

## IDENTIFICAÇÃO DE GENES ATIVADOS POR DEFICIÊNCIA DE FERRO EM RAÍZES DE PLANTAS DE ARROZ UTILIZANDO A TÉCNICA DE RDA

Raul Antonio Sperotto, Janette Palma Fett. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Instituto de Biociências - Centro de Biotecnologia e Departamento de Botânica - Campus do Vale - Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bairro Agronomia - CEP: 91501-970 - Porto Alegre - RS - raulsperotto@yahoo.com.br

O ferro é um micronutriente essencial para virtualmente todos os organismos vivos, e as plantas desempenham um papel fundamental na sua entrada para a cadeia alimentar. Como um metal de transição, sua habilidade de ganhar ou perder um elétron confere propriedades importantes em reações de oxi-redução, fazendo parte de proteínas essenciais para a fotossíntese, respiração e muitos outros processos metabólicos. Essas mesmas propriedades permitem que o ferro, quando em excesso, catalise a formação de espécies reativas de oxigênio, altamente danosas a qualquer tipo celular (Halliwell & Gutteridge, 1992).

Este problema é comum em plantas crescidas em sistema de alagado, que apresentam condições anaeróbicas e baixo pH. Por outro lado, em condições aeróbicas e pH neutro ou alcalino, o ferro torna-se altamente insolúvel no solo, e indisponível para as plantas (Guerinot & Yi, 1994). Plantas de arroz são altamente suscetíveis a baixas concentrações de ferro, diferente de outras espécies cultivadas, como aveia (Takahashi et al. 2001).

Durante a busca por proteínas envolvidas no transporte, remobilização e estocagem de ferro, nosso grupo identificou no genoma de arroz 43 genes potencialmente relacionados a esses processos (Gross et al. 2003). Entretanto, outros genes devem participar da resposta de plantas de arroz à deficiência de ferro. No intuito de melhor entender os processos envolvidos na resposta de raízes de arroz a este estresse, o objetivo deste trabalho foi identificar novos genes cuja atividade é aumentada em condição de deficiência de ferro em relação à condição controle, utilizando a técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*).

Para tanto, plantas de arroz foram submetidas a 3, 6 e 9 dias de exposição às condições normal (controle) e estressante (deficiência de ferro, Fe<sup>-</sup>). RNA das raízes foi extraído utilizando-se o reagente comercial TRIzol (Invitrogen) e a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o kit SMART (Clontech). O procedimento de RDA utilizado foi basicamente o descrito por Pastorian et al. (2000), utilizando-se a população de cDNA controle como *driver* e a população de deficiência de ferro como *tester*. Dessa forma, foi possível isolar seqüências que estão mais presentes na condição Fe<sup>-</sup> do que na situação controle. Tais seqüências são chamadas de produtos diferenciais. Uma alíquota dos produtos diferenciais foi clonada no vetor TOPO (Invitrogen) e transformada em células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue, dando origem à biblioteca de genes diferencialmente expressos. Foram seqüenciados 192 clones utilizando-se o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências resultantes foram comparadas com banco de dados e classificadas por categorias funcionais, como mostrado na tabela 1.

Foram identificadas 28 seqüências ativadas por deficiência de ferro em raízes de plantas de arroz. Nenhuma destas seqüências foi relacionada em estudos anteriores como sendo induzida por deficiência de ferro, exceto em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo com deficiência de ferro em partes aéreas de arroz (Sperotto et al. 2007). Aproximadamente 40% das seqüências mostraram sobreposição com outros estresses abióticos e também bióticos, não sendo respostas específicas à deficiência de ferro. Logo, devem ser consideradas respostas a estresse geral. Aproximadamente 30% das seqüências já foram descritas como relacionadas a processos de senescência, sugerindo que a deficiência de ferro pode induzir as raízes a entrarem em senescência prematura.

**Tabela 1:** Sequências ativadas em raízes de arroz sob deficiência de ferro.

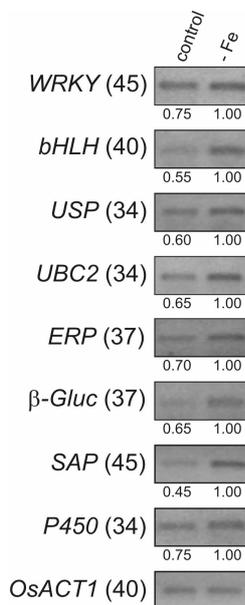
Functional Categories	Rice Pipeline clone No.	Description	Redundancy (%) <sup>a</sup>	E-value	Senescence related
Nucleotide-binding protein	J013058H19	MYB family transcription factor	31 (31%)	0.0	X
	J013000A19	WRKY17 transcription factor	2 (2%)	0.0	X
	J013132D22	Basic helix-loop-helix (bHLH)	1 (1%)	1e-63	
	J033052D22	C2 domain-containing protein, similar to zinc finger	15 (15%)	0.0	
	J023041N10	RMD1 protein, short vegetative phase protein (SVP) – MADS-box transcription factor	1 (1%)	0.0	
	J023043P08	AGAMOUS-like MADS-box protein (FDRMADS8)	1 (1%)	1e-146	
Stress response	J023018C18	Universal stress protein (USP), similar to ethylene-responsive ER6	1 (1%)	1e-150	
	J033034F03	Heat shock protein 82 kDa (HSP82)	8 (8%)	1e-28	
Protein degradation	J013104L05	Cysteine protease	1 (1%)	7e-19	X
	J033021F14	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBC2)	1 (1%)	2e-32	X
Lipid metabolism	002-167-B02	Lipid transfer protein (LTP)	2 (2%)	0.0	X
	006-207-F06	Fatty acid hydroxylase	1 (1%)	3e-19	X
Cell signaling	002-155-A07	Ethylene-responsive protein (ERP)	1 (1%)	0.0	
Carbohydrate metabolism	J033117C01	$\beta$ -Glucosidase	3 (3%)	1e-168	X
	J013048L15	UDP-sulfoquinovose-DAG sulfoquinovosyltransferase – hypothetical glycosyl transferase	1 (1%)	6e-40	
Cell division	J033034K16	Cell division control protein 2 (CDC2)	1 (1%)	2e-12	
Structural	J033082N17	Myosin heavy chain	1 (1%)	0.0	
Protein biosynthesis	J033038C19	60S ribosomal protein L27	7 (7%)	0.0	
Protein modification	J033114L22	Protein kinase	7 (7%)	0.0	
Others	J023008A06	Senescence-associated protein (SAP)	4 (4%)	0.0	X
	J033114G10	DEAD/DEAH-box helicase, spliceosome RNA helicase	2 (2%)	2e-38	
	001-047-A06	Ferrochelatase II, heme synthase	1 (1%)	3e-80	
	J013156O03	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, glycolate oxidase (GOX)	1 (1%)	1e-142	
	J033034E03	Cytochrome P450 oxidoreductase	1 (1%)	1e-31	X
	J033112K10	Xyloglucan galactosyltransferase			
Unknown	J013095D13	Unknown protein	2 (2%)	0.0	
	002-104-F08	Unknown protein	2 (2%)	0.0	
	J023073K07	Unknown protein	1 (1%)	0.0	
Total		28 <sup>b</sup>	100 (100%)		

<sup>a</sup> Represents the percentage in relation to the total number of clones analyzed

<sup>b</sup> Total number of different genes with homology

Para confirmar a ativação dos genes encontrados no RDA e validar a biblioteca dos produtos diferenciais, o padrão de expressão de alguns genes foi analisado por RT-PCR semi-quantitativo, usando um gene de actina como controle. Conforme visto na figura 1, os resultados obtidos confirmam as diferenças de expressão encontradas pela metodologia de RDA.

Em geral, processos de senescência possuem função biológica. Por exemplo, as pétalas senescem após a fertilização, e a planta inteira senesce após a produção de sementes. Isto sugere que o início da senescência é geneticamente pré-determinado, e que este seja um processo complexo finamente controlado. Entretanto, quando as plantas enfrentam habitats ou condições adversas, a senescência de determinados tecidos ou da planta inteira pode ser prematuramente ativada. Os resultados do RDA sugerem, portanto, que a deficiência de ferro, assim como outros tipos de estresses, pode levar as raízes de plantas de arroz a entrarem em processo de senescência.



**Figura 1:** Análise da expressão por RT-PCR semi-quantitativo de genes identificados no RDA. A intensidade de banda de cada produto de PCR foi normalizada em relação à densidade óptica obtida para o gene da actina. Números abaixo de cada canaleta representam a porcentagem em relação à maior densidade óptica normalizada. Números entre parênteses indicam o número de ciclos usados nas respectivas reações de PCR.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Gross J, Stein R J, Fett-Neto A G, Fett J P (2003) **Iron homeostasis related genes in rice**. *Genetics and Molecular Biology* 26: 477-497.
- Guerinot M L, Yi Y (1994) **Iron: nutritious, noxious, and not readily available**. *Plant Physiology* 104: 815-820.
- Halliwell B, Gutteridge J M C (1992) **Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation**. *FEBS Letters* 307: 108-112.
- Pastorian K, Hawell III L, Byus C V (2000) **Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs**. *Analytical Biochemistry* 283: 89-98.
- Sperotto R A, Ricachenevsky F K, Fett J P (2007) **Iron deficiency in rice shoots: identification of novel induced genes using RDA and possible relation to leaf senescence**. *Plant Cell Reports* DOI 10.1007/s00299-007-0330-y.
- Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa N K, Mori S (2001) **Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes**. *Nature Biotechnology* 19: 466-469.

Agradecimentos: Capes, CNPq, IRGA e CIAT.