

CAMILO ELBER VITAL

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À SENESCÊNCIA FOLIAR
E REMOBILIZAÇÃO DE FERRO PARA A SEMENTE NO ARROZ**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

CAMILO ELBER VITAL

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À SENESCÊNCIA FOLIAR
E REMOBILIZAÇÃO DE FERRO PARA A SEMENTE NO ARROZ**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Coorientador)

Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos

Prof. Luciano Gomes Fietto

Dr. Valdir Diola

Prof^a. Andréa Miyasaka de Almeida
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

À minha orientadora Andréa Miyasaka de Almeida e aos meus co-orientadores Marcelo Ehlers Loureiro e Antonio Costa de Oliveira pela orientação, dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

À FAPEMIG e CAPES/PROCAD pelo financiamento do projeto, CNPq pela bolsa, NSF pela bolsa período na Universidade de Purdue nos Estados Unidos.

Ao Dr. Luciano Carlos da Maia, Dr. Valdir Diola e ao Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Dr. David Salt pelas análises realizadas no ICP-MS e pela hospitalidade durante o período de intercambio em seu laboratório na Universidade de Purdue, West Lafayette, EUA.

Ao Dr. Felipe Lopes da Silva, EPAMIG, Dr. Plínio César Soares (EPAMIG), Jardell e outros funcionários que ajudaram na montagem e acompanhamento do experimento de campo.

Ao estudante de doutorado do programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidad Nacional Andrés Bello (Santiago, Chile), Ricardo Nilo, pela ajuda nas análises estatísticas dos dados de proteoma.

Ao Dr. Ariel Orellana do Centro de Biotecnologia Vegetal da Universidad Nacional Andrés Bello (Santiago, Chile) por permitir o uso do software de análise de imagens de géis bidimensionais em seu laboratório.

Ao grupo de trabalho do projeto arroz: Gustavo, Giselle, Carlos, Pitt, Daniel, Carol Muller, Eduardo Gusmão, Laíse e Advânio pelo companheirismo.

Aos professores Luciano Fietto e Beth Fontes que orientaram sobre o trabalho com fatores de transcrição NAC.

Ao Dr. Plínio César Soares (EPAMIG), pesquisadores Richard Bacha e Juliana Vieira (EPAGRI), por terem gentilmente cedido as sementes.

Ao professor Fábio, coordenador do programa PG, pela atenção especial e ajuda financeira nos preparativos da viagem para os Estados Unidos.

Às minhas grandes amigas Rose e Renata pelo auxílio na realização dos trabalhos de proteômica e pelo suporte dado na minha ausência no período que estive no intercâmbio.

À todos os funcionários do laboratório de Fisiologia Vegetal.

Aos meus grandes amigos de sempre: Diego, Pablo, Rômulo, Paulo, Rafael, Fernanda, Diogo, Marcio Lúcio, Rober e Rodolfo.

Aos meus novos amigos do curso de Fisiologia Vegetal: Jorge, Marcos, Cleber, Rose, Renata, Ivan, Flancer, Gládis, Joseila, Viviane, Jocleita e Alice.

À minha família e a minha namorada Daniela pela paciência, pelo apoio e forças incondicionais fornecidas durante esta minha caminhada.

BIOGRAFIA

CAMILO ELBER VITAL, filho de Antonio Carlos Vital e Neuza Lúcia da Cruz Vital, nasceu em Juiz de Fora, MG, no dia 13 de março de 1983. Em 2001 concluiu o ensino médio na escola Estadual Marina de Paiva na cidade de Guidoal, MG. Em março de 2002 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em março de 2007. No ano de 2008, iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na mesma instituição.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas	9

Capítulo I: Estudo de genes envolvidos na senescência foliar e na remobilização de ferro para o grão de arroz em desenvolvimento

Resumo.....	13
Abstract.....	15
Introdução	17
Material e Métodos.....	18
Resultados e Discussão.....	25
Conclusões	48
Referências Bibliográficas.....	49

Capítulo II: Análise do perfil protéico de folhas de arroz durante o enchimento e desenvolvimento do grão

Resumo.....	54
Abstract.....	55
Introdução	56
Material e Métodos.....	58
Resultados e Discussão.....	62
Conclusões	69
Referências Bibliográficas	69
Anexos.....	72

RESUMO

VITAL, Camilo Elber, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Estudo da expressão gênica associada à senescência foliar e remobilização de ferro para a semente no arroz.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Antônio Costa de Oliveira.

O arroz é um dos cereais mais importantes no mundo em termos de consumo e de fornecimento de calorias, no entanto, é relativamente pobre em nutrientes. Tem sido mostrado que a folha bandeira presente logo abaixo da panícula desempenha importante papel no fornecimento de nutrientes para o grão de arroz em desenvolvimento. Desta forma, analisou-se a influência da remoção da panícula na senescência e na expressão de genes relacionados com o processo de senescência foliar e com a translocação de nutrientes na folha bandeira em duas cultivares de arroz (BR-IRGA 409 e IRGA 417). Adicionalmente, realizou-se uma análise *in silico* (dados de microarranjos) da expressão dos transportadores de ferro da família “Yellow Stripe” (YS) e também foram verificados possíveis elementos cis presentes na região promotora destes genes. O perfil protéico de folha bandeira e não bandeira em dois estádios de desenvolvimento do grão foi comparado para detectar proteínas diferencialmente expressas utilizando-se testes estatísticos para redução de falsos positivos. Os resultados confirmam que a remoção da panícula retarda a senescência da folha bandeira nas cultivares estudadas. Dois dos fatores de transcrição analisados (OsNAP e OsNAC like GmNAC3) apresentaram grande aumento de expressão durante a senescência da folha bandeira principalmente na fase final de enchimento do grão comparados com a folha não senescente. A remoção da panícula causou diminuição na expressão destes genes na folha bandeira. Um dos mais bem caracterizados genes da família YS (OsYSL2) teve maior expressão no estágio leitoso no genótipo IRGA 417. Este fato, aliado a maiores níveis de OsNAAT1 na folha bandeira e a maior expressão de OsYSL2 e OsNAS3 no estágio leitoso no grão, podem sugerir o maior teor de ferro neste genótipo. A análise *in silico* de dados de microarranjos em grãos mostrou que alguns genes dentro da família YS, OsYSL6, OsYSL13 e OsYSL5 têm expressão relativamente alta durante todo processo de enchimento do grão, enquanto outros genes (OsYSL18,

OsYSL1, OsYSL15, OsYSL4 e OsYSL12) têm aumento somente no estágio pastoso. Genes da família OsNAS e OsNAAT envolvidos na via de síntese de queladores de ferro para o transporte mediado por genes YS tiveram expressão maior no estágio leitoso durante o enchimento do grão. Os 18 genes putativos candidatos da família YS apresentaram variadas sequências cis possivelmente relacionadas com o processo de senescência foliar incluindo elementos responsivos a ácido abscísico, auxina, ácido salicílico, jasmonato e etileno. A análise do perfil protéico demonstrou variação na porcentagem de volume de spots quando se comparou os estádios de desenvolvimento leitoso e pastoso e também folha bandeira e não bandeira. Desta forma, a expressão dos fatores de transcrição relacionados com senescência ou com resposta a deficiência por ferro na folha bandeira pode estar relacionada com o processo de remobilização de nutrientes durante o enchimento dos grãos. Da mesma forma, a expressão no grão de genes transportadores de ferro, quanto de genes envolvidos na síntese de queladores durante a senescência foliar contribuiria para o processo. As diferenças no perfil protéico demonstram que possíveis alterações no metabolismo durante o processo de senescência da folha bandeira. O melhor esclarecimento da via de regulação dos fatores de transcrição ligados a senescência foliar e sua relação com os genes envolvidos na remobilização de nutrientes poderão ser de grande importância para o desenvolvimento de plantas que visem sanar problemas de deficiência nutricional humana.

ABSTRACT

VITAL, Camilo Elber, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Brazil, February 2010. **Study of gene expression associated with leaf senescence and iron remobilization to the rice seed** . Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Antônio Costa de Oliveira.

Rice is one of the most important cereals in the world in terms of consumption and supply of calories, however, is relatively poor in nutrients. It has been shown that this flag leaf just below the panicle plays an important role in supplying nutrients to the rice grain development. Thus, was analyzed the effect of panicle removal on senescence and the expression of genes related to the leaf senescence process and the nutrients translocation in the flag leaf of two rice cultivars (BR-IRGA 409 and IRGA 417). Additionally, we carried out an *in silico* analysis (microarray data) of the expression of iron transporters of the Yellow Stripe family (YS) and were also checked possible cis elements present in the promoter region of these genes. The protein profile of the flag leaf and no flag leaf in two stages of grain development was compared to detect differentially expressed proteins using statistical tests to reduce false positives. The results confirm that removal of the panicle retards the senescence of flag leaves of cultivars. Two of the transcription factors analyzed (OSNAP and OsNAC like GmNAC3) showed a large increase of expression during senescence of flag leaves mainly at the final stage of grain filling compared with no senescent leaves. The removal of the panicle caused a decrease in the expression of these genes in flag leaf. One of the well-characterized genes of YS family (OsYSL2) had higher expression in the milky stage of IRGA 417 genotype. This fact, coupled with higher levels of OsNAAT1 in the flag leaf and the greatest expression of OsYSL2 and OsNAS3 in the milky stage in the grain, may suggest the higher iron content in this genotype. *In silico* analysis of microarray data in grains showed that some genes within the YS family, OsYSL6, OsYSL13 and OsYSL5 have relatively high expression during the whole process of grain filling, while other genes (OsYSL18, OsYSL1, OsYSL15, and OsYSL4 OsYSL12) have increased only in the dough stage. OsNAS and OsNAAT genes involved in synthesis of iron chelators for the transport mediated by YS genes had higher expression in the milk stage during grain filling. The 18 putative candidate genes of YS family showed various cis

sequences possibly related to the process of senescence including responsive elements to abscisic acid, auxin, salicylic acid, jasmonate and ethylene. Analysis of protein profiles demonstrated variation in the percentage of spot volume when comparing the milk and dough developmental stages and also flag leaf and no flag leaf. Thus, the expression of transcription factors related to senescence or response to iron deficiency in the flag leaf can be related to the remobilization of nutrients during grain filling. Likewise, the expression in the grain of iron transporter genes or involved in the synthesis of chelators during leaf senescence contribute to the process. The difference in protein profile shows that possible changes in metabolism during senescence of flag leave. The best elucidation of the regulation of transcription factors linked to leaf senescence and its relationship with genes involved in the remobilization of nutrients may be of great importance for the development of plans that aimed remedy the problems of human nutritional deficiency.

1 - Introdução Geral

1.1 - Importância sócio-econômica do arroz

O arroz é um dos principais cultivos agrícolas em nível mundial sendo responsável por aproximadamente 11% da área cultivada no planeta. Constitui alimento básico de mais da metade dos 6 bilhões de habitantes do globo terrestre, sendo que na América Latina é a fonte básica de calorias. O arroz possui importância econômica e social para o Brasil, que é grande produtor e ocupa a décima posição na produção em nível mundial e a primeira fora dos países asiáticos. O consumo *per capita* anual de arroz polido no Brasil é de aproximadamente 30 kg. hab⁻¹ ano⁻¹ (Informe Agropecuário - EPAMIG, 2004). Desta forma, observa-se claramente o papel de destaque exercido pelo arroz na agricultura e na alimentação demonstrando ao mesmo tempo, devido ao grande consumo, o seu potencial para utilização em programas que visem reduzir as carências em nutrientes essenciais para uma alimentação balanceada.

1.2 - Importância nutricional do ferro

Um dos problemas relacionados com a carência de nutrientes é a anemia, causada pela ingestão insuficiente de ferro e atinge uma grande parte da população. A deficiência de ferro na infância causa anemia ferropriva que ocasiona uma variedade de sintomas que incluem palidez, anorexia, fadiga, irritabilidade, redução do crescimento, prejuízos do desenvolvimento neuropsicomotor e da capacidade de regulação térmica (Holst, 1998) entre outras. Mulheres com quadro de anemia severa aumentam a incidência de morte durante o parto.

1.3 - Absorção e transporte de ferro nas plantas

Os mecanismos e os genes envolvidos na homeostase do ferro em plantas (absorção, transporte e armazenamento) vêm sendo cada vez mais estudados. Na absorção de ferro, as plantas podem usar duas estratégias: estratégia I ou de redução, presente em dicotiledôneas e monocotiledôneas

não gramináceas, e a estratégia II ou de quelação presente em monocotiledôneas gramináceas (figura 1). Na estratégia de redução, a acidificação da rizosfera gerada pela extrusão de prótons por H⁺-ATPases presentes nas células epidérmicas da raiz, aumenta a solubilidade do ferro. A proteína ferro quelato redutase (FRO - Ferric Reductase Oxidase) reduz o ferro da sua forma oxidada (Fe⁺³) para ferro reduzido (Fe⁺²) que por sua vez é transportado por transportadores de membrana específicos de Fe⁺², denominados de proteínas IRT (Iron Regulated Transporter), para o interior da célula. Neste processo de absorção de ferro há gasto de energia (ATP) pelas H⁺-ATPases e de poder redutor pela FRO (Hell *et al.*, 2003). Genes que codificam ferro quelato redutase, FRO1, FRO2, FRO3, e transportadores de Fe⁺², IRT1 e IRT2, têm sido isolados e identificados em *Arabidopsis* (Eide *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1999; Vert *et al.*, 2001). A expressão destes genes é fortemente induzida em raízes de plantas sob deficiência de ferro.

Na estratégia II, aminoácidos não protéicos denominados de fitossideróforos (PS) são secretados para a rizosfera onde formam um complexo com o ferro Fe⁺³ (Fe⁺³-FS). O complexo formado é então transportado para o interior das células epidérmicas por meio de transportadores específicos denominados de Yellow Stripe (YS) (Briat *et al.*, 1997).

Embora a estratégia I de absorção de ferro seja comum em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas, vem sendo mostrado que o arroz também possui transportadores de Fe⁺², denominados de OsIRT1 e OsIRT2, que tem expressão predominantemente em raízes. Desta forma, o arroz, além de absorver Fe⁺³ quelado a fitossideróforos, é capaz de absorver Fe⁺² diretamente, uma estratégia vantajosa para o crescimento em condições de alagamento onde a forma ferrosa é predominante. (Ishimaru *et al.*, 2006).

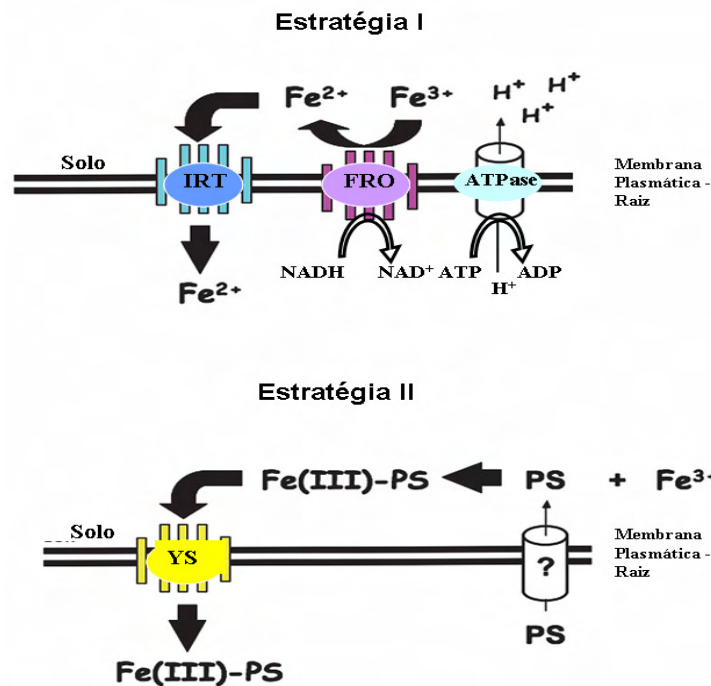


Figura 1 - Mecanismo de absorção de ferro pelas plantas. Estratégia I - A proteína ferro quelato-redutase (FRO) reduz Fe^{+3} do solo liberando Fe^{+2} para ser transportado através da membrana plasmática pelo transportador IRT. A solubilidade do ferro é aumentada pela acidificação da rizosfera através da atividade da enzima ATPase. No processo há gasto de energia (ATP) e poder redutor (NADH). Estratégia II – Os fitossideróforos (PS) são sintetizados no citoplasma. PS são liberados no solo e o complexo Fe-PS são subsequentemente transportados através da membrana via transportadores YS. (Fonte: Guerinot, 2007 modificado).

Independente da estratégia de absorção, o ferro é direcionado para o xilema através de transportadores nas células corticais. No xilema é complexado com ácidos orgânicos, como o citrato e, em seguida, translocado para a parte aérea via fluxo transpiratório (Curie e Briat, 2003) (figura 2). Em *A. thaliana* o complexo Fe^{+3} – citrato ao chegar às células do mesofilo foliar é então reduzido por enzimas FRO1 que estão presentes na membrana das células foliares utilizando NADPH como poder redutor (Bruggemann *et al.*, 1993).

A via de síntese do ácido mugineico (MA), uma família de fitossideróforos que as gramíneas podem secretar de suas raízes para quelar Fe^{+3} no solo, tem sido caracterizada (Ma *et al.*, 1993). Nesta via, observa-se a nicotianamina (NA) que não é somente uma intermediária chave para a

biossíntese de MA para a estratégia II, mas também um importante quelador de íons que pode facilitar o transporte de ferro e outros metais dentro das plantas (von Wiren *et al.*, 1999). NA participa no transporte floemático e distribuição citoplasmática de metais através de transportadores de membrana codificados pelos genes YS. Em arroz existem 18 putativos genes Yellow stripe like (YSL) que tem a expressão dependente do tecido ou órgão da planta. Um destes genes, denominado de OsYSL2 foi demonstrado ser um transportador de metal-NA expresso no floema e pode estar relacionado com o transporte a longas distâncias (Koike *et al.*, 2004), como, por exemplo, de uma folha senescente (fonte) para um grão em desenvolvimento (dreno) (Figura 2).

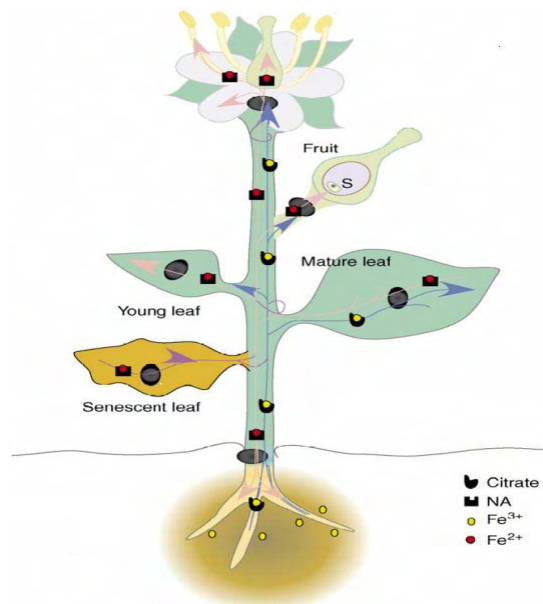


Figura 2 - Representação esquemática da circulação de ferro-quelato a longas-distâncias. A circulação de Fe-citrato nos vasos do xilema e Fe-nicotianamina nos vasos floemáticos está representada por linhas azul e rosa respectivamente. Ao longo do vegetal, transportadores YSL são indicados com círculos pretos. (Fonte: Briat *et al.*, 2007).

1.4 - Senescência foliar e remobilização de nutrientes para o grão

Durante o desenvolvimento reprodutivo ocorre todo um complexo processo que leva a remobilização de nutrientes oriundos de órgãos senescentes como folhas, para o grão. A senescência é governada basicamente pela idade de desenvolvimento da folha. No entanto, a senescência foliar é também influenciada por vários sinais internos e ambientais. Os fatores ambientais que influenciam a senescência incluem fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores abióticos pode-se citar a seca, limitação de nutrientes, temperaturas extremas, etc. Os fatores bióticos incluem infecção por patógenos e sombreamento por outras plantas. A senescência foliar pode ocorrer prematuramente nestas condições desfavoráveis. Dentre os fatores internos destacam-se os hormônios vegetais e o desenvolvimento reprodutivo que também podem atuar regulando a senescência foliar (Lim *et al.*, 2007) (figura 3).

A senescência foliar não é um processo de degeneração passivo e desregulado. Durante a senescência, as células foliares passam por mudanças na estrutura celular, metabolismo e expressão gênica. A primeira e mais significativa mudança na estrutura celular é o colapso dos cloroplastos, a organela que possui até 70% da proteína foliar. Em contraste, o núcleo e mitocôndria que são essenciais para expressão gênica e energia, respectivamente, permanecem intactos até os últimos estágios da senescência. Metabolicamente, a assimilação de carbono é substituída por catabolismo de clorofilas e macromoléculas tais como proteínas, lipídios de membrana e RNA. O aumento da atividade catabólica é responsável pela conversão de materiais celulares acumulados durante a fase de crescimento da folha em nutrientes exportáveis que são supridos para o desenvolvimento das sementes ou para outro órgão em crescimento (Lim *et al.*, 2007).

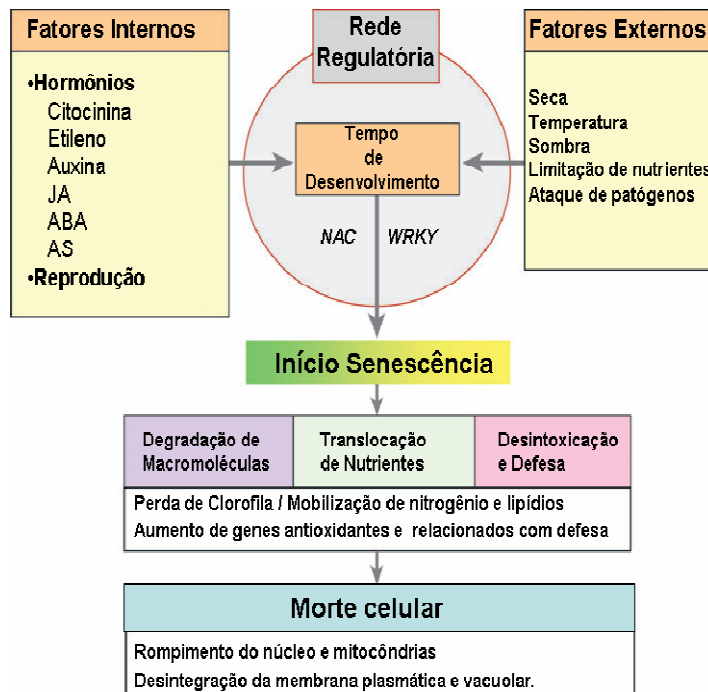


Figura 3 – Modelo das vias regulatórias na senescência foliar. A senescência foliar é considerada um processo complexo em que o efeito de vários sinais internos e externos são integrados à via de senescência dependente do desenvolvimento foliar. Múltiplas vias integradas a vários fatores são possíveis interconectadas para formar uma rede regulatória. Estas vias regulatórias ativam conjuntos distintos de genes associados à senescência que são responsáveis por executar o processo de degeneração e por ultimo levar a morte celular (Fonte: Lim *et al.*, 2007).

O mecanismo envolvido na senescência foliar, seja induzido por sinais ambientais, sinais internos ou mesmo pela própria idade de desenvolvimento da folha, vem sendo estudado com o uso de mutantes defectivos no mecanismo normal de senescência e /ou usando-se ferramentas de biologia molecular como “microarray” para o “screening” de genes relacionados ao mecanismo. Um grande número destes genes tem sido encontrados e codificam para fatores regulatórios da percepção de sinais como os fatores de transcrição. Em *Arabidopsis* foram identificados 96 genes que codificam fatores de transcrição e que tem expressão aumentada na senescência foliar. Estes genes pertencem a 20 famílias de fatores de transcrição diferentes, estando as famílias NAC e WRKY entre as maiores. Dentro da família WRKY, o fator de transcrição AtWRKY53 aumenta sua expressão no estágio inicial de senescência foliar e diminui nos últimos estádios implicando que esta proteína

pode desempenhar um papel regulatório nos eventos iniciais da senescência foliar (Hinderhofer *et al.*, 2001). Uma linhagem “knockout” do gene WRKY53 mostrou atraso na senescência foliar enquanto que a super-expressão causou senescência precoce mostrando sua função como um elemento positivo na regulação do processo (Miao *et al.*, 2004). Outro fator de transcrição, AtWRKY6, mostrou alto nível de expressão durante a senescência foliar como também durante a infecção por patógenos (Robatzek *et al.*, 2002). Na família NAC, cerca de um quinto dos 100 fatores que compõem a família em *Arabidopsis* tem a expressão aumentada durante a senescência foliar natural e na senescência induzida pelo escuro (Guo *et al.* 2006). Além do mais, o mutante “knockout” do gene AtNAP (fator de transcrição NAC) teve senescência atrasada mostrando que este gene funciona como elemento positivo na senescência foliar. Ortólogos a AtNAP existem em feijão e arroz e exibem expressão aumentada durante a senescência foliar (Lim *et al.*, 2007).

Estudos em trigo revelaram que o fator de transcrição do tipo NAC, TaNAM , além de regular a senescência está relacionado a um aumento de proteínas, zinco e ferro no grão. A redução na expressão deste gene por RNAi levou a um atraso da senescência da planta por mais de três semanas e reduziu o conteúdo de proteínas, zinco e ferro em mais de 30%. O ortólogo deste gene está presente em arroz sendo denominado de ONAC010 (Uauy *et al.*, 2006). Em soja, os genes GmNAC1, GmNAC3 e GmNAC6 são expressos em diferentes estádios de desenvolvimento do grão mostrando que estes genes têm papel importante durante a formação do grão (Meng *et al.*, 2007).

Em arroz foram identificados 140 putativos genes NAC ou NAC-like que possuem estruturas variadas e potencial diversidade de funções. Análise pela técnica de “one-hybrid” revelou que 12 proteínas NAC representando diferentes composições de motivos podem se ligar ao DNA no sítio núcleo de ligação dos fatores NAC. Além disso, análise da expressão gênica mostrou que 12 genes são expressos em tecidos específicos (calo, raiz, estame ou endosperma imaturo) sugerindo que estes genes podem ter um papel regulatório crucial no crescimento e desenvolvimento do arroz (Fang *et al.* 2008). Quanto aos fatores de transcrição do tipo WRKY, existem cerca de 112 putativos genes em arroz (RiceTFDB, 2009).

Durante o estresse de deficiência de ferro em plantas de arroz, ocorre alteração da expressão de genes relacionados com a absorção, transporte e acúmulo deste nutriente na planta. Foi identificado também que alguns fatores de transcrição têm a expressão modificada. Os genes OsNAC1, OsNAC5 e OsWRKY45, pertencentes às famílias mencionadas acima, tem sua expressão aumentada na parte aérea de plantas de arroz quando sujeitos ao estresse por deficiência de ferro (Ogo et al, 2006). O fator de transcrição OsIDEF2, pertencente também à família NAC, e se liga especificamente ao elemento “cis” responsivo a deficiência de ferro (IDE2) (Ogo et al, 2008). Outro fator de transcrição relacionado a respostas a deficiência por ferro é denominado de OsIDEF1.

O arroz é uma planta monocárpica já que se reproduz apenas uma vez com sua posterior morte. É uma boa planta experimental para estudar os mecanismos de senescência monocárpica em plantas anuais já que o grão em formação situa-se exclusivamente no topo da planta, ao contrário de outras plantas que apresentam em várias posições. Uma das características desta planta é uma folha especial denominada de “folha bandeira” que emerge como a última folha no desenvolvimento reprodutivo, mas sua senescência ocorre anteriormente em relação a outras duas folhas situadas também abaixo do eixo da panícula. A remoção da panícula promove um retardo da senescência destas folhas mostrando que o desenvolvimento do órgão reprodutivo seria um sinal inicial para desencadear o processo (Ray *et al.*, 1981; Biswas *et al.*, 1980). Além do mais, durante o enchimento do grão de arroz, a folha bandeira é responsável pelo fornecimento de grande parte dos nutrientes para a panícula mais próxima (Grusak e DellaPenna, 1999 apud Narayanan *et al.*, 2007).

A função de muitos dos fatores de transcrição associados à senescência foliar ou de genes relacionados com a homeostase de ferro em arroz carece de estudos. A caracterização funcional destes genes incluindo a via de sinalização que estes estão envolvidos e os genes alvos que regulam é indispensável para o entendimento da via regulatória molecular da senescência. Dentro desta perspectiva, estudos que visem o entendimento dos mecanismos envolvidos na senescência foliar e o processo de remobilização

de nutrientes para a semente, atrelado à grande importância do arroz na alimentação, poderá ser de grande valia para o desenvolvimento de plantas que visem sanar problemas de deficiência nutricional humana.

2 - Referências Bibliográficas

Biswas, A.K., Choudhuri M.A. (1980). **Mechanism of Monocarpic Senescence in Rice**. Plant Physiology, 65: 340-345.

Briat, J., Curie, C., & Gaymard, F. (2007). **Iron utilization and metabolism in plants**. Current opinion in plant biology, 10(3): 276-82.

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

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

Brunken, G.S., Szarfarc, S.C. (1999). **Anemia ferropriva em pré-escolares: Conseqüências, formas de controle e histórico das políticas nacionais de redução da deficiência**. Cadernos de Nutrição, 17: 1-19.

Carvalho, M.F.C.C. (1999). **PNAN e o compromisso social para redução da anemia por carência de ferro no Brasil**. In: ENCONTRO NORTE E NORDESTE SOBRE ANEMIAS E PARASITÓSES, Salvador. Anais. Salvador: UNEB, 1999. p.35.

Curie, C., Briat, J.F. (2003). **Iron transport and signaling in plants**. Annual Review Plant Biology, 54:183–206.

Eide, D., Broderius, M., Fett J., Guerinot, M.L. (1996). **A novel iron regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93: 5624–5628.

Fang, Y., You, J., Hie, K., Xie, W., Xiong, L., (2008). **Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice.** Molecular Genetics and Genomics, 280: 547-563.

Grusak, M.A., DellaPenna, D., Welch, R.M.(1999). **Physiologic processes affecting the content and distribution of phytonutrients in plants.** Nutrition Reviews, 57: 27-33.

Guerinot, M.L. (2007). **It's elementary: Enhancing Fe⁺³ reduction improves rice yields.** Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 104, no. 18: 7311–7312.

Guo, Y., Gan, S. (2006). **AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence.** Plant Journal, 46: 601–12.

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

Hinderhofer, K., Zentgraf, U. (2001). **Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence.** Planta 213: 469–73.

Holst, M.C. (1998). **Nutrition and the life cycle developmental and behavioral effects of iron deficiency anemia in infants.** Nutrition Today, 33: 27 – 36.

Hynek, R., Svensson, B., Jensen, O.N., Barkholt, V., Finnie, C. (2006). **Enrichment and identification of integral membrane proteins from barley aleurone layers by reversed-phase chromatography, SDS-PAGE, and LC-MS.** Journal of proteome research, 5: 3105-3113.

Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., (2006). **Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺.** The Plant Journal, 45: 335-346.

Informe Agropecuário (2004). EPAMIG 25, n. 222.

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

Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G. (2007). **Leaf Senescence.** *Annual Review of Plant Biology*, 58:115–36.

Ma, J.F., Nomoto, K. (1993). **Two related biosynthetic pathways of mugineic acids in Gramineous plants.** *Plant Physiology*, 102: 373–378.

Meng, Q., Zhang, C., Gai, J., Yu, D. (2007). **Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.** *Journal of Plant Physiology*, 164(8):1002-1012.

Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P., Zentgraf, U. (2004). **Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*.** *Plant Molecular Biology*, 55:853–67.

Narayanan, N.N., Vasconcelos, M.W., Grusak, M.A. (2007). **Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 45 277-286.

Ogo, Y., Itai, R.N., Nakanishi, H., Inoue, H., Kobayashi, T., Suzuki, M., Takahashi, M., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2006). **Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants.** *Journal of Experimental Botany* 57: 2867-2878.

Ogo, Y., Kobayashi, T., Itai, R.N., Nakanishi, H., Kakei, Y., Takahashi, M., Toki, S., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2008). **A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants.** *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 13407-13417.

Ray, S., CHOUDHURI, M.A. (1981). **Mobilization of Metabolites from Leaves to Grains as the Cause of Monocarpic Senescence in Rice.** *Plant Physiology*, 68: 1345-1348.

RiceTFDB (2009). **Rice Transcription Factor Database** , <http://ricetfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.1/>.

Robatzek, S., Somssich, I.E. (2002). **Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense.** *Genes and Development*, 16:1139–1149.

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

Tanaka, N., Fujita, M., Handa, H., Murayama, S., Uemura, M., Kawamura, Y., Mitsu,i T., Mikami, S., Tozawa, Y., Yoshinaga, T., Komatsu, S. (2004). **Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments.** *Molecular Genetics and Genomics*, 271(5):566-76.

Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J., (2006). **A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat.** *Science*, 314: 1298-1301.

van Wijk, K.J., Peltier, J.B., Giacomelli, L. (2007). **Isolation of chloroplast proteins from Arabidopsis thaliana for proteome analysis.** *Methods in Molecular Biology*, 355: 43-8.

Vert, G., Briat J.F., Curie, C. (2001). **Arabidopsis IRT2 gene encodes a root periphery iron transporter.** *Plant Journal*, 26: 181–189.

von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A., Hider, R.C. (1999). **Nicotianamine chelates both FeIII and FeII: implications for metal transport in plants.** *Plant Physiology*, 119: 1107–1114.

CAPÍTULO I

ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NA SENESCÊNCIA FOLIAR E NA REMOBILIZAÇÃO DE FERRO PARA O GRÃO DE ARROZ EM DESENVOLVIMENTO

Resumo

VITAL, Camilo Elber, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Estudo de genes envolvidos na senescência foliar e na remobilização de ferro para o grão de arroz em desenvolvimento.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Antônio Costa de Oliveira.

A folha bandeira tem um importante papel no fornecimento de nutrientes para o grão. O melhor entendimento do processo de senescência da folha bandeira e remobilização de nutrientes para o grão poderá ser importante para produzir plantas enriquecidas nutricionalmente. Desta forma, analisou-se a influência da remoção da panícula na senescência e na expressão de genes relacionados com o processo de senescência foliar e com a translocação de nutrientes na folha bandeira em duas cultivares de arroz. Adicionalmente, realizou-se uma análise *in silico* (dados de microarranjos) da expressão dos transportadores de ferro da família “Yellow Stripe” (YS) e também foram verificados possíveis elementos cis presentes na região promotora destes genes. Genes relacionados com senescência foliar tiveram expressão diferenciada na folha bandeira durante o desenvolvimento reprodutivo. Dois dos fatores de transcrição analisados (OsNAP e OsNAC like GmNAC3) apresentaram grande aumento de expressão durante a senescência da folha bandeira principalmente na fase final de enchimento do grão comparados com a folha não senescente. A remoção da panícula causou diminuição na expressão destes genes na folha bandeira. Um dos mais bem caracterizados genes da família YS (OsYSL2) teve maior expressão no estágio leitoso no genótipo IRGA 417. Este fato, aliado a maiores níveis de OsNAAT1 na folha bandeira e a maior expressão de OsYSL2 e OsNAS3 no estágio leitoso no grão, podem sugerir o maior teor de ferro neste genótipo. A análise *in silico* de dados de microarranjos em grãos mostrou que alguns genes dentro da família YS, OsYSL6, OsYSL13 e OsYSL5 têm expressão relativamente alta durante todo processo de enchimento do grão, enquanto outros genes (OsYSL18, OsYSL1, OsYSL15, OsYSL4 e OsYSL12) têm aumento somente no estágio pastoso. Genes da família OsNAS e OsNAAT envolvidos na via de síntese de queladores de ferro para o transporte mediado por genes YS tiveram expressão maior no estágio leitoso durante o enchimento do grão. Os 18 genes

putativos candidatos da família YS apresentaram variadas sequências cis possivelmente relacionadas com o processo de senescência foliar incluindo elementos responsivos a ácido abscísico, auxina, ácido salicílico, jasmonato e etileno. Desta forma, a expressão dos fatores de transcrição relacionados com senescência ou com resposta a deficiência por ferro na folha bandeira pode estar relacionada com o processo de remobilização de nutrientes durante o enchimento dos grãos. Da mesma forma, a expressão no grão de genes transportadores de ferro, quanto de genes envolvidos na síntese de queladores durante a senescência foliar contribuiria para o processo.

Abstract

VITAL, Camilo Elber, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Brazil, February 2010. **Study of genes involved in senescence and remobilization of iron to the rice grain in development.** Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Antônio Costa de Oliveira.

The flag leaf has an important role in providing nutrients to the grain. Better understanding of the process of flag leaf senescence and nutrient remobilization to the grain may be important to produce nutritionally enriched plants. Thus, was analyzed the effect of panicle removal on senescence and the expression of genes related to the leaf senescence process and the nutrients translocation in the flag leaf of two rice cultivars (BR-IRGA 409 and IRGA 417). Additionally, we carried out an *in silico* analysis (microarray data) of the expression of iron transporters of the Yellow Stripe family (YS) and were also checked possible cis elements present in the promoter region of these genes. Senescence-related genes had differential expression in flag leaves during reproductive development. Two of the transcription factors analyzed (OSNAP and OsNAC like GmNAC3) showed a large increase of expression during senescence of flag leaves mainly at the final stage of grain filling compared with no senescent leaves. The removal of the panicle caused a decrease in the expression of these genes in flag leaf. One of the well-characterized genes of YS family (OsYSL2) had higher expression in the milky stage of IRGA 417 genotype. This fact, coupled with higher levels of OsNAAT1 in the flag leaf and the greatest expression of OsYSL2 and OsNAS3 in the milky stage in the grain, may suggest the higher iron content in this genotype. *In silico* analysis of microarray data in grains showed that some genes within the YS family, OsYSL6, OsYSL13 and OsYSL5 have relatively high expression during the whole process of grain filling, while other genes (OsYSL18, OsYSL1, OsYSL15, and OsYSL4 OsYSL12) have increased only in the dough stage. OsNAS and OsNAAT genes involved in synthesis of iron chelators for the transport mediated by YS genes had higher expression in the milk stage during grain filling. The 18 putative candidate genes of YS family showed various cis sequences possibly related to the process of senescence including responsive elements to abscisic acid, auxin, salicylic acid, jasmonate and ethylene. Thus, the expression of transcription factors related to senescence or response to iron

deficiency in the flag leaf can be related to the remobilization of nutrients during grain filling. Likewise, the expression in the grain of iron transporter genes or involved in the synthesis of chelators during leaf senescence contribute to the process. The best elucidation of the regulation of transcription factors linked to leaf senescence and its relationship with genes involved in the remobilization of nutrients may be of great importance for the development of plants that aimed remedy the problems of human nutritional deficiency.

1 - Introdução

O arroz é um dos cultivos agrícolas de maior importância para a alimentação humana sendo consumido por mais da metade da população do planeta, além de ser grande fonte de calorias. No entanto, grande parte da população sofre de problemas relacionados com a falta de nutrientes como o ferro por exemplo. Desta forma, estudos que visem o incremento de nutrientes nos grãos de arroz podem contribuir enormemente para sanar problemas relacionados com deficiência nutricional.

Remobilização de reservas de metais a partir de folhas e cascas para suprir as sementes tem sido estimada em um estudo recente e representa no máximo 40% do conteúdo em sementes de *Arabidopsis* (Waters e Grusak, 2008). Estudos vêm demonstrando que a folha bandeira presente no eixo da panícula desempenha um importante papel na remobilização de nutrientes para o grão de arroz em desenvolvimento. A folha bandeira emerge como a última folha no desenvolvimento reprodutivo, mas sua senescência ocorre anteriormente em relação a outras duas folhas situadas também abaixo do eixo da panícula. A remoção da panícula leva a um retardo no processo de senescência da folha bandeira sugerindo que o órgão reprodutivo seria um sinal inicial desencadeador do processo (Ray *et al.*, 1981; Biswas *et al.*, 1980) e, durante o enchimento do grão de arroz, a folha bandeira é responsável pelo fornecimento de grande parte dos nutrientes para a panícula mais próxima (Grusak e DellaPenna, 1999 apud Narayanan *et al.*, 2007).

A senescência foliar e a remobilização de nutrientes são processos altamente complexos e regulados sendo governada basicamente pela idade de desenvolvimento da folha. No entanto, outros fatores como sinais internos (hormônios e desenvolvimento reprodutivo) e ambientais (fatores bióticos e abióticos) podem atuar. Vários genes, codificantes para fatores de transcrição, tem expressão alterada na senescência foliar em *Arabidopsis*. Os principais fatores de transcrição são pertencentes à família WRKY e NAC (Lim *et al.*, 2007).

O mecanismo envolvido na absorção e translocação de ferro em arroz tem sido caracterizado. Os genes pertencentes à família de transportadores

denominados de “Yellow Stripe” desempenham importante papel, tanto na absorção de Fe^{+3} -fitossideróforos nas raízes, quanto no transporte de ferro quelado a nicotianamina ou ácido desoximugineico no interior das plantas (Koike *et al.* 2004)

O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão de genes relacionados com o processo de senescência na folha bandeira em dois genótipos de arroz com presença ou ausência de panícula. Da mesma forma, genes relacionados à homeostase de ferro foram analisados na folha bandeira e em grãos em desenvolvimento, além de caracterizar os principais elementos cis presentes na região promotora de genes YS.

2 - Material e Métodos

2.1 - Material vegetal

Foram utilizadas as cultivares de arroz irrigado BR-IRGA 409 e IRGA 417 contrastantes quanto ao acúmulo de ferro nos grãos (Mendes, 2009). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa/MG. As plantas foram germinadas em papel GERMITEST® e permaneceram em estufa incubadora (BOD) a 26°C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 100% por 5 dias (120 horas). Após o período de germinação as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 5 Kg de terra onde permaneceram até atingirem a idade reprodutiva (cerca de 120 dias). Tal como no cultivo em campo, o solo permaneceu alagado durante todo o experimento (figura 1).



Figura 1 – Plantas de arroz das cultivares BR-IRGA 409 e IRGA 417 em casa de vegetação no início do desenvolvimento reprodutivo.

O experimento foi conduzido com plantas em que a panícula permaneceu intacta e com plantas em que houve a remoção da mesma de modo a analisar o efeito na expressão gênica. Coletas foram feitas em quatro diferentes estádios de maturação do grão: inicial, leitoso, pastoso e pré-maduro ou, respectivamente, R2, R6, R7 e R8 (Counce et al., 2000). No primeiro estágio (R2), ocorre o desenvolvimento inicial da panícula dentro da bainha da folha bandeira. Neste estágio, ocorre expansão total e formação do colar da folha bandeira (figura 2). Os dois estádios seguintes, R6 e R7 estão relacionados à consistência do grão e o último estágio (R8) está relacionado a maturação final do grão e amarelecimento das folhas. Como o processo de maturação não ocorre de maneira simultânea, houve o monitoramento do desenvolvimento das plantas de forma individualizada e sempre foram amostradas a primeira folha bandeira e panícula a surgirem em cada planta. A remoção da panícula foi feita no estágio R3 de desenvolvimento do grão em que o ápice da panícula está logo acima do colar da folha bandeira. Em plantas sem panícula, não é possível monitorar o desenvolvimento do grão, desta forma, as coletas foram realizadas de acordo com o tempo médio necessário para atingir cada estágio de desenvolvimento. O experimento foi montado em

um delineamento totalmente ao acaso num esquema fatorial de 2 x 4 (2 cultivares x 4 estádios x 4 repetições).

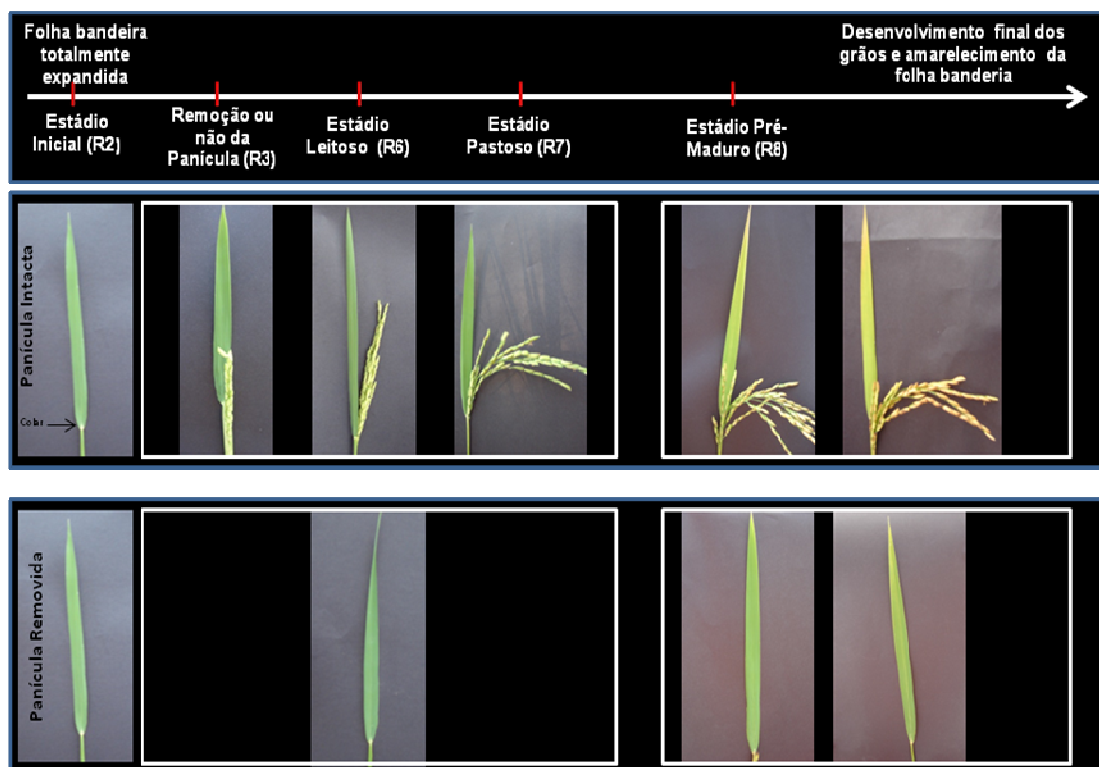


Figura 2 – Estádios de desenvolvimento do grão e da folha bandeira de acordo com a classificação de Counce et al. (2000).

2.2 - Análise de teor de clorofila e de nutrientes

O medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development, Minolta) foi utilizado para as medidas indiretas de clorofila (Índice de clorofila) em valor SPAD, que avalia a intensidade da cor verde na folha determinada por meio da medida de refletância e da absorção da luz pelas folhas. Foram feitas medições em três regiões da folha bandeira (base, meio e ápice) para cada estágio de desenvolvimento do grão e também de três em três dias nas folhas bandeira de plantas que chegaram ao último estágio de desenvolvimento (R8).

Sementes de plantas (4 repetições) que atingiram o amadurecimento completo dos grãos foram analisadas por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivo (ICP-MS) na Universidade de Purdue (Indiana , EUA).

2.3 - Expressão diferencial de genes relacionados ao processo de senescência e homeostase de ferro.

Genes que codificam fatores de transcrição WRKY e NAC relacionados com o processo de senescência foliar ou genes relacionados com a homeostase de ferro nas plantas foram escolhidos para a análise de expressão na folha bandeira e no grão de arroz.

As seqüências dos genes foram obtidas do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para os genes que não são caracterizados em arroz, foi feita uma busca por homologias usando-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Os oligonucleotídeos específicos para cada gene foram desenhados usando o programa PRIMER-Express (tabela 1).

Amostras de quatro repetições de folha bandeira e de grão correspondentes, respectivamente, a quatro e a três estádios de desenvolvimento do grão foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C para uso futuro. Não houve a coleta de grão no estágio inicial, pois a panícula ainda encontrava-se envolta pela bainha foliar.

As extrações de RNA foram realizadas com o reagente TRIZOL® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando-se oligonucleotídeo poli-dT como iniciador e a enzima transcriptase reversa (Superscript®, Invitrogen), segundo manual técnico do fabricante.

Tabela 1 – Genes analisados com os respectivos primers utilizados.

Genes	Identificação do transcrito no NCBI	Primers Fw/Rv 5'-3'	Tm °C Fw/Rv
OsYSL2	AB126253	TCTGCTGGCTTCTTTGCATTT/ CGTGGCAAGAAGTCCCTCAT	59/59
OsNAS1	AB021746	CATTTTCAACTATAATCCACCACAACCTC / TTGTTCCCAACCGCGACA	59/59
OsNAAT1	AB182275	CGAGCCGCGTTCAACA/ CCAGCCCTTCTCAGGAATAAGA	59/58
OsNAP	NP 912423/Ac126222	TGCCCCGTCTCCATCATC/ GTCCCACGGATCGAACTTGT	59/58
OsNAC5	AK063399	GCTCTCCAAGTCCTCCCACAA / GATTCCGGCACAACACCCAAT	60/59
OsNAC1	AK108080	AAAGAGACAAATCACAAGAGAACGAA/ TTCACTTGGGTTCAAGAATATTTTCA	59/59
OsNAC like GmNAC3	AK069257	TGCCCCGTGCCAATCA / AAGGTCCCATGGGTTGCA	60/58
OsWRKY45	AK066255	CCAGGCATGGCGCAAGT / CCTTTGGGTGCTTGGAGTTTT	60/59
OsIDEF1	AK107456	CGTCCATGGCACCGAATATT / TGGCAGATATGGGTCTTCTATG	59/59
OsIDEF2	AK099540	AGGCTGAAGCTCATGCTTTTTG / AGCCCTGCAATTTCAATTGTACA	58/58
OsUBQ5	AK061988	ACCACTTCGACCGCCACTACT / ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	62/61
Os18S	NC_007886	GGAATCGGAATAGTTGAG / TCATTGGCTTGGTCAGCC	58/59
OsEF-1α	AK061464	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT / GACTTCCTTCACGATTTCAATTCGTAA	61/62

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nas reações utilizou-se a enzima Platinum Taq (Invitrogen), SYBR® green

(Applied Biosystems) e ROX (Invitrogen) para um volume final de reação de 20 μ L . A concentração final de primers foi de 200 nM .

O método utilizado para o cálculo da expressão relativa foi o método comparativo ΔC_T considerando-se uma diferença máxima de eficiência de 10% entre o gene de interesse e o controle endógeno. Para a validação dos primers, foi montada uma curva usando-se cinco diluições de cDNA . Calculou-se a eficiência de amplificação segundo a fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$, no qual, o slope é a inclinação da curva dos valores de CT em relação ao log da quantidade de amostra. As curvas de desnaturação dos produtos de amplificação do primer também foram analisadas em caso de amplificação de produtos inespecíficos. Foram testados três primers para uso como controle endógeno: OsUBQ5, OsEF1 alfa e 18S. A escolha do mais estável foi realizada utilizando-se o programa geNorm v3.4 (Vandesompele et al. 2002). Devido a variações decorrentes das repetições biológicas, os dados de CT obtidos foram normalizados de forma a diminuir os desvios (Willems et al., 2008). A obtenção da expressão relativa ($\Delta\Delta C_T$) foi obtida mediante a comparação com o estágio inicial de desenvolvimento do grão, no qual a folha bandeira está totalmente expandida (não senescente).

2.4 - Análise *in silico* da expressão de genes YS, NAAT e NAS

As famílias gênicas Yellow Stripe, nicotianamina sintase e nicotianamina aminotransferase (NAAT) foram analisadas em experimentos de microarranjos através da ferramenta “Genevestigator” (www.genevestigator.com). Genevestigator é um banco de dados de expressão gênica de alta qualidade, curados manualmente e um sistema de meta-análise, ou seja, permite que o resultado de vários experimentos de microarranjos sejam agrupados e analisados como um único experimento.

Para a análise dos genes foi selecionado apenas um experimento denominado de “Expression data for reproductive development in rice” (Jain et al. 2007) dentre os vários disponíveis depositados no Genevestigator. Os tecidos analisados neste experimento foram raízes de plântulas com sete dias

após germinação e o órgão reprodutivo de arroz em três estádios de desenvolvimento (formação da panícula, grão no estágio leitoso e grão no estágio pastoso).

2.5 - Presença de elementos cis na região promotora de genes YS

A região promotora dos genes da família YS foi analisada em busca de elementos cis reconhecidos por fatores de transcrição que podem ser expressos durante o processo de senescência foliar. Para estas análises, foi usado o portal PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

A probabilidade de encontrar os cis elementos nos genes Yellow Stripe foi calculada. Cada um dos elementos cis encontrados nos 18 genes putativos da família Yellow stripe foram analisados quanto à presença na região promotora de 26422 genes de arroz utilizando-se para isso o software “SSR Locator” (Maia et al, 2008). Nas análises utilizou-se sequências de 1000pb do promotor da mesma fita em que são encontrados os genes. O número total de elementos cis presentes em todos os genes foi utilizado para calcular a média e o desvio padrão em que o elemento cis aparece no promotor dos genes. Com estes dois valores mais o número de presenças de determinado cis elemento em um determinado gene da família YS, por exemplo, é possível obter um “score” padronizado (score z) a partir da fórmula $z = (X - m) / s$, onde, neste caso, X é o número de presenças dos cis elemento no promotor, m é a média amostral e s é o desvio padrão. O “score z” indica quanto acima ou abaixo da média um “score” está em termos de unidades padronizadas de desvio. Com o auxílio de uma tabela z encontra-se a probabilidade deste elemento estar presente na região promotora do gene. Neste trabalho considerou-se que probabilidades menores que 5% significa uma importância da presença do elemento cis na região promotora dos genes estudados.

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Análises de nutrientes em grãos de arroz

A análise do teor de nutrientes por ICP-MS nos grãos maduros permitiu observar que há diferenças significativas entre os dois genótipos (tabela 2) como havia sido constatado em experimentos anteriores. O teor de ferro nos grãos do genótipo IRGA 417 mostrou-se significativamente maior em relação ao genótipo BR-IRGA 409. Diferenças também para outros nutrientes (Na, S, K, As, Rb e Mo) foram obtidas. Estes resultados demonstram certa variabilidade entre estes genótipos quanto ao acúmulo de nutrientes como foi também demonstrado por Mendes, 2009.

Tabela 2 – Análise do teor de nutrientes (ppm) em grãos maduros das cultivares IRGA-417 e BR-IRGA 409. Médias seguidas por letras diferentes mostraram diferenças significativas (teste t, 5%).

	Na	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Co
BR IRGA 409	9.90 a	1314.63 a	3296.14 a	1076.80 b	2589.84 b	72.42 a	34.25 a	9.10 b	0.0266 a
IRGA 417	8.22 b	1418.52 a	3613.20 a	1226.43 a	3034.97 a	71.02 a	44.69 a	10.02 a	0.0290 a

	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd
BR IRGA 409	1.29 a	3.29 a	20.46 a	0.0068 b	12.24 b	0.2723 a	0.076 b	0.0116 a
IRGA 417	1.09 a	3.44 a	21.37 a	0.0095 a	18.13 a	0.2925 a	0.0854 a	0.0148 a

3.2 - Teor de Clorofila

O teor de clorofila (Índice SPAD) na folha bandeira aumenta nos primeiros dias em relação ao estágio inicial e tende a diminuir 20 dias após expansão da folha bandeira (figura 3). Correlacionando o teor de clorofila da folha bandeira com o desenvolvimento dos grãos, verifica-se que do estágio inicial (R2), folha não senescente, no qual há expansão foliar completa, até o estágio leitoso (R6) está havendo aumento dos níveis de clorofila e que, a partir daí, inicia-se a queda. Desta forma, devido ao fato de os cloroplastos e, portanto, as clorofilas serem os primeiros a degradarem no processo de

catabolismo numa folha senescente (Lim *et al.*, 2007) , pode-se considerar que nos genótipos estudados, o estágio leitoso de desenvolvimento dos grãos marca o início do processo de senescência da folha bandeira.

Quando se analisa as plantas que tiveram a panícula removida, observa-se que ocorre um decréscimo no teor de clorofila, mas de forma menos acentuada em relação às plantas com panícula intacta. Isso foi evidenciado principalmente no genótipo IRGA-417. No entanto, nas análises realizadas exatamente nos quatro estágios de desenvolvimento do grão, esta diferença no teor de clorofila da folha bandeira entre plantas com panícula intacta e removida é evidente em ambos os genótipos quando se analisa o último estágio de desenvolvimento (Figura 4).

Tem sido observado que a folha bandeira, apesar de ser a última folha a se desenvolver, durante a formação do grão, sua senescência ocorre anteriormente em relação a outras folhas situadas abaixo do eixo da panícula e a remoção deste órgão reprodutivo atrasa a senescência da folha bandeira (Ray *et al.*, 1981; Biswas *et al.*, 1980). Desta forma, o desenvolvimento do órgão reprodutivo estaria funcionando como um sinal inicial para desencadear o processo e que a remoção do mesmo causaria um retardo da senescência da folha bandeira. Além disso, durante o enchimento do grão de arroz, a folha bandeira é responsável pelo fornecimento de grande parte dos nutrientes para a panícula mais próxima (Grusak e DellaPenna, 1999 apud Narayanan *et al.*, 2007).

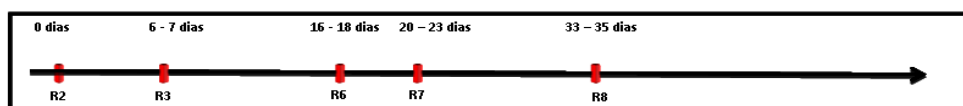
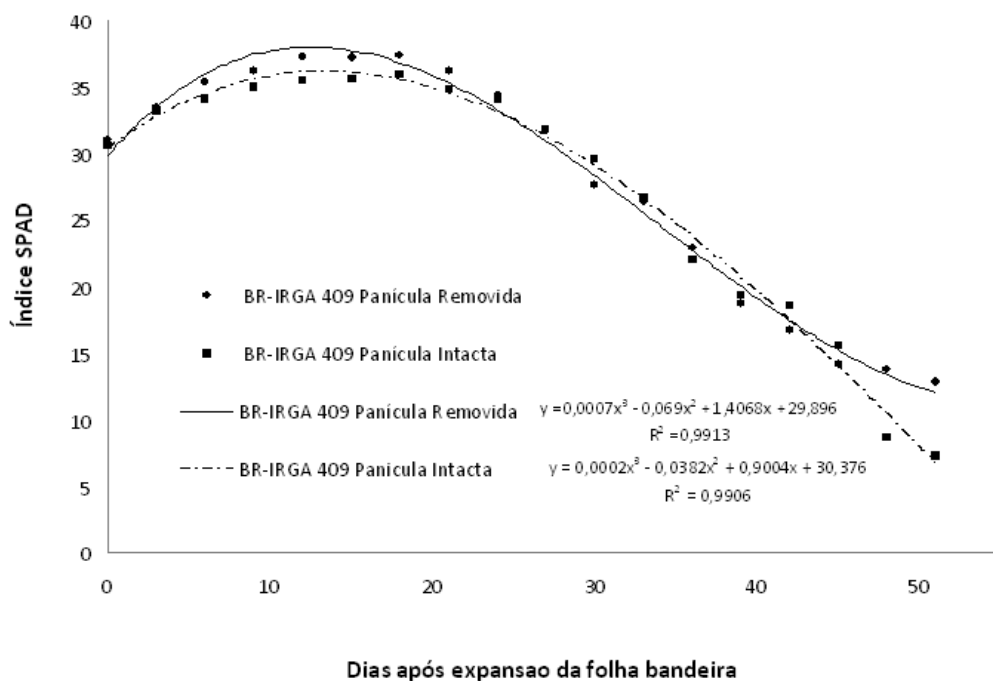
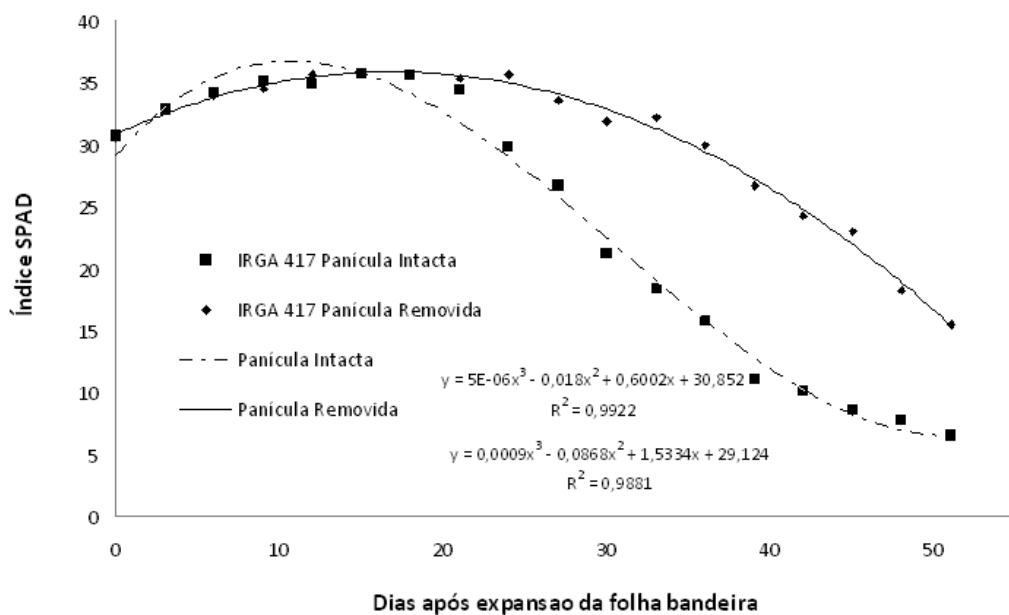


Figura 3 - Análise do teor médio de clorofila da folha bandeira dos genótipos IRGA 417 e BR-IRGA 409, ambos com panícula intacta e removida, medidos com SPAD a cada três dias após expansão da folha bandeira. Foram utilizadas 4 repetições para obtenção da média. A escala (abaixo) mostra a faixa de tempo

necessária para atingir cada estágio (R2-Inicial, R3, R6-Leitoso, R7-Pastoso e R8-Pré-Maduro).

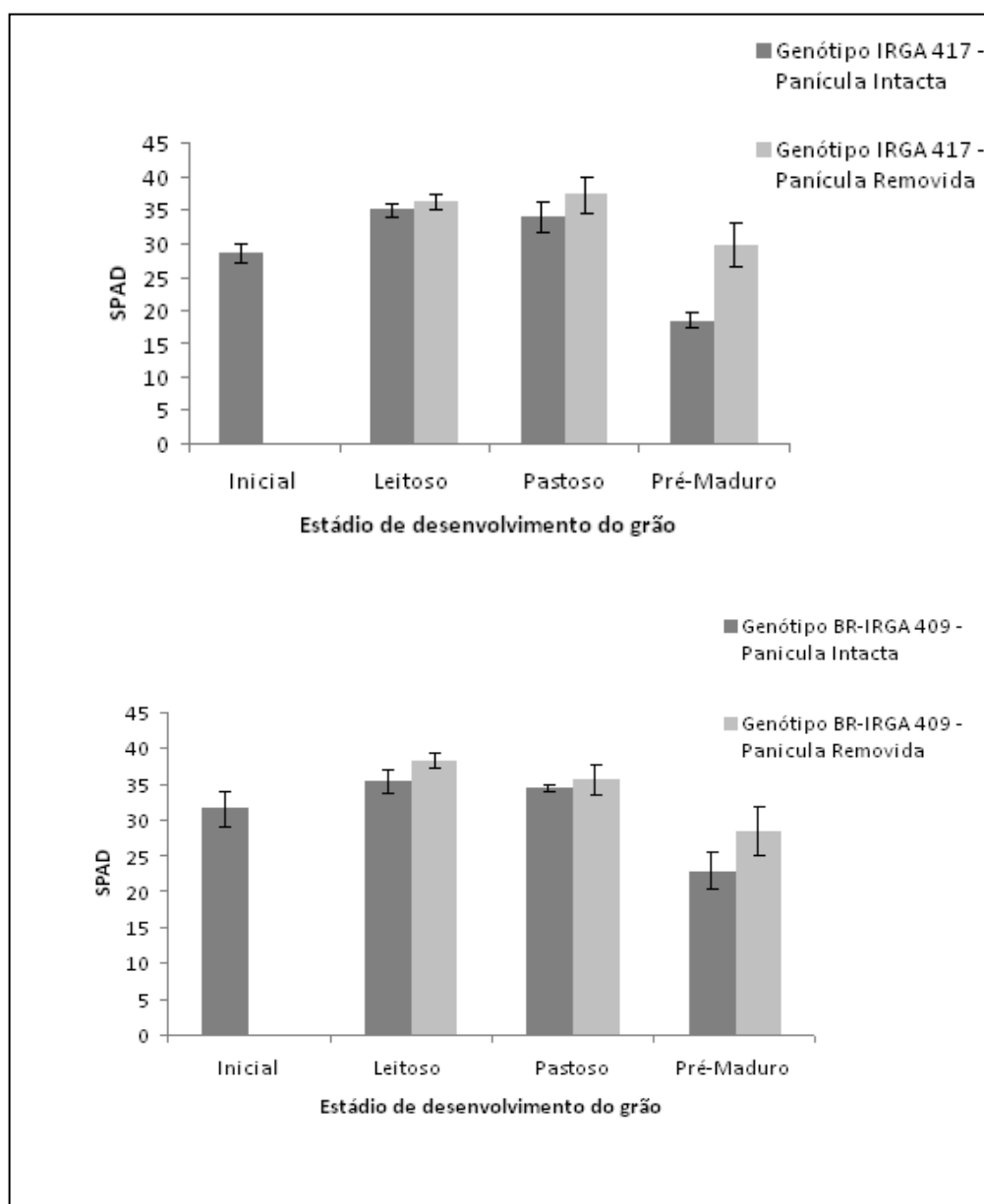


Figura 4 - Análise do teor médio de clorofila da folha bandeira dos genótipos BR-IRGA 409 e IRGA 417, ambos com panícula intacta e removida, medidos com SPAD nos quatro estádios de desenvolvimento. Foram utilizadas 4 repetições para obtenção da média. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

3.3 – Expressão diferencial de genes relacionados ao processo de senescência e homeostase de ferro.

Genes caracterizados em relação ao processo de senescência foliar ou com a homeostase de ferro em plantas tiveram sua expressão analisada em folha bandeira de arroz em quatro estádios de desenvolvimento do órgão reprodutivo (inicial, leitoso, pastoso e pré-maduro). Os resultados de expressão são relativos ao estágio inicial de desenvolvimento. O controle endógeno utilizado para folhas foi OsUBQ5 já que foi o mais estável (anexo 1). Já em grãos utilizou-se o gene OsEF-1 α como controle endógeno. A eficiência de cada gene encontra-se no anexo 2.

O gene OsNAP pertence a uma das maiores famílias de fatores de transcrição relacionadas com a senescência foliar denominada de NAC. A expressão deste gene foi induzida em ambos os genótipos quando comparado com o estágio inicial (estádio R2) de desenvolvimento, folha não senescente, principalmente no último estágio em que a expressão aumentou em média 17 vezes no genótipo IRGA 417 e mais de 150 vezes no genótipo BR- IRGA 409 (figura 5). Diferenças entre plantas com remoção ou não da panícula foi detectada em ambos os genótipos. Constatou-se que, o retardo da senescência da folha bandeira devido a remoção da panícula provoca uma menor expressão de OsNAP. Diferenças entre genótipos também foram constatadas embora o padrão de senescência foliar tenha sido similar (figura 3 e 4). Estudos com o ortólogo deste gene em *Arabidopsis* usando mutantes por inserção T-DNA resultou em atraso da senescência foliar e a reintrodução do gene no genótipo mutante restabeleceu o fenótipo selvagem. A super-expressão deste gene levou à senescência precoce das plantas. Além disso, o ortólogo deste gene em arroz (OsNAP) e em feijão (PvNAP), além de ser expresso nestas plantas durante a senescência foliar, quando introduzidos no mutante de *Arabidopsis* também restabelecem o fenótipo normal (Guo e Gan ,2006). Isto indica que o gene OsNAP tem um papel importante no processo de senescência foliar e que sua expressão, além de ser diminuída com a remoção da panícula, é grandemente induzida na folha bandeira principalmente no estágio final de desenvolvimento do grão.

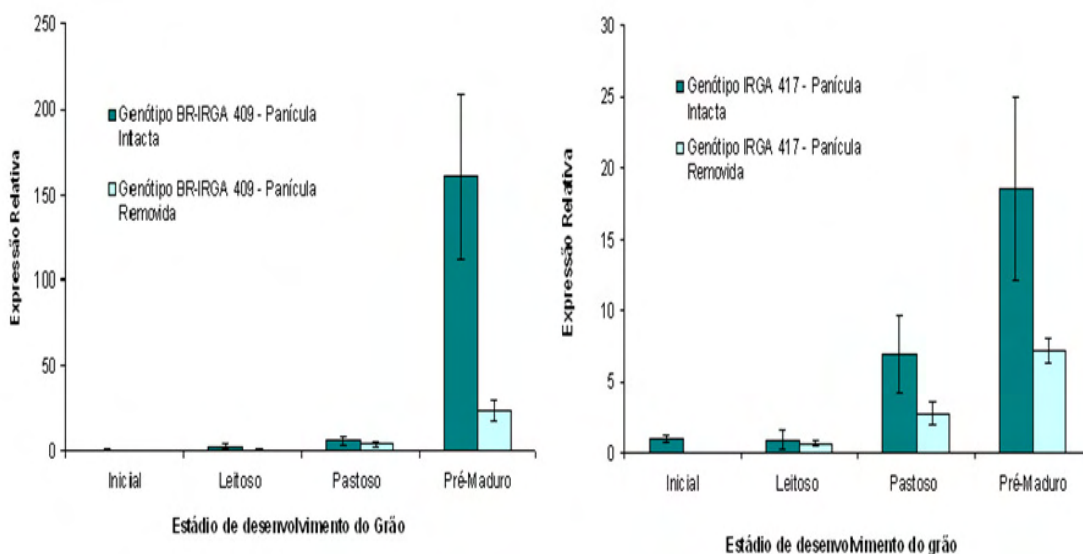


Figura 5 – Análise da expressão do gene OsNAP em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR-IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

A expressão do gene OsYSL2 no estágio leitoso do genótipo IRGA 417 mostrou-se similar em relação ao estágio inicial (figura 6) e a remoção da panícula provocou a diminuição dos níveis de OsYSL2. Devido ao fato de ser um importante transportador de ferro no floema, este gene pode estar envolvido no maior teor de ferro encontrado nos grãos de arroz do genótipo IRGA 417. No entanto, no genótipo BR-IRGA 409 observa-se que houve a diminuição da expressão de OsYSL2 nos estádios leitoso e pastoso e, no estágio pré-maduro, a expressão tendeu a aumentar havendo diferenças entre plantas com ou sem panícula somente neste estágio. A expressão deste gene no estágio inicial em ambos os genótipos indica sua importância na translocação de nutrientes para a folha bandeira em desenvolvimento, ou seja, antes de alcançar o máximo de clorofila e início da senescência (figura 3). OsYSL2 é um dos principais genes já caracterizados relacionados com o transporte de ferro a longas distâncias e foi mostrado expressar em células do floema e em sementes em desenvolvimento de arroz (Koike *et al.*, 2004). Experimento com RNAi de OsYSL2 mostrou diminuição da concentração de Fe e Mn na parte aérea de plantas no estágio vegetativo e nas sementes,

especialmente no endosperma. No entanto, o teor de ferro nas raízes aumentou. Isto indica que a expressão alterada de OsYSL2 muda a localização de Fe e que OsYSL2 é um crítico transportador Fe-nicotianamina importante para a translocação deste nutriente especialmente para a parte aérea e para o endosperma (Ishimaru *et al.*; 2010). Estes resultados indicam que a expressão de OsYSL2 pode ter importância tanto no transporte de ferro para a folha bandeira no estágio inicial de desenvolvimento do grão quanto para a remobilização deste nutriente para o grão, principalmente no estágio leitoso.

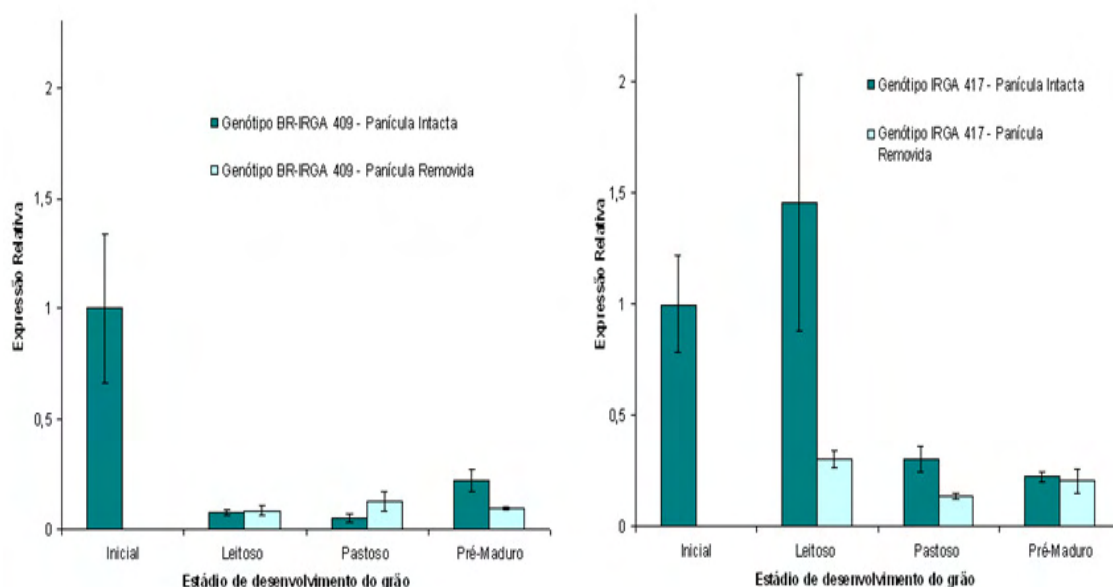


Figura 6 – Análise da expressão do gene OsYSL2 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR- IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

Houve um aumento da expressão de OsNAC like GmNAC3 na folha bandeira em ambos os genótipos no estágio pré-maduro em relação ao estágio inicial de desenvolvimento grão (figura 7). Observou-se, no entanto, que a remoção da panícula nos estádios leitoso e pastoso provocou certo aumento dos níveis de OsNAC like GmNAC3. Diferenças de expressão entre

genótipos também foram constatadas embora o padrão de senescência foliar tenha sido similar.

O gene ortólogo em soja (GmNAC3) mostrou aumento da expressão em folhas e também tem expressão induzida 25-35 dias após o florescimento durante o desenvolvimento das sementes (Meng *et al.*, 2007). Além disso, culturas de células de soja tratadas com ácido jasmônico ou ácido abscísico, induziu a expressão de GmNAC3 quando comparados ao controle (Pinheiro *et al.* 2009). Como relatado anteriormente, o papel destes hormônios no processo de senescência foliar vem sendo demonstrado. Diante do exposto, o alto nível de expressão relativa de OsNAC like GmNAC3 pode estar relacionado ao importante papel deste gene nos processos de senescência foliar mais tardia.

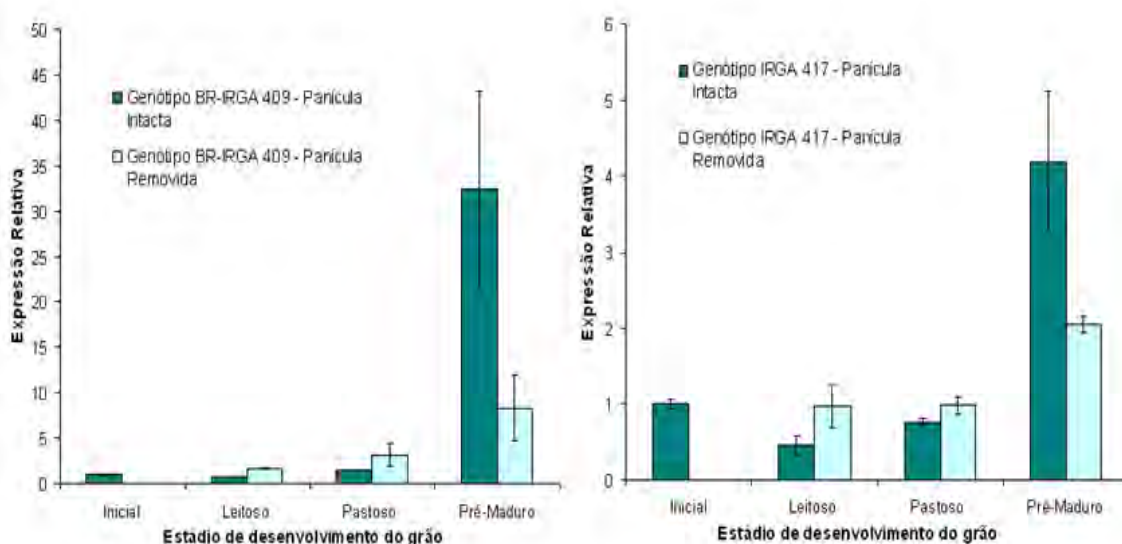


Figura 7 – Análise da expressão do gene OsNAC like GmNAC3 em folhas em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR- IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

A análise da expressão de OsIDEF1 mostrou um pequeno aumento principalmente no estágio pré-maduro em relação ao inicial. De modo geral, a remoção da panícula causou uma menor expressão deste gene (figura 8). De forma não explicada, há uma queda na expressão no estágio pastoso do

genótipo 417. OsIDEF1 é um fator de transcrição que se liga ao elemento Cis denominado de IDE1 que está diretamente relacionado a resposta à deficiência de ferro. OsIDEF1 é constitutivamente expresso em raízes e folhas de arroz. Plantas transgênicas com este mesmo gene sobre o controle do promotor IDS2 (induzível sob deficiência de ferro) ou sua super-expressão através do promoter 35S, exibiram tolerância à deficiência por ferro. Além disso, levou a um aumento da expressão de OsIRO2, um outro fator de transcrição em que sua super-expressão também está relacionada com a tolerância à deficiência de ferro. Isto sugere que a interação elemento cis/fator de transcrição está relacionado à tolerância a deficiência por ferro e que o aumento de IRO2 sugere uma rede regulatória de forma sequencial (Kobayashi et al., 2007). Desta forma, conclui-se que OsIDEF1 é induzido durante a senescência e, como um fator de transcrição, também pode desempenhar importante papel na sinalização para o transporte de ferro da folha bandeira para o grão.

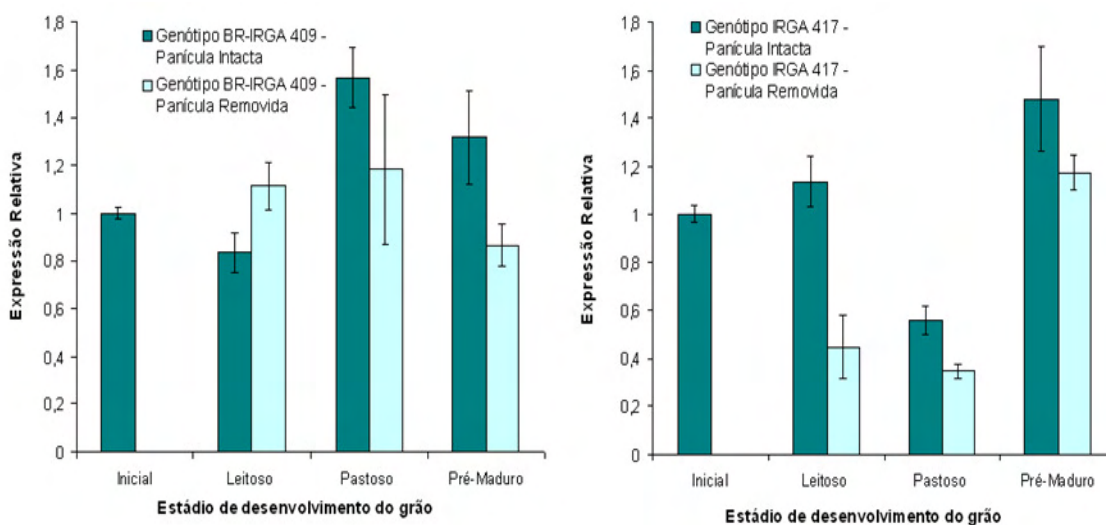


Figura 8 – Análise da expressão do gene OsIDEF1 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR-IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

O gene OsIDEF2 mostrou aumento da expressão principalmente nos estádios leitoso e pastoso em ambos genótipos. A remoção da panícula também provocou menor expressão deste gene (figura 9). O gene OsIDEF2 é um fator de transcrição da família NAC e se liga ao elemento cis IDE2 relacionado com respostas a deficiência de ferro. O silenciamento por RNAi de OsIDEF2 leva a alterações na expressão de genes relacionados com a homeostase do ferro. Vários genes tem sua expressão aumentada durante a deficiência de ferro, incluindo o gene OsYSL2, o transportador de Fe(II)-NA, foi menos induzido pela deficiência de ferro no arroz RNAi de IDEF2 sugerindo este fator de transcrição estaria envolvido na regulação destes genes. Muitos dos genes que foram regulados possuem a seqüência reconhecida por este fator de transcrição na região promotora. Experimentos de “one-hybrid” revelaram que IDEF2 se liga na região promotora do gene OsYSL2 sugerindo regulação direta deste gene (Ogo *et al*, 2008). Desta forma, o aumento da expressão de OsIDEF2 poderia explicar, no presente trabalho, o aumento da expressão de OsYSL2. No entanto, este resultado não corrobora com os resultados obtidos para o gene OsYSL2 em ambos os genótipos (figura 6) sugerindo um modo alternativo de regulação deste gene.

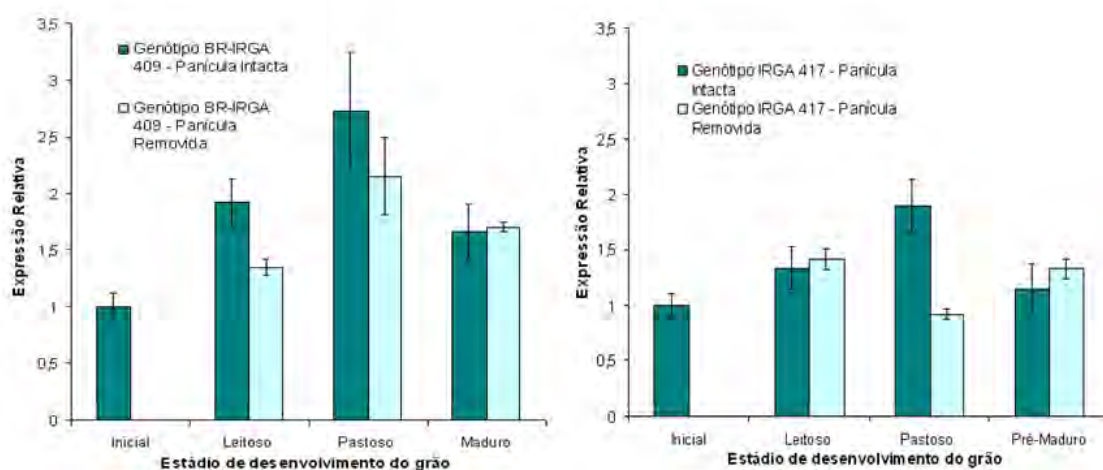


Figura 9 – Análise da expressão do gene OsIDEF2 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR-IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o

método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

O gene OsWRKY45 mostrou aumento de expressão durante o enchimento do grão em ambos os genótipos em relação ao estágio inicial (figura 10) com posterior que no estágio pré-maduro. Diferenças entre panícula removida e não removida foram detectadas. OsWRKY45 pertence a família de fatores de transcrição relacionados com senescência foliar. No entanto, este mesmo gene teve expressão aumentada na parte aérea de plantas de arroz quando sujeitos ao estresse por deficiência de ferro (Ogo *et al*, 2006). Desta forma, pode-se concluir, a partir dos resultados, que OsWRKY45 é induzido pela senescência foliar da folha bandeira e pode estar envolvido na remobilização de ferro.

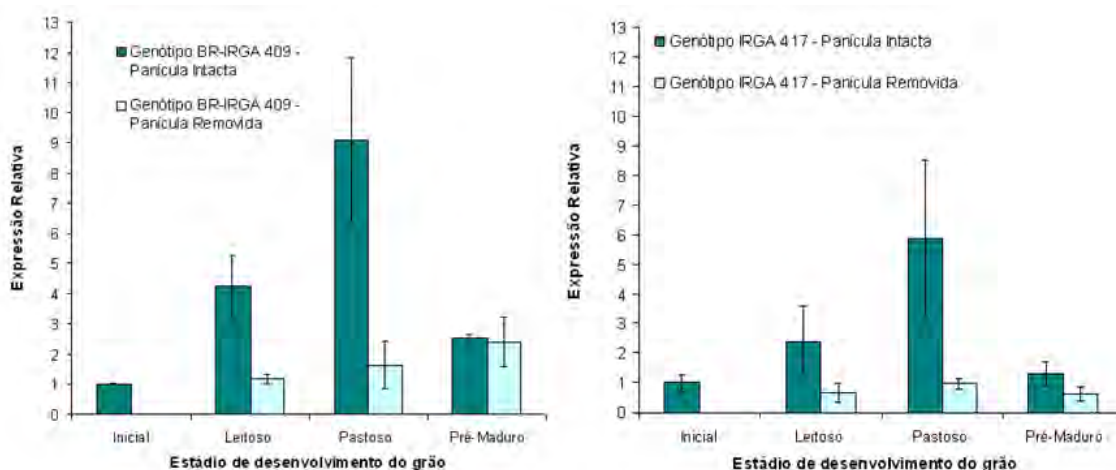


Figura 10 – Análise da expressão do gene OsWRKY45 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR- IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

Os genes OsNAC5 e OsNAC1, pertencentes a família de fatores de transcrição NAC, também têm aumento de expressão durante deficiência por ferro sendo que o primeiro tem resposta no início do estresse e o segundo após um período de 5 dias (Ogo *et al*, 2006). Desta forma, durante o processo

de enchimento do grão, há uma diferença de 6 a 7 dias (figura 3), o que pode explicar os resultados de aumento da expressão na folha bandeira do genótipo BR-IRGA 409 para o gene OsNAC1 (figura 11) no início do processo. Foram constatadas diferenças na expressão deste gene a partir da remoção da panícula em ambos os genótipos. No entanto, ao se analisar o gene OsNAC5, sua expressão na folha bandeira é mais tardia em ambos genótipos (figura 12). Além do mais, constatou-se indução da expressão a partir da remoção da panícula nos estádios leitoso e pastoso e diminuição somente no estágio pré-maduro no genótipo BR-IRGA 409. Este mesmo padrão foi encontrado no genótipo IRGA 417 com exceção que ocorreu drástica diminuição da expressão de OsNAC5 tanto em plantas com panícula intacta quanto naquelas removidas.

O gene OsNAC5 é induzido por processos relacionados com senescência como escuro, ABA, alta salinidade, frio, deficiência de ferro. A presença de elementos cis relacionados com resposta a ABA na região promotora deste gene e a maior expressão em folha bandeira e panícula de genótipos com maior concentração de ferro, zinco e proteínas nas sementes tem levado a sugerir OsNAC5 como um novo fator de transcrição relacionado com resposta a ABA e que pode estar ligado com a remobilização de nutrientes de folhas para os grãos (Sperotto *et al.* 2009). No entanto, apenas no estágio pré-maduro do genótipo BR-IRGA 409 ocorreu resposta à ligada diretamente a senescência da folha bandeira.

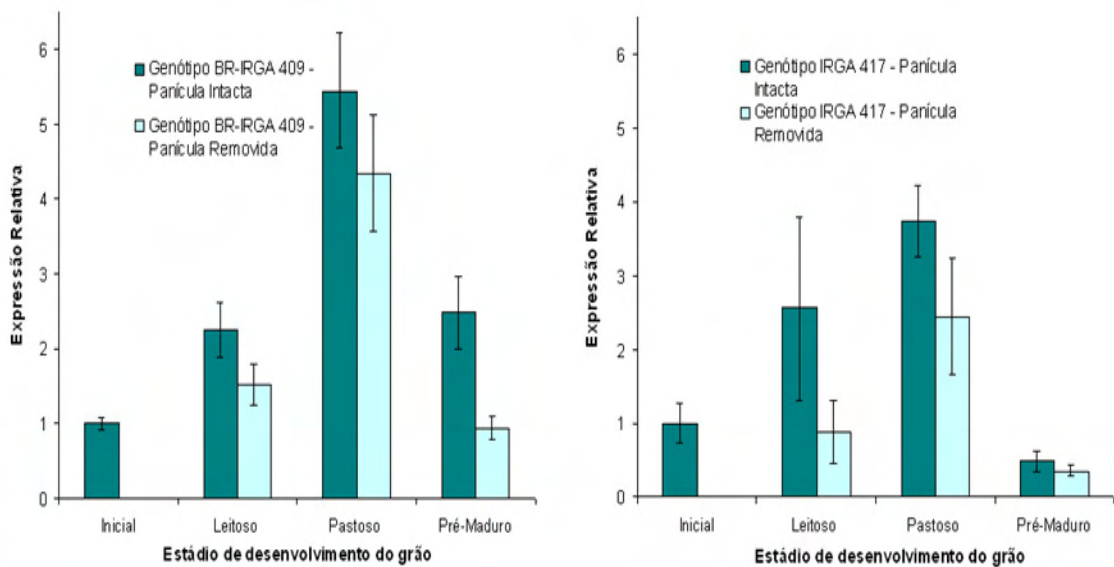


Figura 11 – Análise da expressão do gene OsNAC1 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR- IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

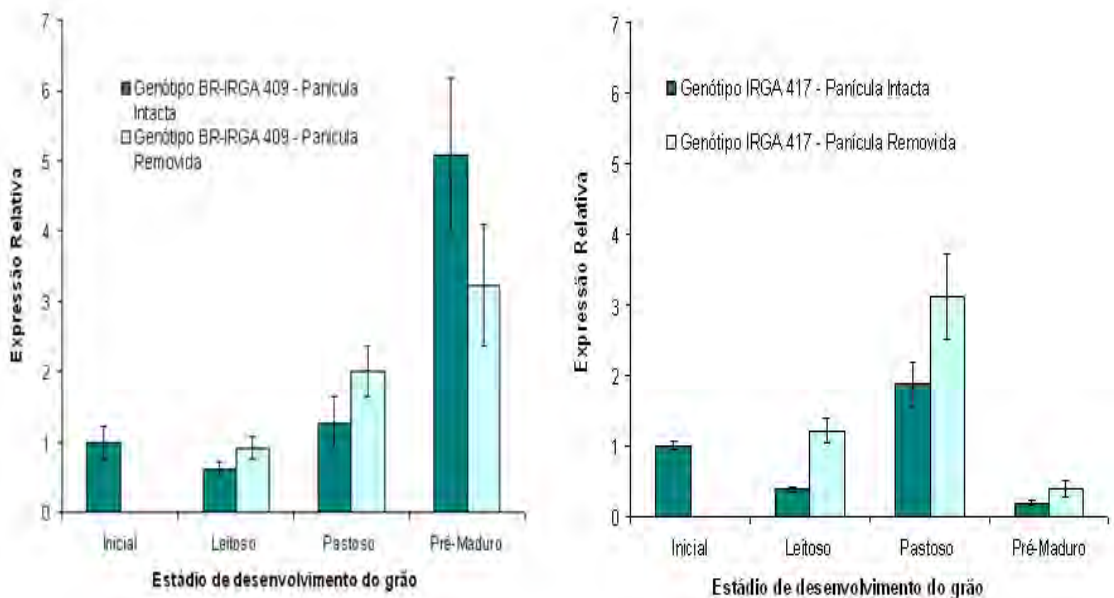


Figura 12 – Análise da expressão do gene OsNAC5 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR- IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o

método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

O gene OsNAAT1 apresentou diminuição na expressão na folha bandeira no desenvolvimento dos grãos em relação ao estágio inicial (figura 13). Para o genótipo BR-IRGA 409 ocorreu maiores níveis de OsNAAT1 nos estádios leitoso e pastoso em relação ao estágio maduro e não houve diferenças a partir da remoção da panícula. No genótipo IRGA 417 observou-se aumento da expressão de OsNAAT1 no estágio pastoso havendo diferenças com a remoção da panícula.

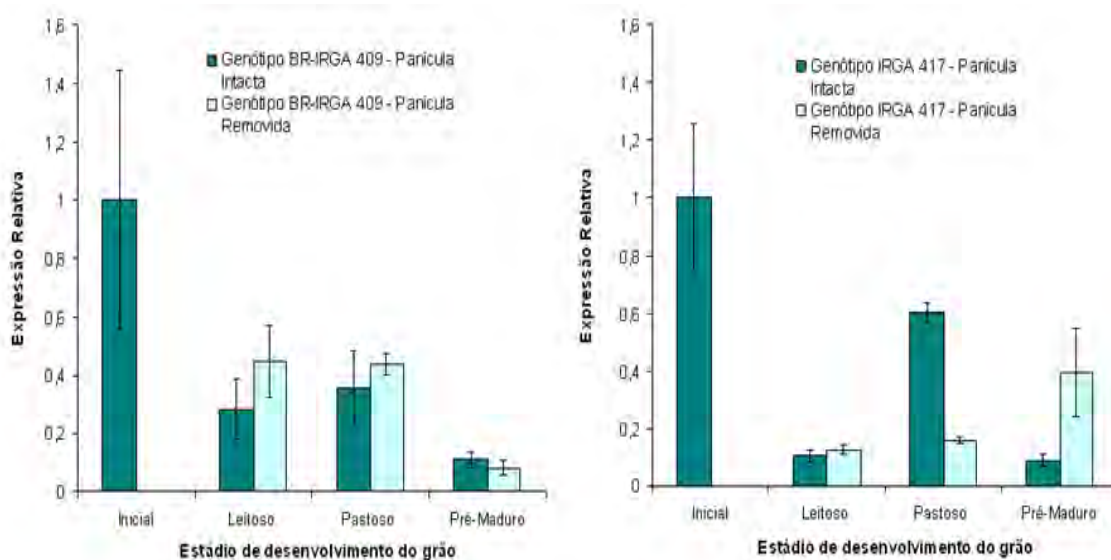


Figura 13 – Análise da expressão do gene OsNAAT1 em folhas bandeiras em diferentes períodos reprodutivos. A expressão relativa média do gene foi analisada em relação ao estágio inicial (folha não senescente) de desenvolvimento da panícula dos genótipos IRGA 417 e BR-IRGA 409 com panícula intacta ou removida. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta C_T$ ” e usou-se OsUBQ5 como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

A análise da expressão dos genes OsNAS3 e OsYSL2 em grãos nos diferentes estádios de desenvolvimento também foi realizada. Os resultados mostram uma maior expressão destes genes no estágio leitoso e tendência de diminuição nos estádios posteriores (figura 14). No estágio pré-maduro, não foi possível detectar níveis de expressão destes genes.

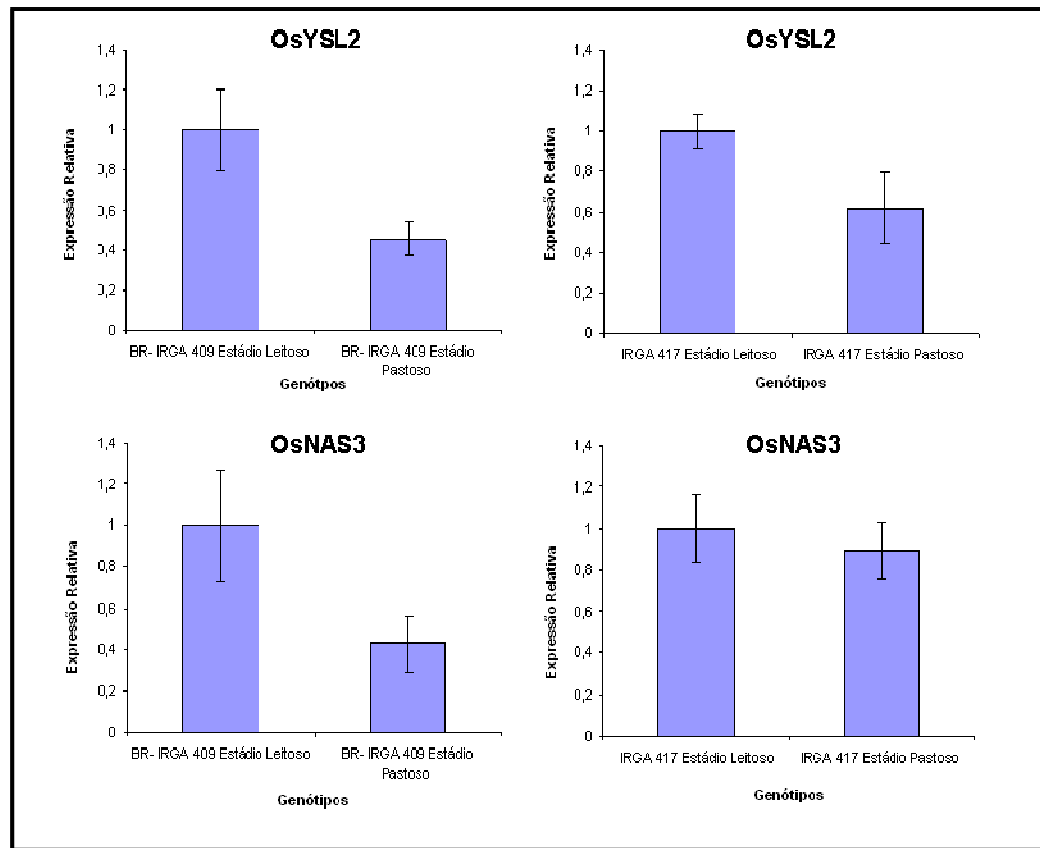


Figura 14 – Análise da expressão dos genes OsYSL2 e OsNAS3 em grãos de arroz em desenvolvimento. A expressão relativa média dos genes OsYSL2 e OsNAS3 foi analisada em relação ao estágio leitoso de desenvolvimento do grão dos genótipos IRGA 417 e BR-IRGA 409. Foi utilizado o método comparativo “ $\Delta \Delta CT$ ” e usou-se OsEF-1 α como controle endógeno. As barras nos gráficos indicam o desvio padrão.

Além dos transportadores YS que são essenciais para remobilização de ferro, outras proteínas também são indispensáveis. Proteínas codificadas pelos genes OsNAS e OsNAAT são importantes para a síntese de, respectivamente, nicotianamina e de fitossideróforos que quelam ferro e estão envolvidas no seu transporte (von Wiren *et al.*, 1999, Aoyama *et al.*, 2009). A partir da análise da expressão de OsYSL2 em folha bandeira que ocorreu de forma acentuada no estágio leitoso para o genótipo IRGA 417 (figura 6), aliada também a uma maior expressão neste mesmo estágio nos grãos, pode-se inferir a respeito dos maiores níveis de ferro nos grãos deste genótipo. Também destaca-se a importância dos queladores, representados por OsNAAT1, com maior expressão na folha bandeira no estágio pastoso, e por OsNAS3, que teve

maior expressão no estágio leitoso nos grãos. Desta forma, embora tenha ocorrido maior expressão de certos genes (OsNAP, OsNAC like Gm3) relacionados com o processo de senescência da folha bandeira no genótipo BR-IRGA 409, observa-se a importância da expressão coordenada de genes transportadores e queladores entre folha e grão de modo a determinar a quantidade final de ferro nos grãos.

3.4 - Análise *in silico* da expressão de genes relacionados a homeostase de ferro.

Dos 18 possíveis genes “Yellow stripe”, OsYSL2, OsYSL3 e OsYSL17 não foram analisados pois a ferramenta Genevestigator não identificou nenhuma das possíveis identidades do transcrito (mRNA) destes genes obtidas no NCBI e usadas como entrada para as análises.

O gene OSYSL2, embora não presente nesta análise, tem sido confirmado como de grande importância no transporte metal-nicotianamina nas plantas como discutido anteriormente. Os genes OsYSL3 e OsYSL17 ainda carecem de estudos, embora o último tenha sua expressão detectada em raízes de plântulas com deficiência ou não de ferro (Inoue *et al.*, 2009)

Os outros genes YS mostraram variados padrões de expressão quando se analisa raízes, panículas e grãos. O gene OsYSL15 tem maior expressão em raízes em relação aos outros tecidos (figura 14). Experimentos demonstraram que OsYSL15 é um dos principais genes relacionados com a absorção e transporte de ferro nas raízes tendo a expressão aumentada sob condições de deficiência de ferro. Plântulas RNAi no gene OsYSL15 mostraram impedimento na germinação e crescimento. Isto mostra a importância deste gene na homeostase nos estágios iniciais de crescimento. Além do mais, OsYSL15 tem expressão em flores e sementes em desenvolvimento (Inoue *et al.*, 2009). Também tiveram expressão elevada em raízes os genes OsYSL14, OsYSL6, OsYSL4, OsYSL5 sugerindo um possível papel na absorção ou transporte de nutrientes neste órgão.

Comparando-se os genes no grão em desenvolvimento, verificou-se que alguns, OsYSL6, OsYSL13 e OsYSL5 tiveram expressão alta nestes estágios assim como em raízes e os genes OsYSL18, OsYSL1, OsYSL15, OsYSL4 e

OsYSL12 tiveram aumento da expressão no estágio pastoso em relação ao estágio leitoso. Análises de RT-PCR revelaram mais transcritos de OsYSL18 em flores do que em raízes ou parte aérea de plântulas e análises com o promotor deste gene e GUS (B-glucuronidase) revelaram também expressão em grãos em desenvolvimento. . Constaram ainda que o transporte de ferro mediado por este gene seria de ferro-ácido deoximugineico e não ferro-nicotianamina, ao contrário do gene OsYSL2 (Aoyama *et al.*, 2009). Isto mostra a complexidade do transporte de ferro em grãos, na qual vários genes da família YS poderiam estar envolvidos e o transporte deste nutriente poderia ocorrer quelado a mais de um composto.

Os genes OsNAS1, OsNAS2, OsNAS3 estão envolvidos na síntese de nicotianamina, que não é somente uma intermediária chave para a biossíntese de fitossideróforos para a estratégia II de absorção, mas também um importante quelador de íons que pode facilitar o transporte de ferro e outros metais dentro das plantas. OsNAAT1 pertence a família nicotianamina aminotransferase e está presente na mesma via dos genes NAS relacionando-se com a produção de ácidos mugineicos (fitossideróforos) a partir de nicotianamina (von Wiren *et al.*, 1999). Os resultados mostraram expressão elevada de OsNAS1, OsNAS2, OsNAS3 e OsNAAT1 em raízes de plântulas de arroz (figura 15). Experimentos anteriores encontraram expressão destes mesmos genes em embriões de sementes em germinação, onde estariam contribuindo para a síntese e secreção de ácido mugineico para a absorção de ferro do solo (Nozoye *et al.* 2007). Desta forma, pode-se sugerir a ação destes genes atuando também nas raízes de plântulas com 7 dias após a germinação. Da mesma forma, podemos observar no órgão reprodutivo em desenvolvimento, com exceção de OsNAS1, uma maior expressão destes genes no estágio leitoso. Este resultado corrobora com a expressão de OsNAS3 em grãos encontrados nas análises de “Real Time”. Assim, pode-se sugerir que este aumento coordenado de genes NAS e NAAT induz a formação do produto final da via, os fitossideróforos, podendo assim ser a forma de Fe⁺³-ácido deoximugineico como preferencial no transporte deste nutriente no grão.

A análise da expressão gênica por “Macroarray” em folha bandeira e não bandeira durante o período de enchimento do grão revelou a expressão de

vários genes relacionados com o transporte de metais, incluindo genes da família “Yellow stripe” como OsYSL5, OsYSL6, OsYSL7, OsYSL8 e OsYSL18. Além disso, RT-PCR confirmou que OsNAAT, OsNAS1, OsYSL12, OsYSL13 também são expressos em folhas (Narayanan *et al.* 2007). Estes resultados dão suporte à participação destes genes no processo de remobilização de nutrientes das folhas para o grão durante a senescência.

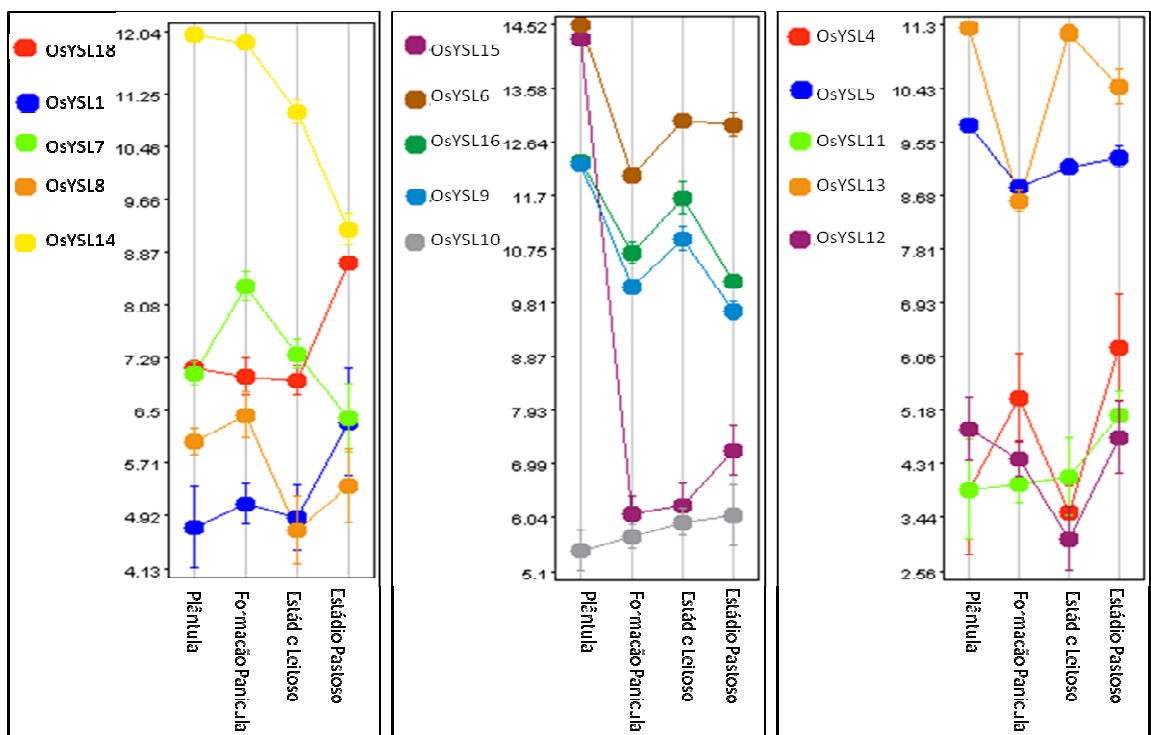


Figura 15 - Resultados das análises obtidas no Geneinvestigator para genes da família “Yellow Stripe”. Os resultados mostrados são referentes a dados de microarranjos (\log_2 da intensidade do sinal) versus o tecido (raízes de plântulas, panícula em formação, e grãos em desenvolvimento no estágio leitoso e pastoso).

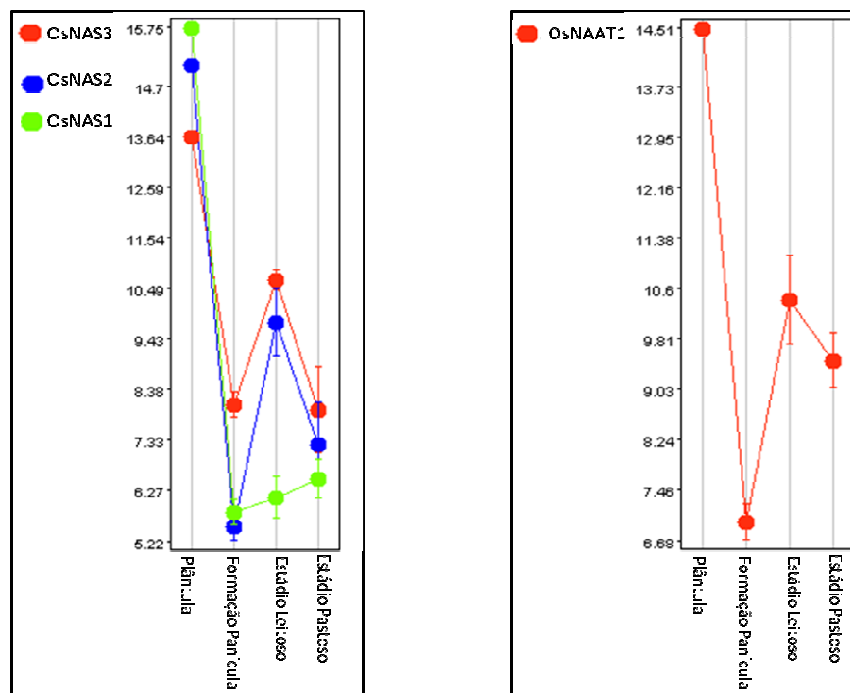


Figura 16 - Resultados das análises obtidas no Geneinvestigator para genes da família “Yellow Stripe” (YS), Nicotianamina sintase (NAS) e Nicotianamina aminotransferase (NAAT). Os resultados mostrados são referentes a dados de microarranjos (\log_2 da intensidade do sinal) versus o tecido (raízes de plântulas, panícula em formação, e grãos em desenvolvimento no estágio leitoso e pastoso).

3.5 - Análises dos elementos cis na região promotora de genes “Yellow Stripe”

Os resultados mostraram uma variedade de elementos cis presentes na região promotora de genes da família “Yellow Stripe”. Destes, são mostrados na tabela 3, apenas aqueles considerados relacionados com o processo de senescência foliar.

Na região promotora dos genes estudados foram encontrados vários elementos cis relacionados com respostas a hormônios vegetais ou a estresses bióticos e abióticos. Neste caso, ou o fator de transcrição ligante ou o próprio gene que possui o elemento cis, tem expressão alterada em resposta a estes estímulos, relatados nos experimentos citados no portal PLACE.

As vias de sinalização hormonais, frequentemente medeiam ou influenciam respostas ambientais ou no desenvolvimento das plantas. Na senescência foliar, uma interação íntima especialmente de muitas destas vias

hormonais parece está envolvido, juntamente com a senescência controlada pela idade foliar. Isto pode ser uma forma das plantas garantirem o controle adequado da senescência das folhas em resposta a sinais endógenos e/ou ambientais (Lim *et al.*, 2007).

Três genes YS (OsYSL3, OsYSL4, OsYSL11) apresentaram na região promotora o elementos cis ERELEE4 relacionado com respostas ao etileno. O hormônio etileno é conhecido como um dos principais hormônios que age acelerando a senescência de folhas e flores, como também o amadurecimento de frutos. Embora seja evidente que o etileno é um importante regulador positivo da senescência das folhas, o mecanismo molecular da ação do etileno só agora vem sendo revelado. Em muitas espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis*, ocorre o aumento no nível de etileno durante a senescência das folhas e os genes envolvidos na via de biossíntese do etileno codificando para ACC sintase e ACC oxidase tem expressão aumentada na senescência foliar. Dois dos mutantes de *Arabidopsis*, etileno-resistente 1 (*etr1*) e etileno-insensitive 2 (*ein2*), que são insuficientes na percepção de etileno e transdução de sinal, respectivamente, apresentaram significativo atrasos na senescência foliar, revelando a importância do etileno endógeno na via de sinalização como um regulador positivo na senescência das folhas (van der Graaff *et al.*, 2006).

Vários genes YS apresentaram diferentes tipos de elementos cis relacionados com ácido abscísico (ABA) como ACGTABREMOTIFA2OSEM e DRE2COREZMRAB17. Outros apresentaram cis elementos relacionados com estresses ambientais como estresse hídrico (MYB2AT, MYB2CONSENSUSAT e MYCCONSENSUSAT) e estresse por temperatura (CRTDREHVCBF2 e LTRE1HVBLT49). O hormônio ABA é conhecido como chave nas respostas das plantas a estresses ambientais. Os níveis de ABA aumentam em folhas senescentes e sua aplicação exógena induz a expressão de vários genes associados à senescência (SAGs), que é consistente com o efeito sobre a senescência foliar (Weaver *et al.*, 1998). Estresses ambientais como seca, concentrações elevadas de sal e baixas temperaturas positivamente afetam a senescência e, sob estas condições de estresse, o conteúdo de ABA aumenta nas folhas. (Gepstein *et al.*, 1980). Além do mais, genes que codificam enzima chave para a biossíntese de ABA, 9-cisepoxycarotenoide dioxigenase (NECD)

e dois genes aldeído oxidase, AAO1 e AAO3, têm aumento de expressão concomitante com o aumento de ABA (van der Graaff *et al.*, 2006).

Três genes YS (OsYSL1, OsYSL7 e OsYSL8) apresentaram o elemento cis relacionado com respostas a jasmonato (JA). Tanto metil-jasmonato (MeJA), quanto seu precursor JA promovem a senescência em folhas destacadas de aveia (*Avena sativa*) (Ueda *et al.*, 1980). A aplicação exógena de MeJA em folhas destacadas de *Arabidopsis* levou à rápida perda do conteúdo de clorofila e eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) e aumentou a expressão de genes associados a senescência (He *et al.*, 2002).

Ácido salicílico (SA) é o hormônio envolvido nas respostas a patógenos e morte celular. Quatro grupos de elementos cis, ASF1MOTIFCAMV, BIHD1OS, WBOXATNPR1 e WBOXNTERF3 foram encontrados nos genes YS e são caracterizados ter resposta a SA, resistências a doenças ou ferimentos. Experimentos mostraram envolvimento de SA na senescência dependente da idade foliar. A concentração de SA endógeno é quatro vezes maior em folhas senescentes de *Arabidopsis*. O alto nível deste hormônio em folhas senescentes parece estar envolvido na regulação de vários genes associados à senescência (SAGs) (Morris *et al.*, 2000). Os elementos cis encontrados da família W-box, caracterizam pela ligação de fatores de transcrição do tipo WRKY que têm mostrado importância no processo de senescência foliar (Hinderhofer *et al.*, 2001).

Vem sendo demonstrado também o papel das auxinas (IAA) no processo de senescência foliar. Os níveis de auxina e, conseqüentemente, os genes relacionados com sua síntese, sintase do triptofano (TSA1), IAAld oxidase (AO1) e nitrilases (NIT1-3) tem níveis aumentados durante a senescência foliar (van der Graaff *et al.*, 2006). A aplicação exógena de auxina reprime a transcrição de SAGs (Noh *et al.* 1999). Isto implica que o aumento dos níveis de auxina leva a um atraso da senescência foliar caracterizando este hormônio como um controlador negativo do mecanismo. Apenas os genes OsYSL1, OsYSL18 e OsYSL7 apresentaram elementos cis relacionadas com respostas a auxina (ARFAT e NODCON2GM).

Diante destes resultados, observa-se a complexidade do controle dos genes da família YS no transporte de nutrientes já que há uma variedade de elementos cis na região promotora destes genes podendo ser responsivos a diferentes hormônios. Além dos resultados encontrados, outros elementos cis e/ou fatores de transcrição, como os da família NAC e fatores relacionados com respostas a deficiência de ferro, em que o elemento cis ao qual se ligam não foi estudado, merecem atenção. Estes também podem estar envolvidos no processo de senescência e remobilização de nutrientes da folha bandeira para o grão.

Tabela 3 – Elementos Cis enriquecidos na região promotora dos genes da família “Yellow Stripe”.

Nome (PLACE ¹)	Sequência ²	Média ³	Desvio ⁴	Presença nos genes YS ⁵	Tecido / estímulo ⁶	Fator transcrição ⁷
ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGKC	0.14	0.43	6(1); 15(1)	Ácido Abscísico	
ARFAT	TGTCTC	0.19	0.45	1(1); 18(1)	Auxina	ARF
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	0.57	0.84	9(2); 10(2)	Raiz, folha/ auxina e Ácido Salicílico	ASF-1
BIHD1OS	TGTCA	1.04	1.09	1(3); 10(3)	Resistência à doenças	OsBIHD1
CRTDREHVCBF2	GTCGAC	0.14	0.41	11(1)	Temperatura (frio)	HvCBF2
DRE2COREZMRAB17	ACCGAC	0.15	0.41	6(1); 16(1)	Embrião /Ácido Abscísico	DBF1 e DBF2
ERELEE4	AWTTCAA	0.15	0.45	3(1); 4(1); 11(1)	Fruto/etileno	
ELRECOREPCRP1	TTGACC	0.22	0.48	5(1); 13(1); 14(1); 16(1)		WRKY1 e WRKY2
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	0.18	0.46	4(1)	Temperatura	
MYB2AT	TAACTG	0.16	0.42	7(1); 14(1); 17(1)	Folha/ estresse hídrico	ATMYB2
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	0.65	0.83	7(2)	Folha, semente/ estresse hídrico	
MYCONSENSUSAT	CANNTG	4.24	2.35	6(9); 7(8); 10(9)	Folha; semente/ estresse hídrico	MYC
NODCON2GM	CTCTT	1.20	1.24	7(4)	Auxina	
T/GBOXATPIN2	AACGTG	0.15	0.41	1(1); 7(1); 8(1)	Jasmonato	JAMYC2 e JAMYC10
WBOXATNPR1	TTGAC	0.93	1.05	3(3); 14(3)	Resistência a doenças/Ácido Salicílico	WRKY
WBOXNTERF3	TGACY	1.37	1.28	7(4)	Ferimento	

¹PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements);

²Sequência do elemento cis. K=G ou T; W= A ou T; Y= C ou T; N= A, C, G ou T;

³Média de presenças obtidas na análise da região promotora de 26522 genes de arroz;

⁴Desvio padrão;

⁵Gene YS onde foi verificado e o número de vezes da presença do elemento cis (parêntesis) tendo todas probabilidades menores que 5% de estarem nestes genes;

⁶Tecido onde foi relatado o elemento cis ou estímulo relacionado com a expressão do fator de transcrição ligante ou do próprio gene portador da sequência cis;

⁷Fator de transcrição ligante ao elemento cis.

4 - Conclusões

A remoção da panícula retardou a senescência da folha bandeira sugerindo um controle sobre o mecanismo de senescência normal. Na maioria dos casos foi possível detectar diferenças da expressão gênica dos genes analisados entre folha bandeira com e sem panícula.

Genes relacionados com senescência foliar tiveram expressão diferenciada na folha bandeira. Alguns dos genes (OsNAP e OsNAC like GmNAC3) tiveram expressão acentuada durante todo o processo com destaque no estágio pré-maduro. Outros genes (OsIDEF1, OsIDEF2, OsWRKY45, OsNA1 e OsNAC5) aumentaram discretamente com a progressão da senescência foliar. Em relação aos genes ligados ao transporte de ferro, gene OsYSL2 teve expressão maior no estágio leitoso no genótipo IRGA 417 e aliados a maior expressão de OsNAAT1 na folha bandeira e a maior expressão de OsYSL2 e OsNAS3 no grão também no estágio leitoso, podem explicar o maior teor de ferro neste genótipo.

A expressão da grande maioria de genes da família “Yellow Stripe” em grão e raiz de arroz a níveis diferentes indica a ação tecido-específica destes genes. A maior expressão dos genes OsYSL6, OsYSL13 e OsYSL5 durante todo o processo de enchimento do grão e o aumento da expressão dos genes OsYSL18, OsYSL1, OsYSL15, OsYSL4 e OsYSL12 no estágio pastoso indica um possível envolvimento destes genes no processo de translocação de nutrientes para este órgão. Além do mais, a expressão de OsNAS3 in silico corrobora com os dados encontrados nas análises de PCR em tempo real.

A presença de variados elementos cis na região promotora dos genes da família “Yellow Stripe” relacionados a repostas a diferentes estímulos evidencia a possibilidade da presença de diferentes mecanismos de regulação na remobilização de nutrientes da folha bandeira senescente para o grão.

Estes resultados mostraram que fatores de transcrição relacionados com senescência, ou respostas a deficiência de ferro tem expressão alterada em folha bandeira durante o desenvolvimento do grão de arroz. O melhor esclarecimento da via de regulação dos fatores de transcrição ligados a

senescência foliar e sua relação com os genes envolvidos na remobilização de nutrientes poderão ser de grande importância para o desenvolvimento de plantas que visem sanar problemas de deficiência nutricional humana.

5 - Referências Bibliográficas

Aoyama, T., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nagasaka, S., Usuda, K., Kakei, Y., Ishimaru, Y., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N., (2009). **OsYSL18 is a rice iron(III)–deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints.** *Plant Molecular Biology*, 70: 681–692.

Biswas, A.K., Choudhuri M.A. (1980). **Mechanism of Monocarpic Senescence in Rice.** *Plant Physiology*, 65: 340-345.

Counce, P., Keisling, T. C., Mitchell, A. J., (2000). **A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Developmen.** *Crop Science*, 40: 436–443.

Grusak, M.A., DellaPenna, D., Welch, R.M.(1999). **Physiologic processes affecting the content and distribution of phytonutrients in plants.** *Nutrition Review*, 57: 27-33.

Gepstein, S., Thimann K.V.; (1980). **Changes in the abscisic acid content of oat leaves during senescence.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77: 2050–2053.

Guo, Y., Gan S. (2006). **AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence.** *The Plant Journal*, 46: 601–612.

He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., Gan, S. (2002). **Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence.** *Plant Physiology*, 128: 876–884.

Hinderhofer, K., Zentgraf, U. (2001). **Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence.** *Planta*, 213: 469–473.

Ishimaru, Y., Masuda, H., Bashir, K., Inoue, H., Tsukamoto, T., Takahashi, M., Nakanish, H., Aoki, N., Hirose, T., Ohsugi, R., Nishizawa, N.k. (2010). **Rice meta-nicotianamine transporter, OSYSL2, is required for long distance transport of iron and manganese.** Plant Journal, 62: 379-390.

Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, 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.** Journal of Biological Chemistry, 284: 3470-3479.

Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Shama, P., Kapoor, S., Tyagi, A., Khurana, J. (2007) **F-Box Proteins in Rice. Genome-Wide Analysis, Classification, Temporal and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress.** Plant Physiology, 143: 1467–1483.

Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK.(2007). **The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA 104(48):19150- 19155.

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

Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G.; (2007). **Leaf Senescence.** Annual Review of Plant Biology, 58:115–36.

Maia, L., Palmieri, D., Souza, V., Costa de Oliveira, A. (2008). **SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation.** International Journal of Plant Genomics, Volume 2008, ID 412696.

Mendes, G. C., (2009). **Efeito ambiental e genotípico no teor de nutrientes em sementes de arroz, *Oryza sativa*.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa , Viçosa, 2009.

Meng, Q., Zhang, C., Gai, J., Yu, D. (2007). **Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.** *Journal Plant Physiology*, 164(8):1002-12.

Morris, K., Mackerness, S.A., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M. (2000). **Salicylic acid has a role in regulating gene expression during senescence.** *Plant Journal*, 23:677–85.

Narayanan, N.N., Vasconcelos, M.W., Grusak, M.A. (2007). **Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 45 277-286.

Noh, Y.S., Amasino, R. (1999). **Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12.** *Plant Molecular Biology*, 41:181–94.

Nozoye, T., Inoue, H., Takahashi, M., Ishimaru, Y., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2007). **The expression of iron homeostasis-related genes during rice germination.** *Plant Molecular Biology*, 64(1-2): 35-47.

Ogo, Y., Itai, R.N., Nakanishi, H., Inoue, H., Kobayashi, T., Suzuki, M., Takahashi, M., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2006). **Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants.** *Journal of Experimental Botany*, 57: 2867-2878.

Ogo, Y., Kobayashi, T., Itai, R.N., Nakanishi, H., Kakei, Y., Takahashi, M., Toki, S., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2008). **A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants.** *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 13407-13417.

Pinheiro, L. G., Marques, C. S., Maximillier, D.B.L., Reis, P.A.B., Alves, M.A., Carvalho, C. M., Fietto, L.G., Fontes, E.P.B. (2009). **Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and**

expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*, 444(1-2): 10-23.

Ray, S., CHOUDHURI, M.A. (1981). **Mobilization of Metabolites from Leaves to Grains as the Cause of Monocarpic Senescence in Rice.** *Plant Physiology*, 68: 1345-1348.

Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Duarte, G.L. (2009). **Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor.** *Planta*, 230(5): 985-1002.

Ueda, J., Kato, J., (1980). **Identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthum* L.).** *Plant Physiology*, 66: 246–249.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology*, 3(7).

van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I., Kunze, R. (2006). **Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence.** *Plant Physiology*, 141: 776–92.

von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A., Hider, R.C. (1999). **Nicotianamine chelates both FeIII and FeII: implications for metal transport in plants.** *Plant Physiology*, 119: 1107–1114.

Waters B.M., Grusak, M.A. (2008). **Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3.** *New Phytology*, 177: 389–405.

Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R.M. (1998). **A comparison of the expression patterns of several senescence-associated**

genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology*, 37:455–69.

Willems, E., Leyns, L., Vandesompele, J. (2008). **Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates.** *Analytical Biochemistry*, 379 127–129.

Zeevaart JAD, Creelman RA (1988). **Metabolism and physiology of abscisic acid.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, 39: 439–473.

Capítulo II

ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DE FOLHAS DE ARROZ DURANTE O ENCHIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO GRÃO

Resumo

VITAL, Camilo Elber, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Análise do perfil protéico de folhas de arroz durante o enchimento e desenvolvimento do grão.** Orientadora: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Antônio Costa de Oliveira.

Análise proteômica é uma poderosa ferramenta para a caracterização funcional de plantas. Devido à grande disponibilidade de informações de seqüências de nucleotídeos e com base nos progressos alcançados na sensibilidade e na rápida identificação de proteínas, abordagens proteômicas abrem novas perspectivas para analisar as complexas funções de plantas modelos e de outras espécies em diferentes níveis. No entanto, nos últimos anos tem se dado atenção especial para a confiabilidade dos dados obtidos. Fontes de erros devem ser consideradas e cuidados devem ser tomados no delineamento experimental ou na análise dos dados para minimizar as variações inerentes ao tratamento. Desta forma, folha bandeira e não bandeira de arroz foram comparadas em dois estádios de desenvolvimento do grão (leitoso e pastoso). A comparação entre os tratamentos foi feita a partir de uma análise global dos dados que considera a taxa de falsos positivos (FDR). Os resultados, considerando um FDR menor que 5%, mostraram spots diferencialmente expressos candidatos para identificação por espectrometria de massa para todos os tratamentos avaliados. Comparações do perfil protéico demonstram possíveis alterações no metabolismo durante o processo de senescência foliar e também diferenças no metabolismo da folha bandeira e não bandeira durante o enchimento do grão.

Abstract

VITAL, Camilo Elber, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Brazil, February 2010. **Proteomic analysis of rice leaves during the filling and development grain.** Adviser: Andréa Miyasaka de Almeida. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Antônio Costa de Oliveira.

Proteomics analysis is a powerful tool for functional characterization of plants. Due to the wide availability of nucleotide sequence and its progress in sensitivity and rapid identification of proteins, proteomics approaches open new perspectives for analyzing the complex functions of model plants and other species at different levels. However, in recent years it has been given special attention to the reliability of the data. Sources of error must be considered and care must be taken in experimental design or data analysis to minimize the variability inherent to treatment. Thus, flag leaf and no flag of rice were compared in two stages of grain development (milky and dough). The comparison between treatments was made from a global analysis of data considering the false positives rate (FDR). The results, considering a FDR less than 5%, showed candidate spots differentially expressed for identification by mass spectrometry for all treatments. Comparisons of protein profiles demonstrate possible changes in metabolism during senescence and also differences in the metabolism of the flag leaf and not flag leaf during grain filling.

1 - Introdução

O arroz é um dos cultivos agrícolas de maior importância para a alimentação humana sendo consumido por mais da metade da população do planeta, além de ser grande fonte de calorias. No entanto, grande parte da população sofre de problemas relacionados com a falta de nutrientes como o ferro por exemplo. Desta forma, estudos que visem o incremento de nutrientes nos grãos de arroz podem contribuir enormemente para sanar problemas relacionados com deficiência nutricional.

Estudos vêm demonstrando que a folha bandeira presente no eixo da panícula desempenha um importante papel na remobilização de nutrientes para o grão em desenvolvimento. A folha bandeira emerge como a última folha no desenvolvimento reprodutivo, mas sua senescência ocorre anteriormente em relação a outras duas folhas situadas também abaixo do eixo da panícula. A remoção da panícula leva a um retardo no processo de senescência da folha bandeira sugerindo que o órgão reprodutivo seria um sinal inicial desencadeador do processo (Ray et al., 1981; Biswas et al., 1980) e, durante o enchimento do grão de arroz, a folha bandeira é responsável pelo fornecimento de grande parte dos nutrientes para a panícula mais próxima (Grusak e DellaPenna, 1999 apud Narayanan et al, 2007). A análise da expressão gênica por “Macroarray” em folha bandeira e não bandeira durante o período de enchimento do grão revelou a expressão diferencial de vários genes relacionados com o transporte de metais, incluindo genes da família “Yellow stripe” e nicotianamina sintase (Narayanan et al. 2007).

Análise proteômica é uma poderosa ferramenta para a caracterização funcional de plantas. Devido à grande disponibilidade de informações de seqüências de nucleotídeos e com base nos progressos alcançados na sensibilidade e na rápida identificação de proteínas, abordagens proteômicas abrem novas perspectivas para analisar as complexas funções de plantas modelos e de outras espécies em diferentes níveis. Proteômica tem sido definida como a análise sistemática de um conjunto de proteínas em um tecido, célula ou compartimento subcelular usado para identificar proteínas relacionadas a um processo definido. Recentes avanços em proteômica têm

permitido mais quantitativa e reprodutivas análises de um grande número de proteínas. Atualmente, a mais comum abordagem para este objetivo é a separação e visualização de proteínas a partir do extrato bruto do tecido por eletroforese em gel bidimensional seguida pela identificação e caracterização das proteínas isoladas por espectrometria de massa (Gobom *et al.* 2001, Nordhoff *et al.* 2001).

Grande atenção tem sido dada para os resultados obtidos em proteômica quanto a confiabilidade dos dados. Os pontos críticos identificados para a análise proteômica são o delineamento experimental, análise diferencial e a falta de dados (perda de repetições), todos problemas onde as estatísticas podem ser de ajuda.

O delineamento experimental pode ser estabelecido em uma dinâmica de colaboração entre biólogos e estatísticos de modo a ser útil para limitar erros sistemáticos e melhorar a precisão dos testes estatísticos posteriores, contribuindo assim para reduzir o número de falsos positivos. A análise diferencial do volume do spot (número de pixel x intensidade) geralmente é tratada por meio de pacotes de software comerciais que propõem ferramentas estatísticas para ajudar a concluir sobre a importância da variação. No entanto, ferramentas estatísticas poderosas podem ser utilizadas para melhorar a análise dos dados. Essas ferramentas podem ajudar a racionalizar as decisões sobre a significância e dar atenção sobre as imperfeições de géis, spots pareados erroneamente e outros artefatos de géis bidimensionais. Além do mais, imperfeições nas análises são induzidas em proteômica, especialmente pela perda de spots (perda de dados) de um ou mais géis oriundos de uma mesma série de repetições. O problema desses dados perdidos em géis 2-D é geralmente devido a problemas experimentais e devem ser levados em conta na análise estatística (Chich *et al.* 2006).

Duas abordagens para análises da expressão diferencial podem ser consideradas. Uma em que os spots são analisados como variáveis independentes (spot por spot) e decide-se a partir da aplicação, por exemplo, de um teste T e outra abordagem, denominada de análise global, que resulta da análise da variância considerando todas as observações juntas.

Na análise global, dois parâmetros devem ser considerados na escolha dos verdadeiros spots diferencialmente expressos. Um deles, denominado de p-value, calculado para cada spot, é definido como a probabilidade de rejeitar uma hipótese ($H_1=H_2$) quando esta é verdadeira. A hipótese é rejeitada quando o p-value é pequeno, por exemplo, abaixo de 5%, indicando variação entre os spots. O outro parâmetro é o FDR (False Discovery Rate) que estima a taxa de falsos positivos. Controlando o FDR a um nível de 0,05, por exemplo, significa que até 5% dos spots entre os spots detectados como variáveis são identificados ao acaso (Benjamini e Hochberg, 1995).

Desta forma, o objetivo do estudo foi analisar os spots diferencialmente expressos em folha bandeira e não bandeira de arroz durante o desenvolvimento do grão e aplicar um teste estatístico que minimize problemas relacionados com falsos positivos.

2 - Material e Métodos

2.1 - Material vegetal

O experimento foi conduzido em solos de várzeas da Fazenda Experimental da EPAMIG, município de Leopoldina (Zona da Mata Mineira) onde as plantas foram cultivadas sob o regime de irrigação por inundação contínua. O material vegetal utilizado foi a cultivar IRGA-417.

O genótipo foi semeado em solo seco e, após a emergência das plântulas, efetuou-se a irrigação permanente da área experimental. Ao atingirem o estágio de desenvolvimento do grão, coletou-se folha bandeira e folha não bandeira, correspondente à terceira folha abaixo do eixo da panícula, nos estádios leitoso e pastoso de maturação do grão ou, respectivamente, estádios R6 e R7 segundo Counce et al. (2000). Para cada repetição foram coletadas 4 folhas. Os tratos culturais (aplicações de herbicidas, inseticidas e fungicidas) foram realizados sempre que necessários para evitar que incidências de plantas daninhas, insetos e enfermidades (fungos principalmente) interferissem no desenvolvimento normal do ensaio. Todo

material vegetal coletado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para futuro uso no preparo dos extratos protéicos.

2.2 - Extração de proteínas totais

Para extração das proteínas de folhas de arroz foi utilizado o protocolo descrito por Shen *et al.* (2002), com modificações (MESQUITA *et al.*, 2009). Folhas de arroz foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado (aproximadamente 1,5 g) foi ressuspendido e solubilizado por 2 h a 4°C em 10 mL de tampão de extração (Tris HCl pH 7,5 40mM; sacarose 250mM; EDTA 10mM; TritonX100 1%; DTT 1mM; PMSF 1mM; 2-mercaptoetanol 2%). Após centrifugação a 6000 *g* por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi lavado uma vez com 5mL de tampão de extração e o sobrenadante coletado juntamente com o primeiro. Em seguida as proteínas foram precipitadas pela adição ao sobrenadante de 15 mL de TCA 10% em acetona gelada. Após 12 horas a -20 °C, a mistura foi centrifugada a 6000 *g* por 15 minutos e o precipitado lavado (3-4 vezes) com acetona gelada até clarificação do sedimento. O excesso de acetona foi removido com uma lavagem com etanol 80%. O precipitado final foi então seco, dissolvido em tampão de amostra para gel bidimensional (7M uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 2% IPG-buffer (Amersham Biosciences), 80mM DTT), e sonificado por três vezes por 1 minuto no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas a -20°C até posterior análise.

Foram feitas análises de degradação das proteínas em gel SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970). As amostras protéicas foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 12% (40 µg de proteína por poço). Os géis foram corados com *Coomassie* coloidal.

2.3 - Separação das proteínas em géis bidimensionais

No gel bidimensional, a primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 24 cm com gradientes de anfolinos entre o pH 4–7 (GE Healthcare Upsala, Suécia). Inicialmente, as fitas foram reidratadas por 14-20 h em 450µl de tampão de reidratação (7M uréia, 2M Tiouréia, 2% CHAPS, 0.002% azul de bromophenol, 2% IPG-buffer, 0.2% DTT) contendo 1mg de proteína das amostras. A IEF foi realizada em um sistema IPGphor (GE Healthcare Upsala, Suécia) a 20°C: 0.5 kVh a 500 V, 0.8 kVh a 1000 V, 13.5 kVh a 8000 V e 40 kVh a 8000 V . Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em duas etapas individualmente por 15 minutos em 5 mL de solução de equilíbrio (6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, 50mM Tris-HCl pH 8.8) contendo 1% de DTT e 2,5% de iodoacetamida, respectivamente. A separação da segunda dimensão foi realizada no aparelho *PROTEAN DaltSIX* (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,0 mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As condições da eletroforese foram de 30 min a 15mA, seguida de 6 h a 30mA. Para os experimentos de 2D/SDS-PAGE foram utilizadas 3 réplicas biológicas para confirmar a reprodutibilidade, e permitir a análise estatística das diferenças nas análises das imagens.

2.4 - Visualização das proteínas, análise das imagens e estatística

Os géis foram corados pela técnica de *Coomassie* coloidal. Primeiramente os géis foram fixados em solução contendo ácido acético 10% e etanol 40% (*overnight*). Em seguida foram lavados com água ultra pura (MilliQ) por 30 segundos, para remoção da solução de fixação, sendo, então, corados pela adição de azul de *Coomassie* G-250 coloidal a 0,02% por 72h e mantidos em solução de ácido acético 1% até a digitalização. Os géis foram digitalizados utilizando o scanner GS-800 Calibrated Densitometer Bio-Rad Laboratories (UK) Ltd. As imagens foram analisadas utilizando-se o software Decodon Delta 2D 4.0. Para isto, foram gerados géis de fusão entre as repetições e entre as os tratamentos de forma a identificar a correspondência entre os spots (figura 1).

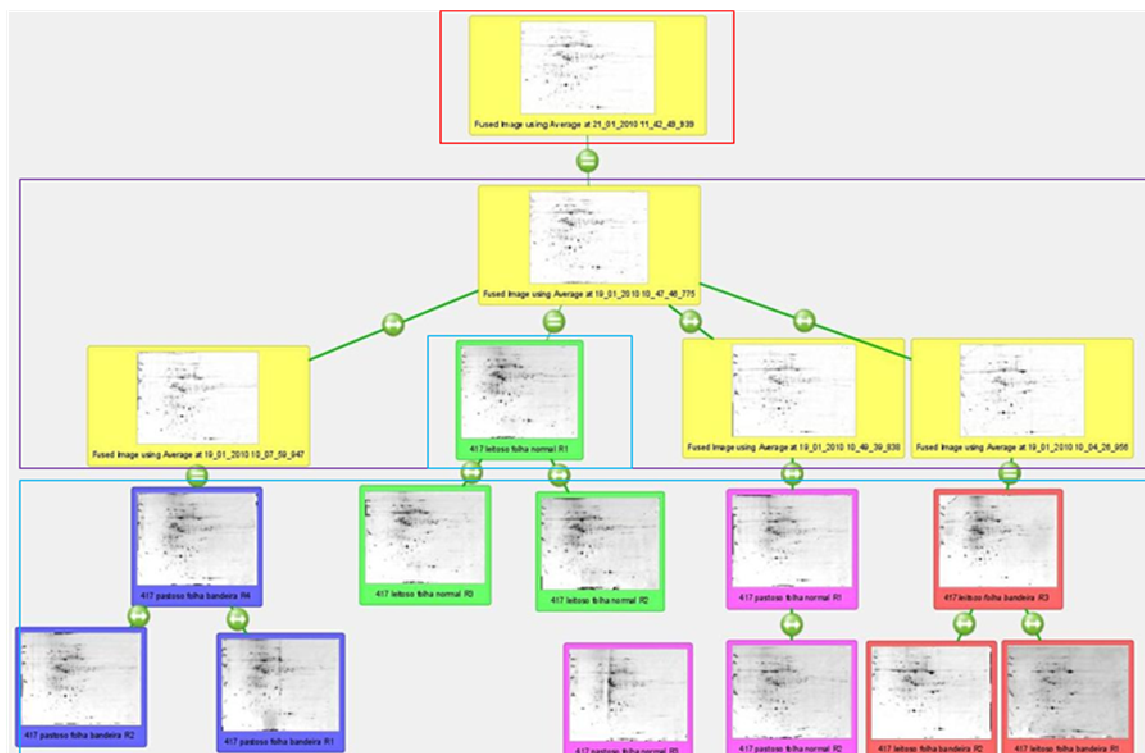


Figura 1 – Interface do programa Delta 2D mostrando o processo para identificação e correspondência entre os spots nos géis. Na parte inferior estão as repetições que foram ingressas no programa, na parte central estão os géis de fusão das repetições e na parte superior o gel de fusão de todos os tratamentos (folha bandeira e folha não bandeira no estádio leitoso, folha bandeira e não bandeira no estádio pastoso).

A partir dos dados obtidos no programa Delta 2D de percentagem de volume, foi feita a análise estatística utilizando-se o teste T (0.05%) para a comparação de cada spot entre os tratamentos. Também foi realizada a análise global utilizando-se o teste ANOVA e considerando o parâmetro FDR. Para este fim, utilizou-se o programa Pomelo II (Morrissey e Diaz-Uriarte, 2009) para eliminação de falsos positivos e escolha dos melhores spots. No entanto, a abordagem global pressupõe que exista uma transformação dos volumes observados de modo que um modelo de ANOVA seja adequado para a modelagem dos dados. Esta transformação foi realizada segundo o método Box-Cox (Gustafsson et al., 2004) utilizando o programa de estatística Minitab.

3 - Resultados e Discussão

A observação dos extratos protéicos em SDS-PAGE demonstrou proteínas integras e bem resolvidas confirmando uma boa eficiência do protocolo proposto por Mesquita et al. (2009) para a extração de proteínas de folha de arroz. Da mesma maneira os géis bidimensionais apresentaram boa qualidade (figura 2).

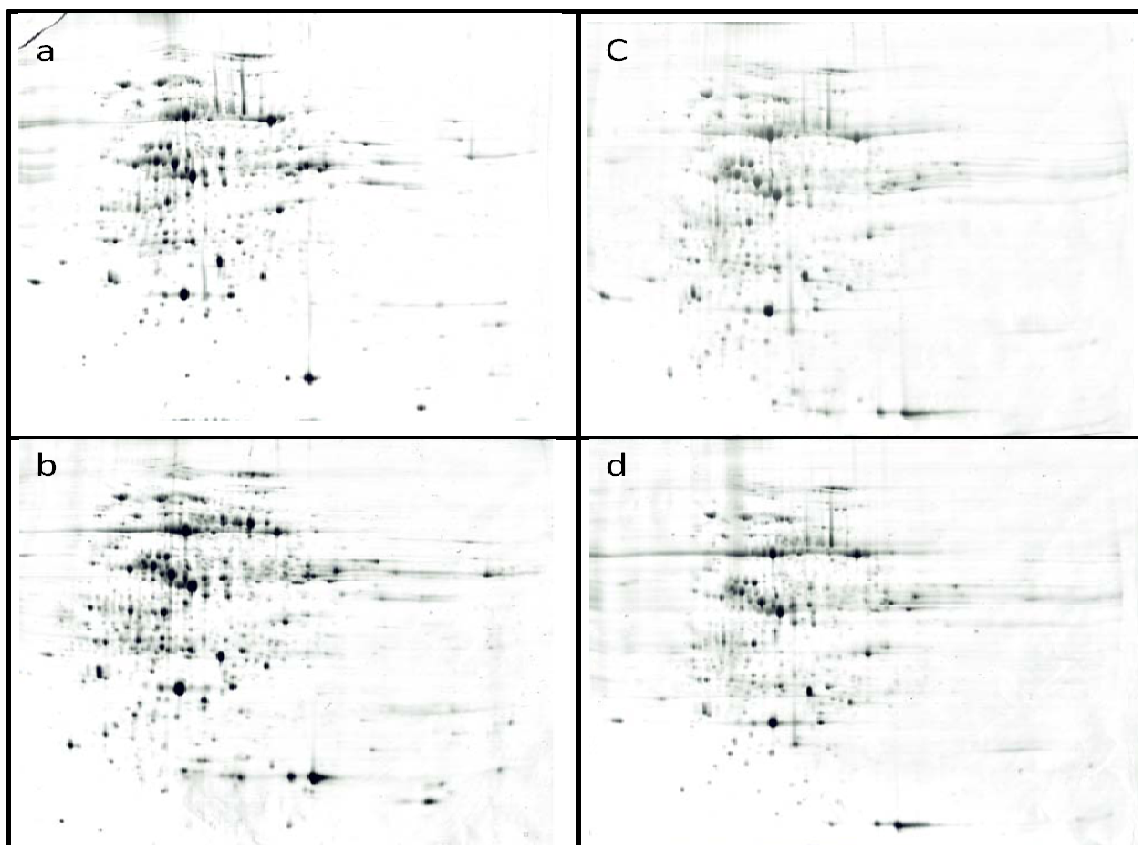


Figura 2 – Géis obtidos de amostras de folha bandeira (a) e não bandeira (b) coletadas no estágio leitoso e géis de folha bandeira (c) e não bandeira (d) coletas no estágio pastoso de desenvolvimento do grão da cultivar IRGA 417.

As análises das imagens dos géis feitas no programa Delta 2D levaram a identificação de 559 spots no gel de fusão correspondente a todos os tratamentos. A figura 3 mostra que muitos destes spots têm variação entre os tratamentos. Por exemplo, os resultados estatísticos pelo teste T (tabela 1) mostraram a variação na expressão de 229 proteínas quando se comparou folha bandeira com folha normal no estágio leitoso. Destas proteínas, 37 e 116

tiveram, respectivamente, aumento e diminuição da expressão maior que 2 vezes na folha bandeira. Algumas chegaram a ter variação maior que 10x.

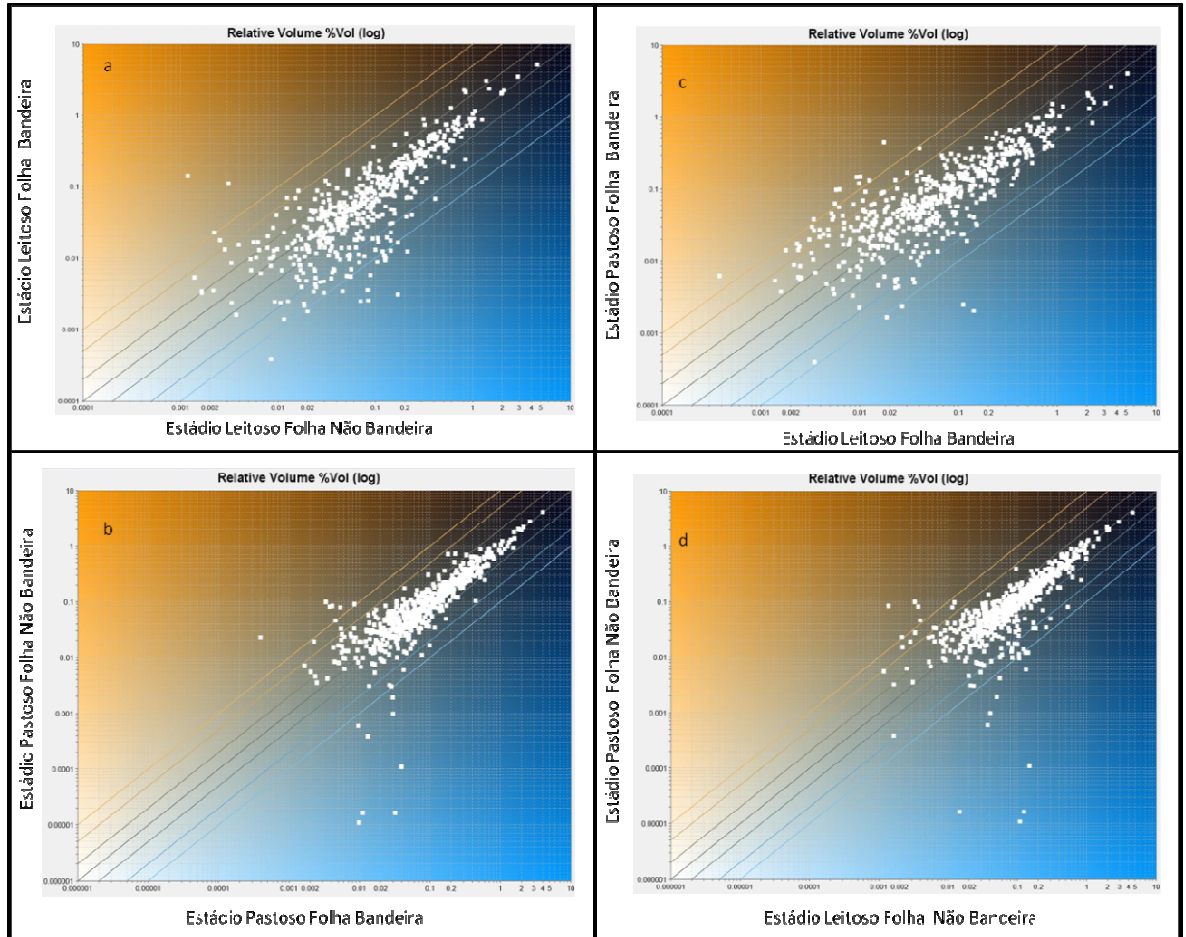


Figura 3 – Gráfico mostrando diferenças de porcentagem de volume dos spots entre os tratamentos. As análises foram realizadas no software Delta 2D 4.0. Estádio leitoso folha bandeira e não folha bandeira (a); estádio pastoso folha bandeira e não folha bandeira (b); folha bandeira no estádio leitoso e no pastoso (c); folha não bandeira no estádio leitoso e no pastoso (d).

Tabela 1 – Variação na percentagem de volume dos spots analisados pelo teste T (5%). A primeira coluna à esquerda e a primeira linha indicam, respectivamente, os tratamentos comparados e o numero de spots com aumento ou diminuição relativa da percentagem de volume.

	No total de spots	Spots com expressão alterada	> 1X	> 2X	> 3 X	> 4X	> 5X	>10x	< 1X	< 2X	< 3X	< 4 X	< 5X	< 10X
Folha Bandeira/Normal Estádio Leltoso	554	229	60	37	17	4	2	1	169	116	80	50	41	15
Folha Bandeira/Normal Estádio Pastoso	554	136	66	15	3	1	0	0	70	29	7	5	3	1
Estádio Leitoso/Pastoso Folha Normal	554	243	96	51	33	27	21	7	147	47	17	7	5	0
Estádio Leltoso/Pastoso Folha Bandeira	554	195	46	28	9	3	3	1	149	100	70	35	27	7

No entanto, quando se analisa os géis, deve-se levar em consideração falsos positivos. Como umas das pressuposições da ANOVA é a distribuição normal dos dados, foi feita a transformação da percentagem de volume usando-se o programa Minitab (figura 4). Os dados obtidos foram então submetidos ao programa Pomelo II para estimar o FDR (5%) e eliminar falsos positivos.

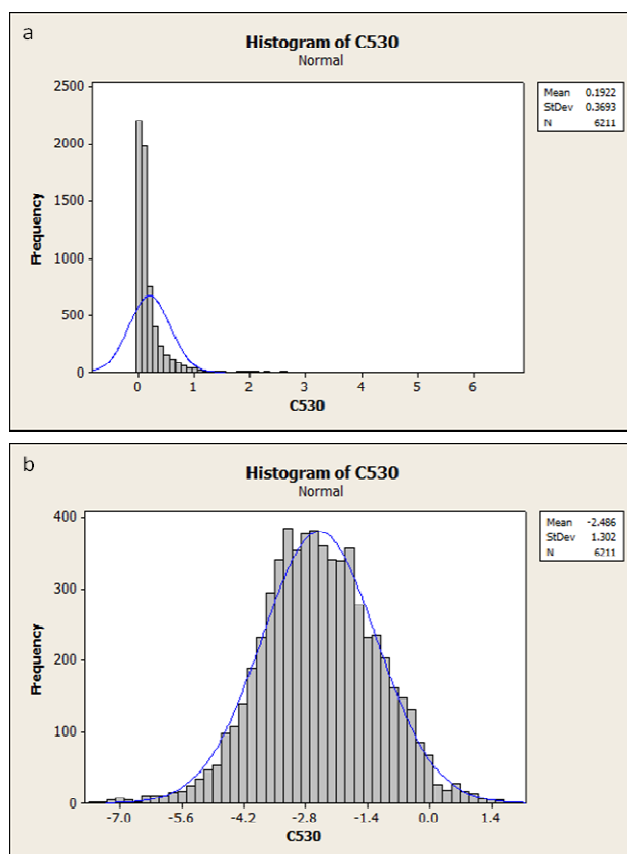


Figura 4 – Transformação dos dados por Box-Cox. Os dados de percentagem de volume (a) foram submetidos ao programa Minitab gerando uma distribuição normal (b). O eixo x corresponde às percentagens de volume e o eixo y a respectivas frequências.

A partir da análise global, houve a redução no número de spots com expressão alterada considerando-se um FDR menor que 5%. Por exemplo, dos 229 spots com expressão alterada na comparação folha bandeira em relação folha não bandeira no estádio leitoso, com a análise realizada no Pomelo II, o número de spots reduziu para 48. Na comparação feita no estádio pastoso, o número de spots inicial que eram 136, reduziu para apenas 10 spots. Quando se comparou estádio leitoso em relação ao pastoso em folha bandeira e folha não bandeira, o número de spots inicial diminuiu de 145 e 243 para 30 e 82 respectivamente. Nas figuras 5 e 6, gerada no Pomelo II, são mostrados todos os spots candidatos a análise por espectrometria de massa obtidos das análises entre os tratamentos. As cores indicam maior (verde) ou menor (vermelho) percentagem de volume dos spots. Por exemplo, para o spot “s534” (FDR = 0.038), na figura 5, a cor verde indica que este spot teve alta

percentagem de volume na análise das imagens e teve maior expressão na folha não bandeira no estádio leitoso. O spot s396 é um exemplo de grande variação na expressão mostrando maior expressão na folha bandeira no estádio leitoso.

Desta forma, a partir destes resultados, verifica-se a importância de se realizar uma análise estatística mais precisa de modo a evitar a escolha de spots duvidosos e assim obter falsas conclusões no experimento.

Comparações do perfil protéico demonstram possíveis alterações no metabolismo durante o processo de senescência foliar e também diferenças no metabolismo da folha bandeira e não bandeira durante o enchimento do grão.

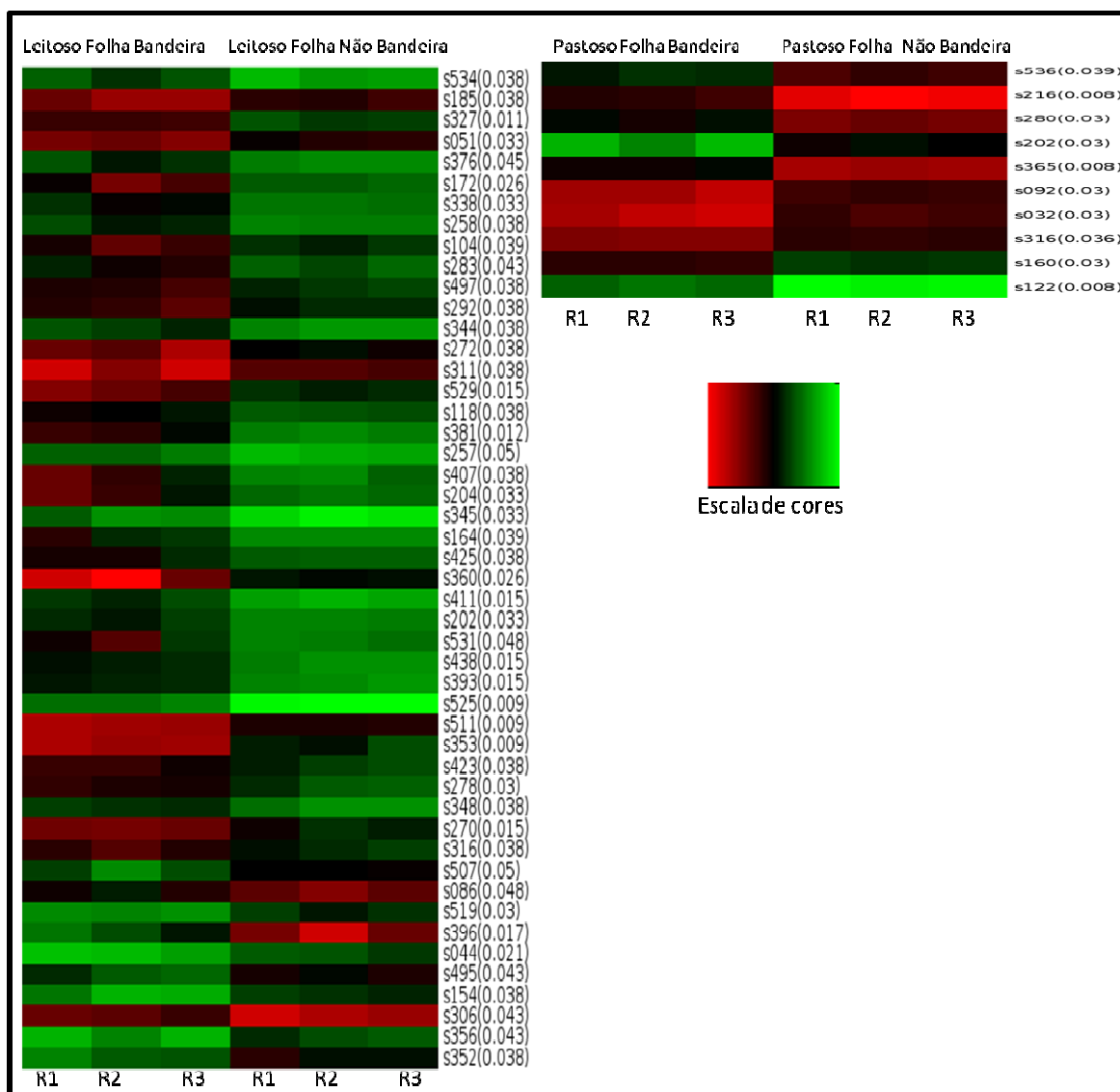


Figura 5 – “Heatmap” obtido do programa Pomelo II mostrando as diferenças de expressão dos “spots” oriundos das análises de três repetições de géis de folha bandeira e folha não bandeira em dois estádios de desenvolvimento do grão. A escala de cores indica a porcentagem de volume dos spots no gel. Cores vermelhas e verdes são menores e maiores intensidades, respectivamente. São mostrados o número dos spots e o respectivo FDR (<0.05).

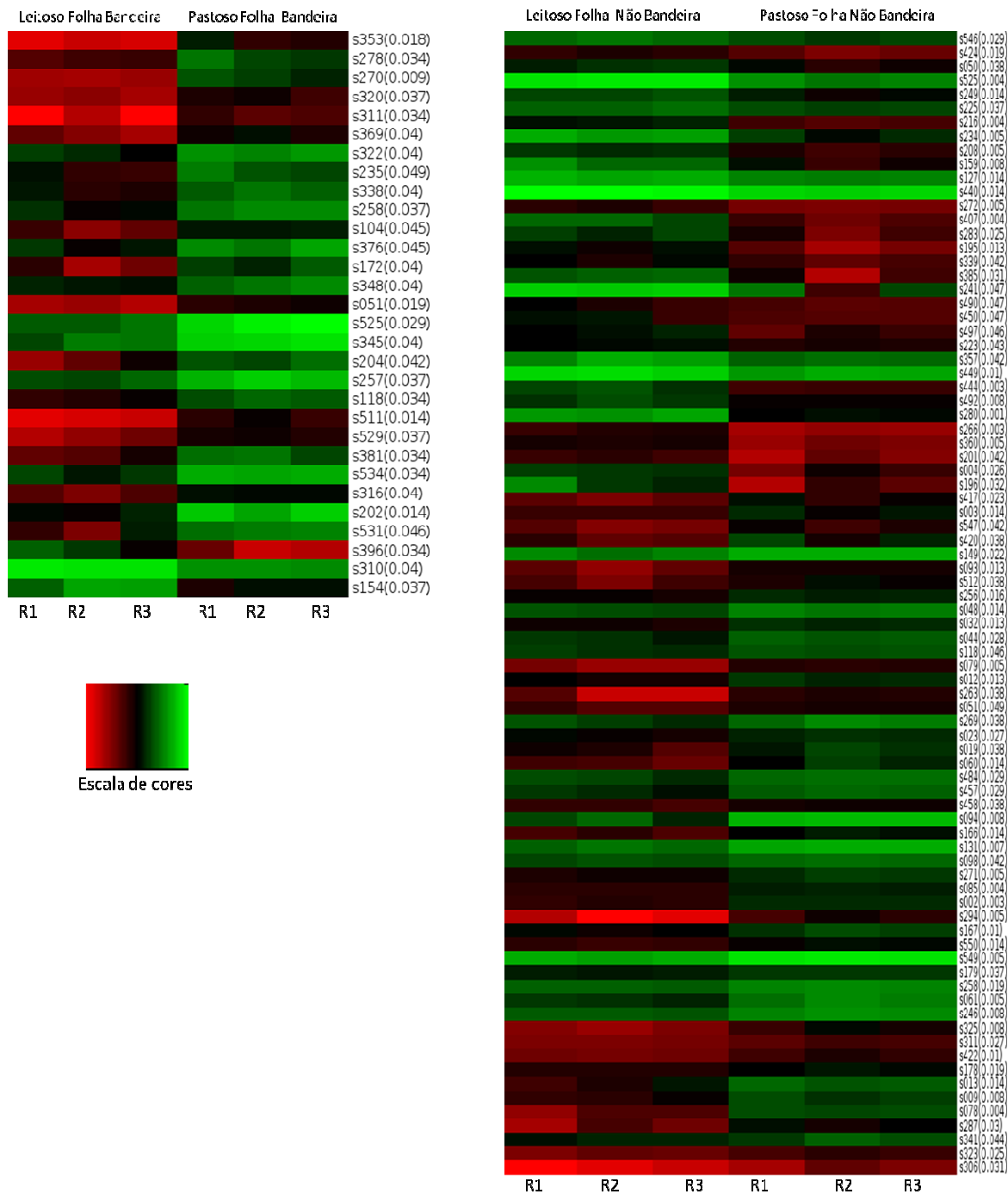


Figura 6 – “Heatmap” obtido do programa Pomelo II mostrando as diferenças de expressão dos “spots” oriundos das análises de três repetições de géis de folha bandeira e folha não bandeira em dois estádios de desenvolvimento do grão. A escala de cores indica a percentagem de volume dos spots no gel. Cores vermelhas e verdes são menores e maiores intensidades, respectivamente. São mostrados o número dos spots e o respectivo FDR (<0.05).

4 - Conclusões

Métodos estatísticos utilizando uma análise global podem ser de grande ajuda na eliminação de falsos positivos e, conseqüentemente, obtenção de falsas conclusões nos experimentos.

A comparação entre o tipo de folha em arroz apresentou diferenças na expressão das proteínas tanto no estágio leitoso quanto no pastoso. Isto evidencia um metabolismo diferenciado entre folha bandeira e não bandeira durante o processo de desenvolvimento do grão. Da mesma forma, a comparação entre os estádios de desenvolvimento leitoso e pastoso de cada folha apresentou diferenças sugerindo um processo dinâmico que culmina na senescência foliar. No entanto, somente a identificação das proteínas por espectrometria de massa poderá revelar algo sobre o mecanismo envolvido.

5 - Referências Bibliográficas

Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). **Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing**. Journal of the Royal Statistical Society, 57 289–300.

Biswas, A.K., Choudhuri M.A. (1980). **Mechanism of Monocarpic Senescence in Rice**. Plant Physiology, 65: 340-345.

Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Chich, J.F., David, O., Villers, F., Schaeffer, B., Lutomski, D., Huet, S. (2007). **Statistics for proteomics: Experimental design and 2-DE differential analysis**. Journal of Chromatography, 849: 261–272.

Counce, P., Keisling, T. C., Mitchell, A. J., (2000). **A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Developmen**. Crop Science, 40: 436–443.

Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H., Nordhoff, E. (2001). **Alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI/MS peptide analysis in proteomics.** Analytical Chemistry, 73:434-438.

Gustafsson, J.S., Ceasar, R., Glasbey, C.A., Blomberg, A. e Rudemo M. (2004). **Statistical exploration of variation in quantitative two-dimensional gel electrophoresis data.** Proteomics, 4(12):3791-9.

Grusak, M.A., DellaPenna, D., Welch, R.M.(1999). **Physiologic processes affecting the content and distribution of phytonutrients in plants.** Nutrition Review. 57: 27-33.

Laemmli, U.K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227: 680-685.

Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G. (2007). **Leaf Senescence.** Annual Review of Plant Biology, 58: 115–36.

Mesquita, R. O. , SOARES, E.A. , LOUREIRO, M. E. , RAMOS, H.J.O. , (2009). **Otimização de extração de proteínas de folhas e raízes de soja para análise proteômica.** XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2009, Fortaleza. Anais do CBFV 2009. Fortaleza : SPH Comunicação Visual. v. 1. p. 11-11.

Morrissey, E., Diaz-Uriarte, R. (2009). **Pomelo II: finding differentially expressed genes.** Nucleic Acids Research, 37: 581-586.

Narayanan, N.N, Vasconcelos, M.W., Grusak, M.A. (2007). **Expression profiling of Oryza sativa metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray.** Plant Physiology and Biochemistry, 45: 277e286.

Nordhoff, E., Hegelhofer V., Giavalisco P.,Eickhoff H., Horn M., Przewieslik T., Theiss D., Schneider U., Lehrach H and Gobom J. (2001). **Large gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: an analytical**

challenge for studying complex protein mixtures. Electrophoresis, 22:2844-2855.

Ray, S., CHOUDHURI, M.A. (1981). **Mobilization of Metabolites from Leaves to Grains as the Cause of Monocarpic Senescence in Rice.** Plant Physiology, 68: 1345-1348.

Shen, S., Matsubae, M., Takao, T., Tanaka, N., Komatsu, S. (2002). **A proteomic analysis of leaf sheaths from rice.** Journal of Biochemistry, 132(4): 613-20.

Waters B.M., Grusak, M.A. (2008). **Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in Arabidopsis thaliana ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3.** New Phytology, 177: 389–405.

Anexos

Anexo 1 – Tabela com resultado da análise no geNorm v3.4. Valores de M menores indicam maior estabilidade do gene endógeno

	OsUB5	e EF1 alfa	18S	Normalisation Factor
Inicial Intacta biol	2.52E-02	3.24E-01	1.34E-01	1.1122
Leitoso Intacta biol	2.55E-02	2.61E-01	3.37E-02	1.1262
Pastoso Intacta biol	2.91E-02	1.16E-01	1.07E-02	1.2841
Maduro Intacta biol	2.25E-02	1.39E-01	9.77E-02	0.9936
Leitoso Decapit biol	1.01E-02	7.61E-02	7.18E-03	0.4470
Pastoso Decapit biol	1.84E-02	6.15E-02	1.45E-02	0.8131
Maduro Decapit biol	3.89E-02	1.11E-01	8.36E-01	1.7216
M < 1.5	1.440	1.537	2.150	

Anexo 2 – Tabela com eficiência dos genes usados no experimento.

Genes	Identificação do transcrito (NCBI)	Tm °C Fw/Rv	Eficiência (%)	slope	R²
OsYSL2	AB126253	59/59	103.529	-3.175	0.931
OsNAAT1	AB182275	59/58	93.212	-3.496	0.91
OsUBQ5	AK061988	62/61	91.293	-3.55	0.991
18S	NC_007886	58/59	84.98	-3.743	0.991
OsEF-1α	AK061464	61/62	92.31	-3.521	0.9931
OsNAP	NP 912423/Ac126222	59/58	97.589	-3.381	0.868
OsNAC5	AK063399	60/59	103.635	-3.238	0.88
OsNAC1	AK108080	59/59	83.591	-3.79	0.999
OsNAC like GmNAC3	AK069257	60/58	104.2645	-3.223	0.9659
OsWRKY45	AK066255	60/59	99.735	-3.328	0.973
IDEF1	AK107456	59/59	96.642	-3.405	0.736
IDEF2	AK099540	58/58	101.367	-3.29	0.98
OsNAS3*	AB023819	58/72	95.572	-3.433	0.989
OsYSL2*	AB126253	59/59	100.644	-3.307	0.951
OsEF-1α *	AK061464	61/62	104.76	-3.213	0.946

* Expressão analisada no grão em desenvolvimento.