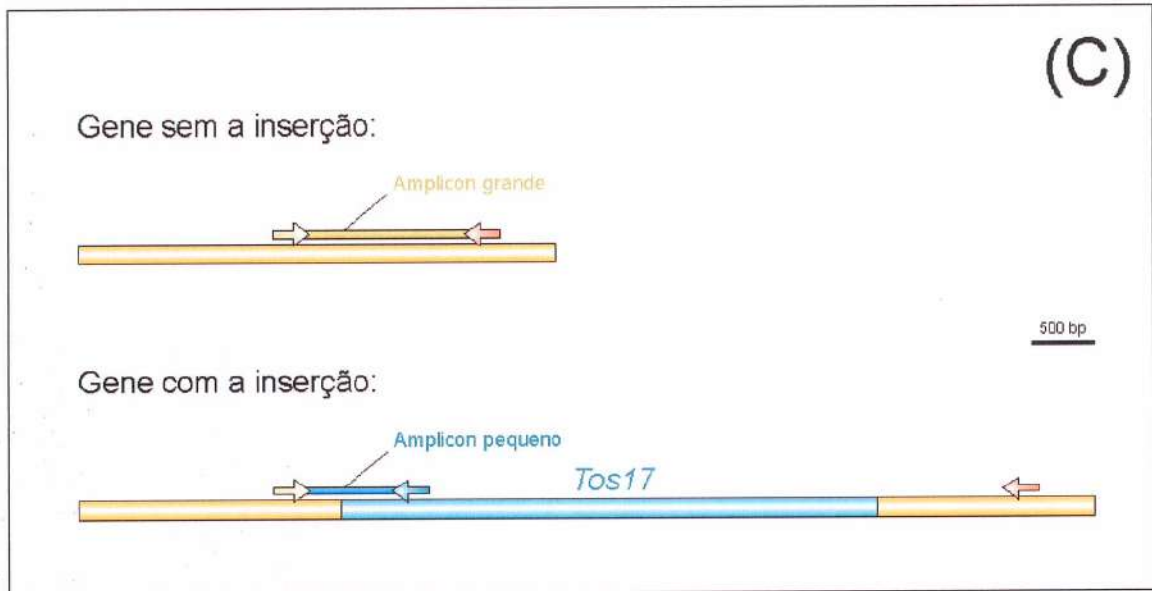


Figura 2 – (A) Plantas crescidas em solo para posterior extração de DNA e genotipagem. (B) Plantas crescidas em casa de vegetação para produção de sementes. (C) Esquema ilustrativo dos possíveis amplicons sintetizados na reação para genotipagem.

3.3. Extração de RNA e síntese de cDNA

Sementes homozigotas para a inserção do *Tos17* e sementes do tipo selvagem foram submetidas ao processo de assepsia e germinadas sob as condições descritas anteriormente. As plântulas foram então transferidas para potes plásticos contendo 600 ml de solução nutritiva (Yoshida *et al.*, 1972) por 15 dias. Após esse período, as plantas foram submetidas à mesma solução nutritiva sem Zn por 7 dias. Folhas e raízes (n = 3, amostras compostas por quatro indivíduos) foram coletadas ao final do tratamento e armazenadas a -80°C.

O RNA total foi extraído das raízes com TRIzol[®] (Invitrogen) e quantificado com o fluorímetro Qubit[™] (Invitrogen). Então, 1 µg de RNA de cada replicata foi tratado com DNase I (Invitrogen) para remoção de qualquer DNA genômico contaminante. O cDNA foi sintetizado com a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e com *primer* Oligo-dT, e posteriormente utilizados para qPCR.

3.4. qPCR

As reações foram realizadas com *primers* específicos para os genes *OsZIP3* (5'-GCATAGATCTTCAGAATAACAGAGGA-3'; 5'-TCACCTGAGATAAGCTTTGGTTT-3'), *OsZIP4* (5'-GATTCTTGGGCAAATGGTGT-3'; 5'-ACAACGCTGGGGATTATTTG-3'), *OsZIP7* (5'-TGCACAACAACGCATACAGA-3'; 5'-TCAGCCAACAACACTCTCCA-3') e o gene de referência *OsUBQ* (Miki *et al.*, 2005).

As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green (Invitrogen) com o aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems). O programa SDS System (Applied Biosystems) foi utilizado para análise dos dados. A eficiência de PCR foi calculada como descrito por Ramakers *et al.* (2003), e a expressão relativa foi obtida através do método conforme em Desbrosses-Fonrouge *et al.* (2005).

3.5. Taxa de germinação

Oitenta sementes de cada genótipo foram submetidas ao processo de assepsia e distribuídas igualmente em quatro placas de Petri com papel filtro embebido em 5 ml de água destilada. Após um período de sete dias, verificou-se o número de sementes que havia emitido radícula e hipocótilo.

3.6. Concentração de cátions divalentes

Sementes foram submetidas ao processo de assepsia e germinadas conforme descrito anteriormente. As plantas foram adaptadas à solução nutritiva (Yoshida *et al.*, 1972) por 15 dias e submetidas por 40 dias à mesma solução nutritiva com três concentrações diferentes de Zn: 2 μM ; 0,2 μM ; e 0,02 μM (Fig. 3). Após esse período, raízes e folhas foram coletadas ($n = 3$, amostras compostas por quatro indivíduos) e armazenadas em estufa a 60°C para secagem. Essas amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e pastilhadas sob uma pressão de 3,5 t. Os teores de Zn e outros nutrientes foram quantificados por PIXE (*Particle-Induced X-Ray Emission*) no Laboratório de Implantação Iônica, Instituto de Física, UFRGS.

A técnica de PIXE baseia-se no bombardeamento das amostras com partículas carregadas (Campbell *et al.*, 1995). Conforme essas partículas carregadas atravessam a amostra, elas perdem energia principalmente ao excitar elétrons dos átomos pelos quais ela atravessa. Os elétrons de camadas internas da eletrosfera recebem energia suficiente para serem ejetados, o que resulta numa configuração eletrônica instável. Então, os elétrons de camadas externas 'caem' de modo a preencher essas vagas, e ao fazê-lo, liberam o excesso de energia na forma de raios X. As energias desses raios X são características do elemento,

e portanto podem ser usadas para identificar a composição elemental da amostra. Além disso, ao medir a intensidade das linhas de raios X características, também é possível determinar a concentração da maioria dos elementos a partir de aproximadamente 1 ppm (parte por milhão).

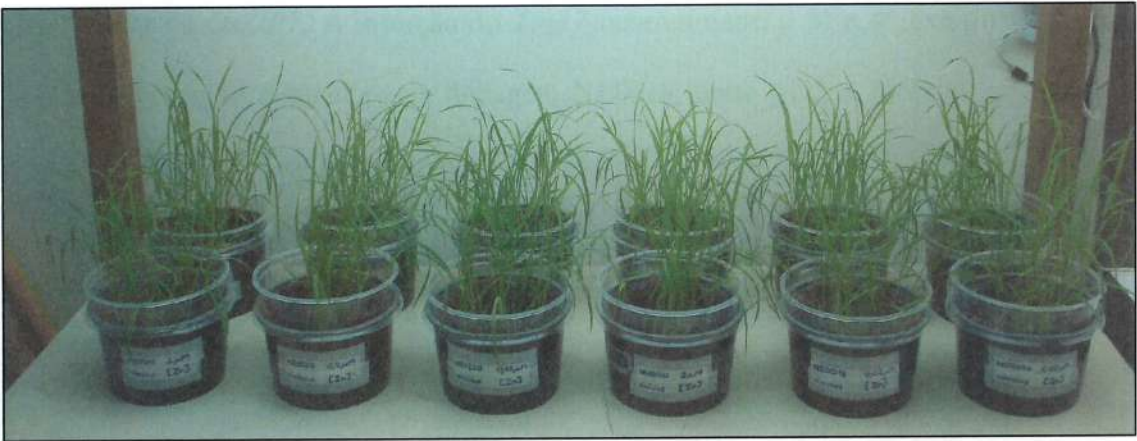


Figura 3 – Plantas homozigotas das três linhagens mutantes e plantas do tipo selvagem submetidas a diferentes concentrações de Zn.

3.7. Análise estatística

As médias obtidas foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Duncan, conforme Quinn & Keough (2002). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de linhagens mutantes

Quatro linhagens mutantes por inserção do retrotransposon *Tos17* foram encontradas no banco: NG2551 para *OsZIP2*, NE0018 para *OsZIP3*, NE1520 para *OsZIP4* e ND7016 para *OsZIP7*. A inserção do *Tos17* ocorreu entre o 3° e 4° éxon na linhagem NG2551, na região reguladora na linhagem NE0018, entre o 2° e 3° éxon na linhagem NE1520, e no 2° éxon na linhagem ND7016 (Fig. 4).

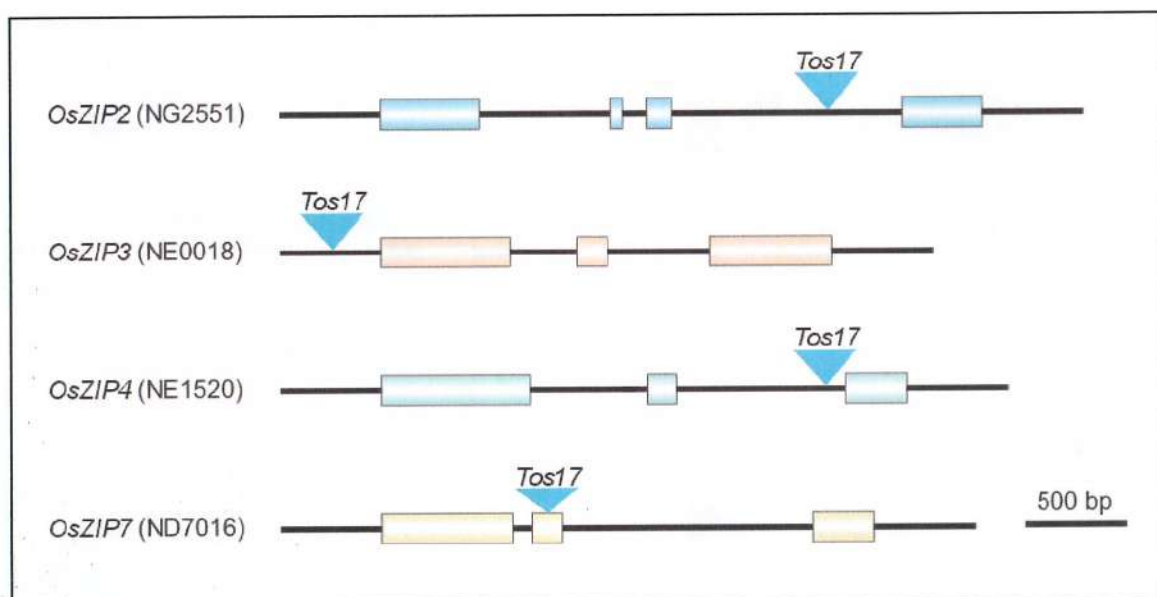


Figura 4 – Localização da inserção do retrotransposon *Tos17* nas quatro linhagens mutantes solicitadas. As linhas negras representam íntrons, e os retângulos coloridos representam éxons.

4.2. Identificação de plantas homozigotas

Plantas homozigotas para a inserção do *Tos17* foram identificadas em três das quatro linhagens: NE0018, NE1520 e ND7016 (Fig. 5). Na linhagem ND7016 (Fig. 5A) as

plantas A, B, E e G são homozigotas para a inserção, a planta F é heterozigota e as plantas C e D não apresentam inserção. Entre as plantas da linhagem NE0018 (Fig. 5B), a planta F é a única homozigota para a inserção, enquanto todas as outras não apresentam inserção. Já na linhagem NE1520 (Fig. 5D), as plantas A, B, C, E, G e I são homozigotas para a inserção, as plantas D e H são heterozigotas e só a planta F não apresenta a inserção.

Várias tentativas de identificar plantas com inserção na linhagem NG2551 foram realizadas, no entanto não foi possível encontrar nenhuma que apresentasse a inserção, nem mesmo em heterozigose (Fig. 5C).

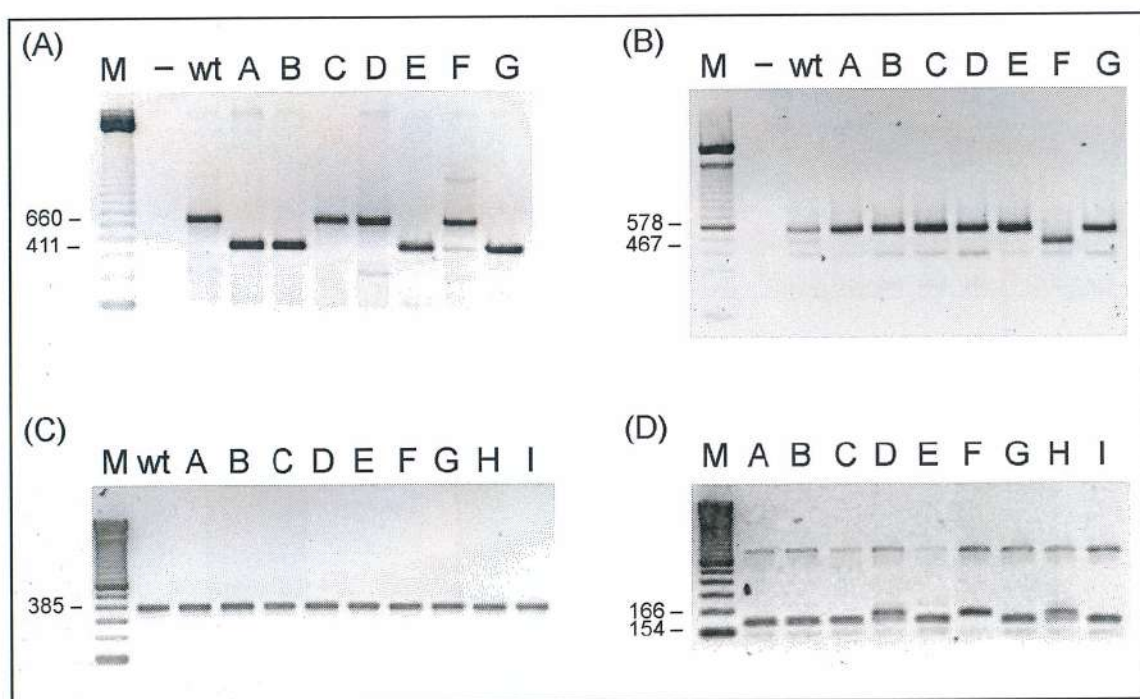


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para genotipagem das linhagens ND7016 (A), NE0018 (B), NG2551 (C) e NE1520 (D). M, marcador; wt, tipo selvagem; letras indicam as plantas segregantes; números indicam os tamanhos esperados dos amplicons (em pares de base).

4.3. Análise da expressão dos genes interrompidos

A inserção do retrotransposon *Tos17* causou a redução significativa na expressão relativa dos genes interrompidos. Plantas da linhagem NE1520 (mutantes para o gene *OsZIP4*) apresentaram uma redução de 75% na expressão relativa de *OsZIP4* em comparação às plantas das outras linhagens (Fig. 6). O mesmo padrão foi observado para plantas da linhagem ND7016 (mutantes para o gene *OsZIP7*), as quais apresentaram uma redução de 77% na expressão relativa de *OsZIP7* (Fig. 7). Não foi possível detectar sinal de expressão de *OsZIP3* nas condições testadas: nem nas plantas WT, nem nas plantas mutantes.

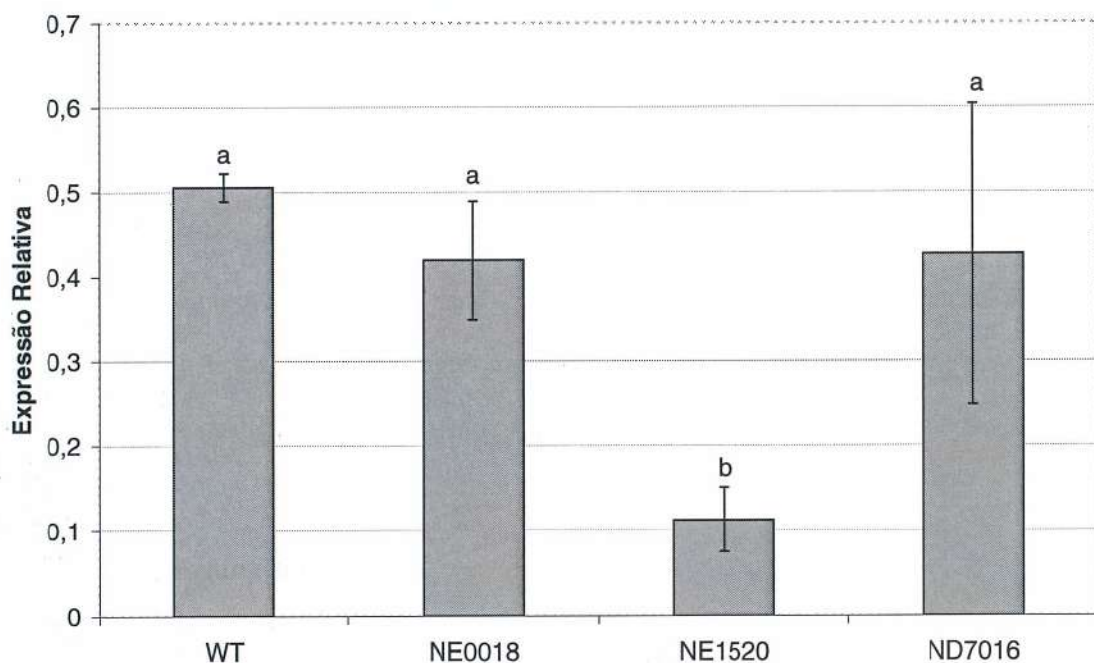


Figura 6 – Expressão relativa obtida por qPCR do gene *OsZIP4* em raízes de plantas de arroz dos genótipos WT (Nipponbare), NE0018 (*zip3*), NE1520 (*zip4*) e ND7016 (*zip7*) submetidas a sete

dias de deficiência de Zn. Os valores correspondem à média de três replicatas biológicas ($n = 3$) \pm erro padrão. Letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) segundo teste de Duncan.

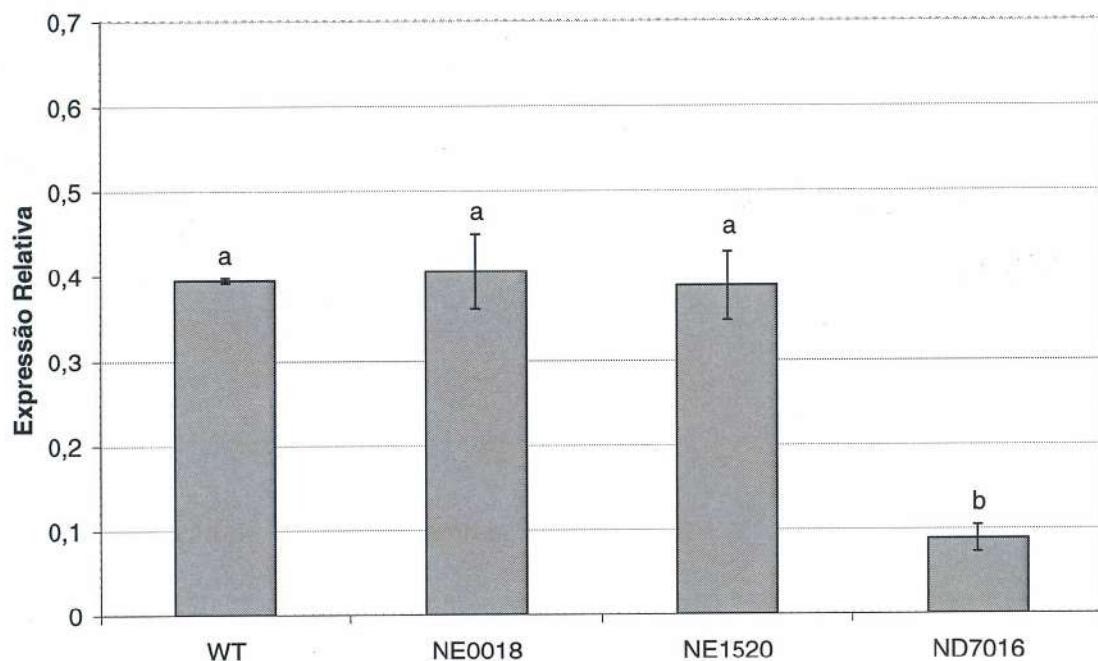


Figura 7 – Expressão relativa obtida por qPCR do gene *OsZIP7* em raízes de plantas de arroz dos genótipos WT (Nipponbare), NE0018 (*zip3*), NE1520 (*zip4*) e ND7016 (*zip7*) submetidas a sete dias de deficiência de Zn. Os valores correspondem à média de três replicatas biológicas ($n = 3$) \pm erro padrão. Letras iguais não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) segundo teste de Duncan.

4. 4. Taxa de germinação

Diferenças foram observadas na taxa de germinação entre os genótipos avaliados. A linhagem NE0018 (*zip3*) teve uma taxa de germinação significativamente menor em comparação ao tipo selvagem e à linhagem NE1520 (*zip4*) (Tab. 1). Essa diferença foi de 15% no número de sementes germinadas.

Tabela 1. Taxa de germinação de sementes dos genótipos WT (Nipponbare), NE0018 (*zip3*), NE1520 (*zip4*) e ND7016 (*zip7*). Os valores representam a média (\pm erro padrão) de quatro repetições, e letras iguais não diferem pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$), $n = 20$.

Linagem	Sementes Germinadas	%
WT	19,50 \pm 0,29 a	100
NE0018	16,50 \pm 1,32 b	85
NE1520	19,25 \pm 0,48 a	99
ND7016	18,80 \pm 0,48 ab	96

4.5. Concentração de cátions divalentes

A concentração de Zn apresentou um padrão similar entre todos os quatro genótipos avaliados (Fig. 8A). Plantas cultivadas na concentração de 2 μ M de Zn apresentaram quantidades significativamente maiores (cerca de 2,5 vezes maior) de Zn nas folhas quando comparadas às plantas crescidas nas concentrações menores. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre as plantas crescidas nas concentrações de 0,2 e 0,02 μ M de Zn.

Plantas das linhagens NE0018 (*zip3*) e NE1520 (*zip4*) apresentaram um padrão semelhante na concentração de Mn. As plantas dessas duas linhagens crescidas sob 0,2 μ M de Zn tiveram uma quantidade significativamente maior de Mn nas folhas (Fig. 8B). A concentração de 0,02 μ M de Zn levou a um maior acúmulo de Fe somente nas plantas WT e não nos mutantes (Fig. 9A). Não foi observada diferença significativa nas concentrações de Cu entre as plantas nos diferentes tratamentos (Fig. 9B).

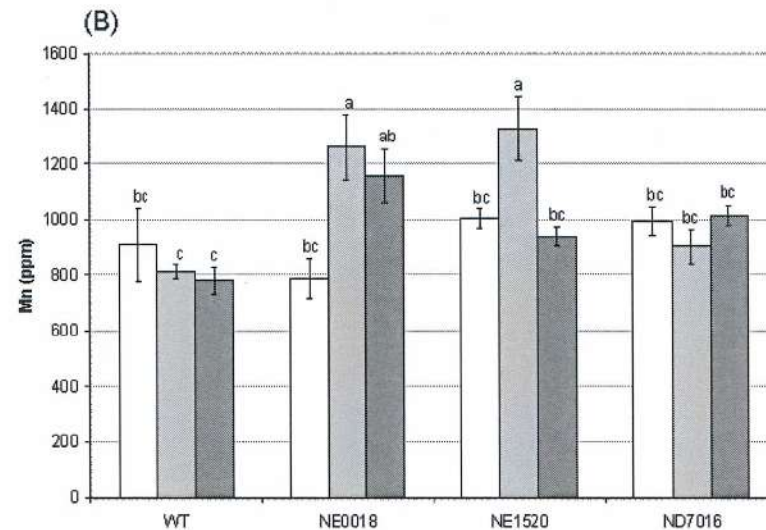
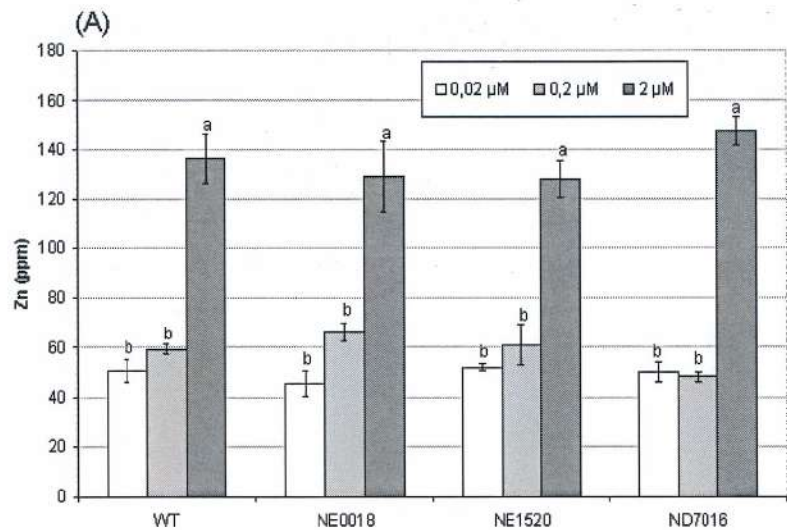


Figura 8 – Concentração de Zn (A) e Mn (B) em folhas de plantas de arroz submetidas a três diferentes concentrações de Zn (2; 0,2; e 0,02 μM de Zn) por 40 dias. Média (± erro padrão) de três repetições biológicas (n = 3), e letras iguais não diferem significativamente de acordo com teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

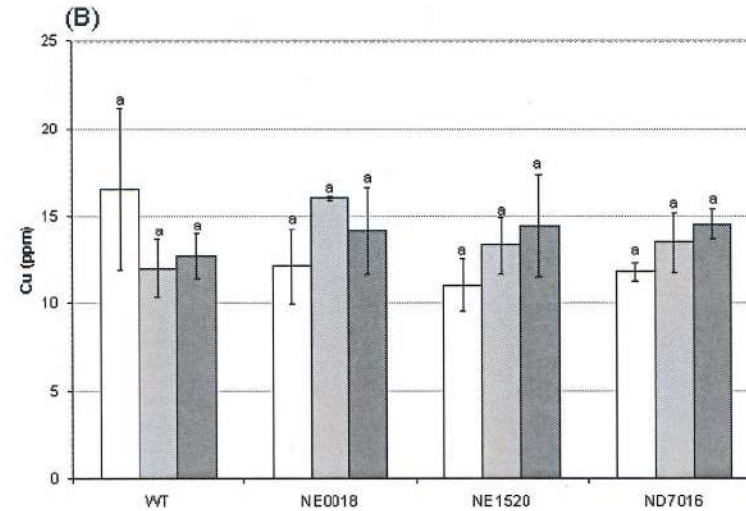
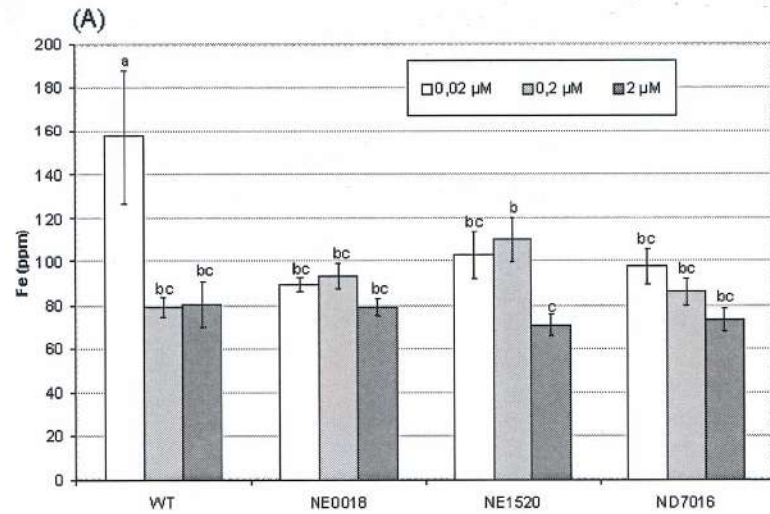


Figura 9 – Concentração de Fe (A) e Cu (B) em folhas de plantas de arroz submetidas a três diferentes concentrações de Zn (2; 0,2; e 0,02 μM de Zn) por 40 dias. Média (\pm erro padrão) de três repetições biológicas ($n = 3$), e letras iguais não diferem significativamente de acordo com teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Quatro mutantes em genes da família multigênica ZIP foram encontrados no banco do RGRC: NG2551 (*zip2*), NE0018 (*zip3*), NE1520 (*zip4*) e ND7016 (*zip7*). A inserção ocorreu em locais distintos dentro desses genes: ocorrendo em íntrons em duas linhagens, num éxon em uma das linhagens, e na região regulatória em outra. O fato de já terem sido encontradas linhagens para quatro dos onze membros da família ZIP pode ser explicado pela preferência do *Tos17* por seqüências com baixo número de cópias, as quais geralmente são ricas em genes (Yamazaki *et al.*, 2001).

Plantas homozigotas foram identificadas para todas linhagens, exceto para a linhagem NG2551. Uma possível explicação para isso é que a mutação seja dominante e leve à letalidade mesmo em heterozigose. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de erro no envio das sementes.

A análise da expressão relativa dos genes interrompidos mostrou que a inserção do *Tos17* reduz significativamente os níveis de transcrição. Os perfis de expressão dos genes *OsZIP4* e *OsZIP7* em raízes tiveram padrão semelhante ao obtido por Ishimaru *et al.* (2005), que também observou a expressão desses genes em raízes sob deficiência de Zn. Entretanto, não foi possível analisar o efeito da inserção do *Tos17* no gene *OsZIP3* pois não foi detectado qualquer sinal, resultado semelhante ao obtido por Ishimaru *et al.* (2005). Realmente, Ramesh *et al.* (2003) observaram que a expressão de *OsZIP3* foi muito maior em partes aéreas do que em raízes. A fim de contornar esse problema, outros órgãos e tecidos deverão ser avaliados quanto à expressão desse gene.

Em relação à taxa de germinação, somente a linhagem NE0018 (*zip3*) apresentou uma redução no número de sementes germinadas. Este resultado sugere uma possível participação do gene *OsZIP3* no desenvolvimento inicial da planta. Duas hipóteses podem

ser levantadas. A primeira é que esse gene tem um papel importante na alocação do Zn para o grão, e a taxa de germinação reduzida seria o resultado de menores níveis totais de Zn no grão. A segunda é que esse gene tem um papel importante na mobilização do Zn do grão para a plântula, e assim o Zn armazenado não seria facilmente disponibilizado para a plântula em desenvolvimento. Grewal & Graham (1997) observaram que sementes com menores concentrações de Zn das espécies *Brassica napus* e *Brassica juncea* apresentaram problemas no desenvolvimento inicial. Esses resultados sugerem que as reservas de Zn presentes na semente têm um grande impacto no crescimento vegetativo inicial assim como na captura de Zn pelas plantas em solos deficientes em Zn. A análise dos teores de Zn e outros metais é essencial para uma determinação mais precisa do papel de *OsZIP3* na germinação. De fato, essa análise foi tentada utilizando-se PIXE, contudo ocorreram problemas na obtenção de pastilhas, o que impossibilitou o uso dessa técnica. Amostras estão sendo submetidas a ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) para medir os teores desses metais.

A taxa de captura de Zn não foi alterada nas três linhagens mutantes conforme observado no teor de Zn nas folhas. Uma explicação possível para isso é que no genoma de arroz foram identificados onze genes pertencentes à família ZIP e com grande homologia entre si (Gross *et al.*, 2003). Experimentos de complementação de leveduras defectivas no transporte de Zn demonstraram que os genes *OsZIP1*, *OsZIP3* (Ramesh *et al.*, 2003) e *OsZIP4* (Ishimaru *et al.*, 2005) são transportadores de alta afinidade de Zn. No genoma de *Arabidopsis thaliana* foram encontrados nove membros da família ZIP (Guerinot, 2000) e alguns deles já foram caracterizados com transportadores de alta afinidade de Zn (Grotz *et al.*, 1998). Esses dados podem indicar a existência de genes de função complementar ou de mecanismos compensatórios utilizados pelas linhagens mutantes. Isso poderia explicar os

teores semelhantes de Zn observados nas três linhagens mutantes. Duas estratégias serão utilizadas para abordar este problema: análise da expressão de outros genes da família ZIP em linhagens mutantes sob deficiência de Zn, e geração de duplos mutantes.

Diferenças significativas foram observadas nos teores de Zn entre plantas cultivadas sob 2 μM de Zn e sob as outras duas concentrações (0,2 e 0,02 μM). Os teores semelhantes de Zn nas duas concentrações mais baixas podem ser o resultado da ação de um mecanismo de alta afinidade de captura do metal.

Plantas das linhagens NE0018 (*zip3*) e NE1520 (*zip4*) cultivadas na concentração intermediária de Zn (0,2 μM) apresentaram maiores concentrações de Mn nas suas folhas. Os genes *OsZIP3* e *OsZIP4* são transportadores específicos de Zn, pois não transportam Fe e Mn (Ramesh *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 2005). É possível que os genes recrutados para compensar a falta desses genes não sejam igualmente específicos, podendo transportar outros metais como o Mn. Essa especificidade ampla foi observada no gene *AtIRT1*, o qual é relativamente específico para o transporte de Fe mas também é capaz de transportar Cd, Co, Mn, e/ou Zn (Eide *et al.*, 1996; Korshunova *et al.*, 1999).

Em plantas, a deficiência de Zn pode causar um aumento na concentração de Fe nas folhas (Zhang *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 2004), o que foi observado somente nas plantas do tipo selvagem cultivadas na concentração mais baixa de Zn. Uma possível explicação para esse fato é que os genes expressos para compensar a falta dos genes mutados tenham menor afinidade por Fe. Não foi encontrada qualquer diferença nas concentrações de Cu, resultado também obtido por Ishimaru *et al.* (2005).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, I.L., Nadassy, K. & Wodak, S.J. (1998) Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Science*, 7: 1700–1716.
- Alloway, B.J. (2004) *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. International Zinc Association, Brussels, 115 p.
- Barak, P. & Helmke, P.A. (1993) The chemistry of zinc. In: Robson, A.D., ed. *Zinc in soil and plants*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1–13.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. & Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist*, 173: 677-702.
- Brown, T.A. (2006) *Genomes*, 3rd edition. Garland Science, Manchester.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1367 p.
- Cakmak, I., Torun, B., Erenoglu, B., Öztürk, L., Marschner, H., Kalayci, M., Ekiz, H. & Yilmaz, A. (1998) Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytica*, 100: 349–357.
- Campbell, J.L., Malmqvist, K.G. & Johansson, S.A.E. (1995) *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE)*. Wiley-Interscience, New York, 451 p.
- Dellaporta S.L., Wood J. & Hicks J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology*, 1: 19-21.
- Desbrosses-Fonrouge, A.G., Voigta, K., Schrödera, A., Arrivault, S., Thomine, S. & Krämer, U. (2005) *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Letters*, 579(19): 4165–4174.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. & Guerinot M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *PNAS*, 93: 5624–5628.

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

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

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

Gaither, L.A. & Eide, D.J. (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, 14: 251–270.

Grewal, H.S. & Graham, R.D. (1997) Seed zinc content influences early vegetative growth and zinc uptake in oilseed rape (*Brassica napus* and *Brassica juncea*) genotypes on zinc-deficient soil. *Plant and Soil*, 192: 191-197.

Gross J., Stein R.J., Fett-Neto A.G. & Fett J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4): 477-497.

Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. & Eide, D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *PNAS*, 95: 7220-7224.

Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 190-198.

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

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

IRGS (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(422), 3207-3214.

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

- Kobayashi, T., Yoshinara, T., Jiang, T., Goto, F., Nakanishi, H, Mori, S. & Nishizawa, N.K. (2004) Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants. *Physiologia Plantarum*, 119: 400-408.
- 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.
- Maret, W. (2005) Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19: 7-12.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Edition. Academic Press, Boston, 674 p.
- Marschner, H. & Romheld, V. (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil*, 165: 261-274.
- Menezes, V.G., Macedo, V.R.M. & Anghinoni, I. (2004) Projeto 10: estratégias de manejo para o aumento de produtividade e sustentabilidade da lavoura de arroz irrigado no RS. Instituto Rio-Grandense do Arroz, Cachoeirinha.
- Miki, D., Itoh, R. & Shimamoto, K. (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiology*, 138: 1903-1913.
- Miyao A., Yamazaki M. & Hirochika H. (1998) Systematic screening of mutants of rice by sequencing retrotransposon-insertion sites. *Plant Biotechnology*, 15 (4): 253-256.
- Morgenstern B., Frech K., Dress A. & Werner T. (1998) DIALIGN: Finding local similarities by multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, 14: 290-294.
- Quinn, G.P. & Keough, M.J. (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, 560 p.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. & Kochian L.V. (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *PNAS*, 97: 4956-4960.