

PREDIÇÃO DE MODIFICAÇÕES METABÓLICAS A PARTIR DO TRANSCRIPTOMA DE ARROZ SOB EXCESSO DE FERRO

ARTUR TEIXEIRA DE ARAUJO JUNIOR¹; LUIS WILLIAN PACHECO ARGE²;
DANIEL DA ROSA FARIA²; RAILSON SCHREINERT DOS SANTOS²;
SOLANGE FERREIRA DA SILVEIRA SILVEIRA²; EUGENIA JACIRA BOLACEL
BRAGA²; LUCIANO CARLOS DA MAIA²; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – arturtaj@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – l.willianpacheco@yahoo.com.br; fariasdr@gmail.com; rschsan@hotmail.com; solange.agro@gmail.com; jacirabraga@hotmail.com; lucianoc.maia@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – acostol@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais produzido no mundo, sendo considerado um alimento básico para mais de dois terços da população mundial (FAO, 2015). No Brasil, o arroz é produzido principalmente nos ecossistemas chamados de "Terras Baixas". Estas áreas não possuem boa drenagem, sofrendo constantes inundações. Nessas condições de alagamento temos a ocorrência de um estresse abiótico que causa a diminuição da produtividade do arroz: a sobrecarga de ferro (EMBRAPA, 2005).

Esta toxicidade por ferro está associada com a presença de concentrações elevadas de ferro reduzido (Fe^{2+}) na solução do solo, sendo que um dos primeiros sintomas visíveis é a mudança da cor das folhas, um fenômeno chamado de bronzeamento. Em seguida, o problema culmina com grandes decréscimos na produtividade, levando a uma redução de até 100%, dependendo da concentração de ferro reduzido na solução do solo e da tolerância determinadas cultivares de arroz (SAHRAWAT, 2004).

A resposta das plantas às condições de toxidez por ferro é um fenômeno que envolve mudanças em uma série de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, causando significativas variações na morfologia, no crescimento e no desenvolvimento da planta. Desta forma, compreender a resposta inicial de plantas tolerantes é de grande importância para entender quais genes podem auxiliar na manifestação dessa característica. Assim, a análise do transcriptoma de arroz submetido a estas condições de estresse, auxilia na descoberta de genes e marcadores moleculares que auxiliarão na obtenção de cultivares com mais tolerantes a estas condições.

2. METODOLOGIA

Sementes de arroz da cultivar BRS Querência foram germinadas em câmara de crescimento durante sete dias e, após esse período, foram transferidas para casa de vegetação. Ao atingirem o estádio V3, as plantas foram submetidas a estresse por excesso de ferro, utilizando solução nutritiva adicionada de $300 \text{ mg L}^{-1} Fe^{2+}$, durante 24 horas, enquanto as plantas do tratamento controle foram mantidas apenas com solução nutritiva. O RNA total foi extraído a partir de folhas e em seguida foi feita a síntese de cDNA, o qual foi sequenciado. Após o alinhamento, os softwares MapMan e Genevestigator foram utilizados para verificar as possíveis mudanças no metabolismo e análise da expressão dos genes, respectivamente. Por fim, foram utilizados o SignalP 4.1 Server e o *Protein Families Database* (Pfam), para a localização de peptídeos sinalizadores e a

determinação dos domínios proteicos. Para a predição da estrutura 3D e a validação dessas estruturas foram utilizados os software Swissmodel e *Ramachandran Plot Analysis*. Comparando, posteriormente com o banco de dados RCSB PDB.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas alterações em 30 vias metabólicas, conforme demonstrado pela Figura 1 (E). As rotas que apresentaram maior número de genes com expressão alterada foram: rotas do metabolismo de proteínas, de RNAs e de transporte, com 152, 146, 61 e 28 genes respectivamente (Figura 1A). Dados semelhantes foram encontrados por FINATTO et al. (2005) com a cultivar Nipponbare, tendo como destaque as rotas com funções de ligação, catalise e transporte.

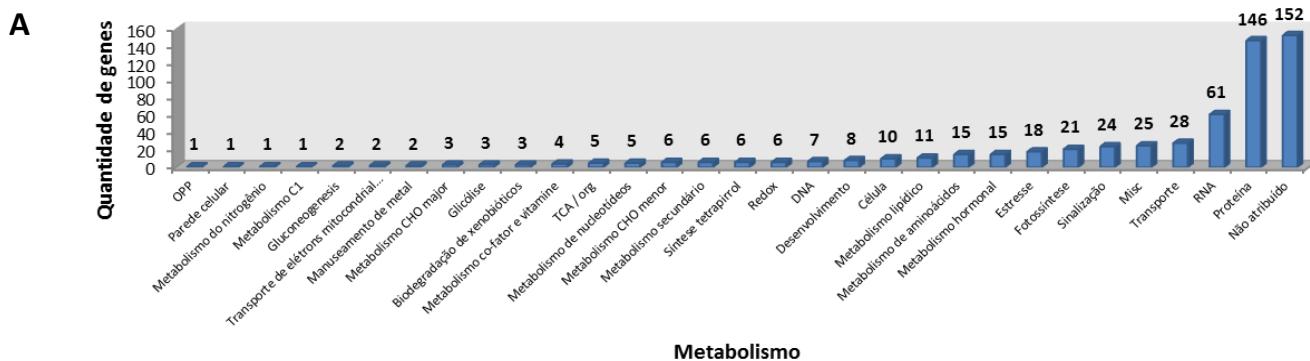
Os genes diferencialmente expressos com elevado aumento na expressão são apresentados na Figura 1B. Esses genes são caracterizados por auxiliarem no processo de homeostase celular e transporte do íon de ferro (COOPER et al., 2003; GROSS et al., 2004).

A análise realizada no software Genevestigator demonstrou que o perfil de expressão obtido dos genes mais superexpressos não se encontra nos outros estresses, demonstrando uma maior especificidade desses genes para a condição de excesso de ferro, sendo que o gene Os03g0399800 não foi identificado pelo programa. Os estresses por submersão e por deficiência de ferro apresentaram maior similaridade com os resultados obtidos, do que o estresse por excesso de sal e por frio (Figura 1D). Quando analisamos os tecidos vegetais temos que apenas no estresse de submersão são encontrados esses genes expressos na folha (Figura 1C).

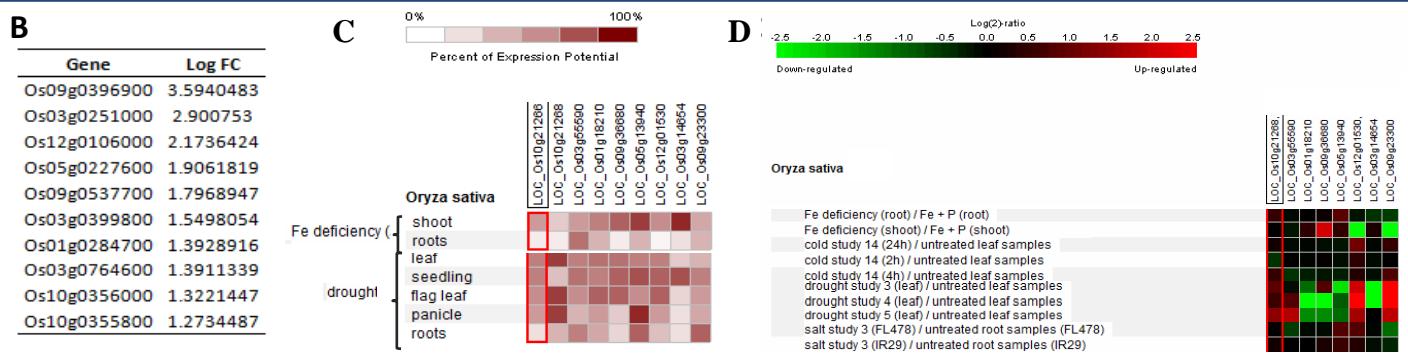
Dentre os genes com maiores valores de superexpressão foram encontrados três para os quais não se tinha este tipo de informação na literatura: Os03g0251000, Os05g0227600 e Os03g0399800. Para se obter mais informações sobre o produto desses genes suas sequências foram analisadas pelo Pfam classificando-as para as respectivas famílias gênicas: *Jacalin*, *Hydrophob seed* e *Trypan PARP*. A família de *Jacalin* e *Trypan PARP* já foram relacionadas, em outros experimentos, com condições de estresse por excesso de sal (RAVAL et al., 2004) e na condição de baixos níveis de irradiação UV (CLAYTON et al., 1990), respectivamente.

Uma importante etapa para predição de função é a identificação de sua estrutura tridimensional (3D), sendo possível prever a conformação de uma proteína comparando-a com outra proteína de estrutura conhecida (PROSDOCIMI et al., 2002). Desta forma, realizou-se a predição da estrutura das três proteínas ineditamente descritas aqui (Figura 1 - F, G, H). A estrutura que mais se assemelha ao produto dessas proteínas é: Os03g0399800 a uma lectina de tubérculo (Heltuba), sendo essa considerada uma provável proteína de defesa (BOURNE et al., 1999); Os03g0251000 a uma proteína da soja que realiza interações hidrofóbicas (LEHMANN et al., 1993); e o Os05g0227600 não possui similaridade estrutural com nenhuma proteína descrita até o momento.

Número de Genes Alterados em Diferentes Rotas



Análise de Expressão



Alterações no Metabolismo e Predição de Estruturas Proteicas

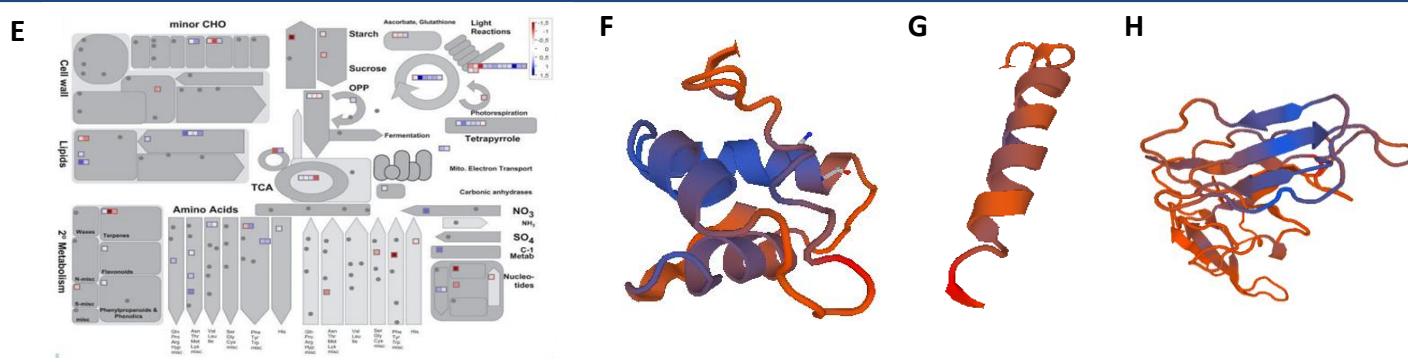


Figura 1 (A) Número de genes diferencialmente expressos e suas respectivas rotas metabólicas. (B) Genes com as maiores valores de superexpressão. (C) Perfil de expressão diferencial em relação ao tecido vegetal (D) Perfil de expressão em diferentes estresses. (E) Visão geral do metabolismo alterado através do software MapMan; (F, G e H) Predição da estrutura tridimensional das proteínas: (F) Os03g0251000, (G) Os05g0227600 e (H) Os03g0399800.

4. CONCLUSÕES

De acordo com estes resultados, podemos concluir que existe uma variação no controle transcripcional de genes envolvidos em diferentes rotas metabólicas quando a cultivar BRS Querência é submetida ao estresse por excesso de ferro. Os genes que obtiveram maiores valores de superexpressão estão relacionados com os processos de homeostase celular e transporte de ferro, demonstrando semelhança entre as respostas de estresse por excesso e por deficiência de ferro. A elucidação desta resposta adaptativa representa um importante meio para identificação de genes candidatos a futuros estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). Acessado em 15 jun 2015. Online. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Sistemas de Produção**, 3 ISSN 1806-9207. Nov./2005.
- SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v. 27, p. 1471-1504, 2004.
- FINATTO T, OLIVEIRA AC, CHAPARRO C, MAIA LC, FARIA DR, WOYANN LG, MISTURA CC, SOARES-BRESOLIN AP, LLAURO C, PANAUD O AND PICAULT N. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. **Rice**. 8:13. 2015.
- GROSS J., STEIN R.J., FETT-NETO A.G., FETT J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**. 26:477-497. 2004.
- COOPER B., CLARKE J.D., BUDWORTH P., KREPS J., HUTCHISON D., PARK S., GUIMIL S., DUNN M., LUGINBUEHL P., ELLERO C., GOFF S.A., GLAZEBROOK J. A network of rice genes associated with stress response and seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A. 100:4945-4950. 2003.
- RAVAL S1, GOWDA SB, SINGH DD, CHANDRA NR. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence–structure–function relationships. **Glycobiology**. vol. 14 no. 12 pp. 1247–1263, 2004
- CLAYTON CE, FUERI JP, ITZHAKI JE, BELLOFATTO V, SHERMAN DR, WISDOM GS, VIJAYASARATHY S, MOWATT MR; Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of Trypanosoma brucei. **Molecular and Cellular Biology**. 10:3036-3047.1990.
- PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N.; JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F.; NBANI, A.; WUST, C. I.; FILHO, F. C.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. S.; FLATSCHART, A. V. F. Bioinformática: manual do usuário. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 29: 12-25, 2002.
- BOURNE, Y., ZAMBONI, V., BARRE, A., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., ROUGE, P. Helianthus tuberosus lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. **Structure Folding and Design**. 7: 1473-1482. 1999.
- LEHMANN, M.S.. BAUD F, PEBAY-PEYROULA E, COHEN-ADDAD C, ODANI S,. Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cysteine-rich family. **Journal of Molecular Biology**. 231: 877-887. 1993.