

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

Expressão transcricional de *ERFs* em arroz submetidos ao estresse por ferro

Mariana Madruga Krüger

Pelotas, 2012

MARIANA MADRUGA KRÜGER

**Expressão transcricional de *ERFs* em arroz submetidos
ao estresse por ferro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Dr. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI

Co-orientador: Dr. Luciano Carlos da Maia – FAEM/UFPeI

Pelotas, 2012.

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI (presidente)

Dra. Adriana Pires Soares Bresolin – UNIPAMPA - Itaqui

Dra. Camila Pegoraro – IFRS – Bento Gonçalves

Dra. Roberta Manica Berto - FAEM/UFPeI

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K94e

Krüger, Mariana Madruga

Expressão transcricional de ERFs em arroz submetidos ao estresse por ferro / Mariana Madruga Krüger. – 91 f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2013. – Orientador Antonio Costa de Oliveira; co-orientador Luciano Carlos da Maia.

1. Arroz. 2. *Oryza sativa*. 3. Expressão gênica. 4. Estresse abiótico. 5. Fatores de transcrição. I. Oliveira, Antonio Costa de. II. Maia, Luciano Carlos da. III. Título.

CDD: 633.18

À minha mãe Zaira Krüger

Dedico

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, força e por ter iluminado, guiado e protegido os meus caminhos em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Mário e Zaira, sobretudo minha mãe, por ter me incentivado constantemente e por proporcionar todo apoio necessário para que fosse possível a concretização deste sonho.

Ao meu irmão Matheus pela amizade e orientação.

A minha avó Ida que com paciência e experiência sempre esteve ao meu lado.

A todos meus familiares.

Aos meus orientadores professores Antônio Costa de Oliveira e Luciano Carlos da Maia, pela oportunidade de fazer parte do grupo e de estágio, pela transmissão de conhecimentos, incentivo, apoio, ajuda, compreensão, amizade, confiança e por todas contribuições na minha formação.

A todos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento pela convivência, troca de experiências, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional, especialmente a Camila e ao Railson, pela amizade, companheirismo, enorme prestatividade, e ajuda incondicional em todos momentos.

Aos amigos Angela Rohr, Juliana Castelo Branco e Paulo Giovanni Rodrigues pela amizade, ajuda e experiências transmitidas.

À amiga Roberta Manica pelos imprescindíveis auxílios na realização deste trabalho.

Ao colega Daniel Farias por todo suporte nas análises de bioinformática.

À amiga Arlete, pela motivação, por nossas conversas e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/FAEM-UFPel pela oportunidade de realização do curso mestrado.

À instituição de pesquisa CAPES, pela viabilização financeira para implantação deste projeto e financiamento da bolsa de pesquisa.

E a todos aqueles, amigos e familiares, que contribuíram para a realização dos meus sonhos, fica expressa aqui minha gratidão.

Resumo

KRÜGER, M, Mariana **Expressão transcricional de *ERFs* em arroz submetidos ao estresse por ferro**. 2012, 92f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura que possui grande importância alimentar e econômica, sendo largamente cultivado em ecossistemas de terras baixas, o qual apresenta condições de drenagem deficiente. Nessas condições, o baixo potencial redox do meio leva a redução do ferro presente na solução do solo o qual torna-se prontamente disponível, podendo se tornar tóxico à planta quando absorvido em excesso. A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar a produção de arroz irrigado em nível mundial. Em áreas de cultivo de arroz do Rio Grande do Sul, o ferro tem causado problemas de toxidez e o uso de cultivares tolerantes torna-se uma importante estratégia para solucionar o problema, sendo necessário a identificação de genes frente aos diferentes mecanismos que conferem essa tolerância às plantas para aplicação em programas de melhoramento. Estudos recentes descobriram a importância de alguns fatores de transcrição responsivos ao etileno (*ERFs*) na resposta vegetal a diferentes estresses. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão diferencial de 32 *ERFs* em arroz submetidos a condições de estresse por ferro, em três cultivares, Nipponbare, Epagri 108 (tolerante à toxidez por ferro) e BR-IRGA 409 (sensível à toxidez por ferro) e identificar elementos *cis* na região promotora de genes *ERFs* em arroz. Os resultados obtidos relatam que em arroz, a maioria dos membros da família *ERF* demonstram perfil diferencial nas cultivares Nipponbare, BR -IRGA 409 e Epagri 108, em condições de excesso de ferro. Os *ERFs* expressos na cultivar tolerante (Epagri 108) podem ser potencialmente importantes na indução da tolerância, enquanto que os que foram altamente induzidos na cultivar sensível (BR – IRGA 409) pertencem a um mecanismo de resposta o qual não é eficiente. Análises de elementos *cis* demonstram que a regulação da expressão de todos os *ERFs* analisados se dá de forma complexa e que existe uma associação entre a presença de determinado elemento *cis* com o perfil de expressão.

Palavras chaves: *Oryza sativa*, Expressão gênica, Estresse abiótico, Fatores de transcrição.

Abstract

KRÜGER, M, Mariana **Transcriptional Expression of *ERFs* in Rice Subjected to Iron Stress**. 2012, 92f. Thesis (Master) – Graduate Program in Agronomy Federal. University of Pelotas – RS.

Rice (*Oryza sativa* L.) is a crop of high nourishment and financial importance, largely grown in flat and flooded ecosystems which present deficient drainage conditions. Under such conditions, the low redox potential of the environment leads to the reduction of iron present in the soil solution, which becomes readily available and can become toxic to the plant when absorbed in excess. Iron toxicity is one of the most important types of abiotic stress, limiting the production of irrigated rice worldwide. In rice growth areas of Rio Grande do Sul, Brazil, iron has caused toxicity problems and the use of tolerant cultivars becomes an important strategy in solving the problem, where the identification of genes is necessary in face of the different mechanisms which confer this tolerance to the plants for application in improvement programs. Recent studies discovered the importance of some transcription factors responsive to ethylene (*ERFs*) in vegetable response to different kinds of stress. Thus, the aim of this study was to evaluate the differential expression profile of 32 *ERFs* in rice subjected to iron stress conditions in three cultivars; Nipponbare, Epagri 108 (tolerant to iron toxicity) and Br-Irga 409 (sensitive to iron toxicity) and to identify *cis* elements in the *ERF* gene promotion region in rice. The results obtained demonstrate that in rice, most members of the *ERF* family showed differential profiles in the cultivars Nipponbare, Epagri 108 and Br-Irga 409, under iron stress conditions. *ERFs* expressed in the tolerant cultivar (Epagri 108) may be potentially important in the induction of tolerance while those which were more highly induced in the sensitive cultivar (Br-IRGA 409) belong to a response mechanism which is not efficient. Analyses of *cis* elements demonstrate that the regulation of expression of all analyzed *ERFs* takes place in complex form and that there exists an association between the presence of a specific *cis* element and the expression profile.

Key words: *Oryza sativa*, genetic expression, abiotic stress, transcription factors.

Lista de Figuras

Figura 1	Via de biossíntese do etileno.....	30
Figura 2	Sinalização do etileno.....	32
Figura 3	Acúmulo de transcritos da sequência AK241243 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	46
Figura 4	Acúmulo de transcritos da sequência AK105991 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	47
Figura 5	Acúmulo de transcritos da sequência AK071519 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	48
Figura 6	Acúmulo de transcritos da sequência AK108830 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	49

Figura 7	Acúmulo de transcritos da sequência AK109226 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	50
Figura 8	Acúmulo de transcritos da sequência AK099221 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	51
Figura 9	Acúmulo de transcritos da sequência AK069833 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	52
Figura 10	Acúmulo de transcritos da sequência AK073133 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	53
Figura 11	Acúmulo de transcritos da sequência AK101949 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	54
Figura 12	Acúmulo de transcritos da sequência AK109360 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de estresse de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	55
Figura 13	Acúmulo de transcritos da sequência AK1067313 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	56
Figura 14	Acúmulo de transcritos do gene AK101054 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de	

	FeSO ₄ .7H ₂ O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	57
Figura 15	Acúmulo de transcritos da sequência AK104576 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de FeSO ₄ .7H ₂ O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	58
Figura 16	Acúmulo de transcritos da sequência AK072749 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de FeSO ₄ .7H ₂ O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	59
Figura 17	Acúmulo de transcritos da sequência AK109390 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de FeSO ₄ .7H ₂ O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	60
Figura 18	Acúmulo de transcritos da sequência AK102559 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de FeSO ₄ .7H ₂ O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	61
Figura 19	Acúmulo de transcritos da sequência AK241246 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de FeSO ₄ .7H ₂ O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	62
Figura 20a	Plotagem das cargas (scores) do CP1-CP2 referentes as 17 sequências de ERFs e aos genótipos de arroz irrigado (Epagri 108 (EP), BR - IRGA 409 (BR) e Nipponbare (Np). FAEM/UFPEl-CGF, 2012.....	76

Figura 20b. Plotagem das cargas (*scores*) do CP1-CP3 referentes as 17 sequências de ERFs e aos genótipos de arroz irrigado (Epagri 108 (EP), BR - IRGA 409 (BR) e Nipponbare (Np). FAEM/UFPel-CGF, 2012.....77

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequências de nucleotídeos utilizados nas análises de expressão em RT-PCR. CGF/FAEM/UFPeI, 2012.....	39
Tabela 2	Resultados do experimento de validação dos 32 <i>ERFs</i> analisados no experimento de validação, em relação ao padrão de referência <i>GAPDH</i> . FAEM/UFPeI, 2012.....	44
Tabela 3	Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis respostas, considerando três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao excesso de Fe^{2+} (0; 6; 12; 18 e 24h), através da análise de RT-PCR. FAEM/UFPeI-CGF, 2012.....	68
Tabela 4	Número de ocorrências de elementos <i>cis</i> em promotores de <i>ERFs</i> de genes considerados de regulação complexa. FAEM/UFPeI-CGF, 2012.....	69
Tabela 5	Número de ocorrências dos elementos <i>cis</i> significativos dentro do grupo dos 17 <i>ERFs</i> . FAEM/UFPeI-CGF, 2012.....	70
Tabela 6	Componentes principais (CP), autovalores (λ_i), percentagem de variação (% VCP) e da variação acumulada explicada pelos componentes principais (% VCP acumulada) considerando a expressão quantitativa das 17 sequências de <i>ERFs</i> referentes aos genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao excesso de Fe^{2+} (0; 6; 12; 18 e 24h). FAEM/UFPeI-CGF, 2012.....	73
Tabela 7	Autovetores correspondentes ao três componentes principais (CP1, CP2 e CP3) para as 17 variáveis referentes as sequências de <i>ERFs</i> , considerando os genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao excesso de Fe^{2+} (0; 6; 12; 18 e 24h). FAEM/UFPeI-CGF, 2012.....	75

Sumário

Resumo.....	07
Abstract	08
Lista de Figuras	09
Lista de Tabelas	13
1 Introdução	16
2 Revisão Bibliográfica	19
2.1 Melhoramento Genético.....	19
2.2 Cultura do Arroz.....	21
2.2.1 Origem e evolução.....	21
2.2.2 A importância do arroz como genoma modelo.....	21
2.2.3 A importância do arroz.....	22
2.3 Ferro no solo.....	24
2.3.1 Estratégias de absorção de ferro pelas plantas.....	25
2.3.2 Excesso de Ferro na planta.....	26
2.4 O Estresse Vegetal.....	28
2.5 Etileno.....	29
2.5.1 Síntese e Sinalização.....	29
2.5.2 Produção de etileno em condições de estresse.....	32
2.6 ERFs (<i>Ethylene Responsive Factors</i>).....	34
2.7 Elementos regulatórios da transcrição.....	35

3.0 Material e Métodos.....	37
3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	37
3.2 Extração de RNA.....	38
3.3 Síntese de cDNAs.....	38
3.4 Análise RT-PCR.....	39
3.5 Identificação de elementos cis na região promotora de genes <i>ERFs</i>.....	42
3.6 Análise estatística.....	42
4 Resultados e Discussão.....	44
4.1 Expressão gênica de <i>ERFs</i> por RT-PCR.....	45
4.2 Análise de Correlação entre os <i>ERFs</i>.....	66
4.3 Identificação de elementos <i>Cis</i> em regiões promotoras de genes <i>ERFs</i>.....	69
4.4 Associação de elementos <i>Cis</i> com perfil de expressão de <i>ERFs</i> em condições de excesso de ferro.....	71
4.5 Associação de elementos <i>Cis</i> com as correlações.....	72
4.6 Análise de Componentes Principais (ACP).....	72
5 Conclusões.....	78
6 Referências Bibliográficas.....	79
7 Vitae.....	92

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento que apresenta um papel central na nutrição humana, alimentando mais da metade da população mundial, além de desempenhar um importante papel tanto a âmbito social, econômico e cultural (FAO, 2012). Estima-se que a produção mundial de arroz deve aumentar em 30% nos próximos 20 anos para atender as demandas projetadas de crescimento populacional e desenvolvimento econômico (IRGSP, 2005).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (2012), a busca por cultivares com alta qualidade industrial, produtivas e principalmente tolerantes a estresses ambientais é cada vez maior. Porém, sabe-se que os vegetais estão continuamente expostos a estresses bióticos e abióticos no ecossistema de cultivo. Dentre os estresses abióticos que afetam a produtividade do arroz destacam-se os estresses ocasionados pelo excesso de nutrientes, como o ferro.

O cultivo irrigado representa a principal e mais produtiva forma de produção de arroz no Rio Grande do Sul. Este sistema de produção aliado às características de solos hidromórficos, caracterizados por drenagem natural deficiente, proporciona o acúmulo de óxido de ferro, que resulta no aumento da disponibilidade de Fe^{2+} no solo a níveis que podem ser tóxicos as plantas cultivadas nestas condições (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998).

A toxidez por ferro é um tipo de estresse abiótico que limita a produção do arroz irrigado a nível mundial (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARDA, 2001), causando perdas consideráveis que podem representar até 100% de redução no rendimento dependendo do nível da toxidez e da tolerância das cultivares de arroz (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004). Desta forma,

é fundamental solucionar os problemas relacionados a este estresse, a fim de estabelecer uma melhor estratégia de produção de arroz.

É conhecido que uma rede regulatória complexa está envolvida na indução de genes em resposta a estresses. Na maioria dos casos, estes processos são coordenados por fitohormônios como etileno e ácido abscísico (FUJIMOTO et al., 2000; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Dentre os genes que estão relacionados à resposta e à tolerância a estresses ambientais, destacam-se os genes pertencentes à família ERF (Ethylene Responsive Factors).

Uma análise computacional com o auxílio da base de dados TIGR (Rice Genome Annotation Project), revelou a presença de 139 *ERFs* em arroz (NAKANO et al., 2006). Entretanto, há uma grande dificuldade de se estudar a expressão relativa de cada gene dessa família em diferentes estádios de desenvolvimento, assim como sob diferentes condições de estresse, devido a alta similaridade entre as sequências de *ERFs* (PEGORARO et al., 2012, em preparação) e maiores estudos sobre o papel específico de cada ERF na ativação de genes e consequente resposta fenotípica das plantas a determinadas condições devem ser realizados (NAKANO et al., 2006).

Além disso, é de extrema importância que estudos comparando a regulação transcricional entre cultivares com capacidades distintas de tolerância a estresses sejam feitas, a fim de que as informações obtidas possam ser utilizadas no melhoramento genético para a obtenção de plantas que confirmem maior capacidade adaptativa frente a condições ambientais adversas (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007; GAO et al., 2008).

A expressão gênica é amplamente controlada na fase de transcrição, onde a interação entre fatores de transcrição e elementos *cis* na região promotora de um gene desempenha um papel crucial (BRIVANLOU; DARNELL, 2002). Um estudo realizado em nosso grupo (PEGORARO et al., 2012, em preparação) verificou que dos 139 *ERFs* do arroz, 77 apresentaram sequência completa (*full-length*). Dos 77, 45 apresentam dados de expressão gênica na ferramenta *Genevestigator*, e os 32 restantes não apresentam nenhuma informação disponível na literatura.

Conhecendo o papel de destaque exercido pelo arroz na agricultura brasileira, os problemas acarretados por excesso de ferro no solo, a falta de informação e a

importância dos genes *ERFs* frente a estresses, além da importância da identificação de elementos *cis* na região promotora desses genes, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão diferencial de 32 genes *ERFs* em arroz submetidos a condições de estresse por ferro, em três cultivares, Nipponbare, Epagri 108 (tolerante à toxidez por ferro) e BR-IRGA 409 (sensível à toxidez por ferro) e identificar elementos *cis* na região promotora de genes *ERFs* em arroz, com o intuito de relacionar a presença desses elementos com determinado perfil de expressão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Melhoramento genético

A partir do momento em que o homem primitivo mudou seu hábitonômade e fixou-se à beira dos grandes rios, formando verdadeiros aglomerados humanos com uma maior densidade populacional, não podendo mais ser suportados pela caça e coleta, deu-se início a domesticação de plantas e animais. Essa mudança de costume levou o homem a iniciar a agricultura há 10.000 anos, sendo esta, um passo decisivo para o desenvolvimento da espécie (MARINO, 2006).

A ação antrópica sobre a natureza é tão antiga quanto à história da humanidade. Na medida em que o homem começou o inconsciente processo de seleção artificial, mudou as características e arquitetura de diversas espécies vegetais, dando início ao processo de domesticação. Tal fato fez com que determinadas espécies perdessem características que garantiam sua sobrevivência em condições naturais ou selvagens, e se tornassem dependentes da ação do homem (MARINO, 2006).

O melhoramento genético de plantas “É a arte e a ciência de melhorar geneticamente plantas para o benefício da humanidade”. A arte do melhoramento depende da habilidade do melhorista de observar características visíveis de cada indivíduo que tenham importância econômica, e como ciência, o melhoramento depende de várias áreas do conhecimento (POEHLMANN; SLEPER, 1995). O grande estímulo que a ciência desempenhou sobre o melhoramento de plantas, se deu a partir de 1900, com a redescoberta das leis de Mendel, que possibilitou a incorporação do conhecimento da base da hereditariedade e aceleração no processo de melhoramento de plantas.

Um dos principais objetivos do melhoramento genético de plantas é o desenvolvimento de cultivares superiores, melhor adaptadas às condições adversas, as quais restringem a expressão do potencial produtivo, bem como a adaptação de genótipos em novos ambientes e principalmente aqueles que apresentam alto potencial produtivo. Desta forma, os programas de melhoramento buscam constantemente por constituições genéticas que apresentem um grande potencial genético para produtividade. Porém, para que estes objetivos sejam alcançados e se obtenha sucesso em um programa de melhoramento é fundamental presença da variabilidade genética, eficiência na seleção dos genótipos mais promissores e ajuste das melhores constituições genéticas ao ambiente de cultivo. Entretanto, a identificação da variabilidade é um dos fatores limitantes para o melhorista, pois a avaliação de um determinado caráter pode ser confundida pela ação do ambiente e por interações alélicas ou gênicas (CARVALHO et al., 2003).

O processo de melhoramento de plantas pode ser acelerado com a utilização de técnicas de biotecnologia, como marcadores moleculares, associados a genes de interesse, o qual torna possível a identificação de genótipos portadores de alelos promissores sem a ação do ambiente (COSTA de OLIVEIRA, 1998; MAIA, 2007).

A identificação e caracterização da função dos genes são fundamentais para a compreensão dos processos biológicos, nos quais estes genes estão envolvidos. O estudo do conjunto de transcritos expressos em uma célula ou tecido (transcriptômica) representa o primeiro passo na caracterização funcional dos genes. Desta forma, a realização de estudos da expressão gênica e a compreensão das mudanças que ocorrem na célula em condições de estresses ambientais permitem a correlação de respostas da planta e mecanismos de tolerância, na qual facilita não somente a prática de seleção de genótipos promissores que suportem diferentes estresses sem que haja perdas na produtividade, mas também podem auxiliar no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento (BHATNAGAR-MATHUR; VADEZ; SHARMA, 2008).

2.2 Cultura do arroz

2.2.1 Origem e evolução

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à divisão das angiospermas, grupo das Liliopsida, família Poaceae, tribo Oryzæ, e gênero *Oryza*. É uma planta anual e com reprodução por autogamia. A tribo Oryzæ, que contém o gênero *Oryza*, é composta por 23 espécies, destas, apenas duas são cultivadas, *Oryza sativa* L. (arroz cultivado asiático), proveniente da forma silvestre espécie *Oryza rufipogon* e a *Oryza glaberrima* (arroz cultivado africano), derivado da espécie silvestre *Oryza barthii* (VAUGHAN; CHANG, 1995; GE et al., 1999; COSTA DE OLIVEIRA; MAGALHÃES JR., 2008). Ambas diplóides com $x=12$ cromossomos ($2n=24$ cromossomos).

Devido sua importância na alimentação humana, a espécie *Oryza sativa* é mais difundida mundialmente. Atualmente, estão descritas três subespécies de *O. sativa*, *indica*, *japonica* e *javanica* (LONDO et al., 2006), que apresentam como centro de origem o Sudeste Asiático mais precisamente a região compreendida entre a Índia e Mianmar (antiga Birmânia) (GRIST, 1978; PEREIRA, 2002).

2.2.2 A importância do arroz como genoma modelo

O arroz (*Oryza sativa* L.) subsp. *japonica* cv. Nipponbare teve seu genoma completamente sequenciado no ano de 2005 por representantes de 10 Países que constituíram o Projeto Internacional de Sequenciamento do Genoma do Arroz (IRGSP-International Rice Genome Sequencing Project). Esta iniciativa deflagrou inúmeros avanços na área da biotecnologia vegetal, além de pesquisas inéditas, sendo a primeira cultura alimentar para a qual a sequência completa dos genes foi disponibilizada (IRGSP, 2005).

Por apresentar um genoma pequeno de aproximadamente 390 Mb, alto grau de sintonia com outros cereais e mapas físicos de alta densidade, o arroz é considerado o organismo modelo entre as plantas da família Poaceae, permitindo a transferência de informações genéticas importantes para estudos de genômica estrutural e funcional

entre as poáceas, além de beneficiar as espécies menos favorecidas tecnologicamente e que apresentam genomas maiores como o milho (2.500 Mb), cevada (5.500 Mb) e trigo (16.000 Mb) os quais têm estudo mais complicado (MOORE et al., 1995; IRGSP, 2005; BRESOLIN; 2010).

2.2.3 A importância do arroz

O arroz é um alimento muito importante para mais da metade da população mundial, desempenha um papel fundamental em âmbito social, econômico e cultural. Cobrindo em torno de 11% da área cultivável no mundo, o arroz serve como fonte de renda e de empregos, sendo que um quinto da população mundial depende de seu cultivo para sua subsistência. Em muitos dos países em desenvolvimento, o arroz é considerado segurança alimentar, e está intimamente ligado a segurança política (IRRI; FAO, 2012).

Mundialmente, o arroz ocupa a segunda posição como cereal mais cultivado, com produção média próximo a 696 milhões de toneladas. Em primeiro lugar está o milho, com uma produção média de 700 milhões de toneladas, e o terceiro lugar é ocupado pelo trigo, com uma produção média de 600 milhões de toneladas (FAO, 2010). Dos três cereais, no entanto, o arroz tem a sua maior proporção da produção usada para a alimentação humana (Costa de Oliveira, comunicação pessoal). Os países asiáticos, são os maiores produtores e consumidores mundiais, com uma produção de 197,2 milhões de toneladas, cerca de 90% do arroz do mundo. Na América Latina, o arroz é a segunda maior fonte de calorias diárias, perdendo apenas para o açúcar, constituindo um produto básico na dieta da população. O Brasil aparece em 9º lugar entre os Países produtores, com uma produção de 11.600,3 mil toneladas e uma área cultivada na safra 2011/12 de 2.427,1 mil hectares, com uma produtividade média de 4.779 kg ha⁻¹. (FAO, 2012).

Nesta última safra, 2011/2012 houve uma queda da produção na região Sul, onde se concentram 51,0% da área cultivada e contribui com 77,4% da produção nacional de arroz. Essa redução se deve à dificuldade de comercialização, preços pouco atrativos, falta de água nos reservatórios, aumento do custo de produção e

principalmente devido à redução significativa de áreas cultivadas. No Rio Grande do Sul, essa redução chegou a quase 11,4% da área cultivada, porém esta diminuição não foi percebida na produção nacional, pois há um constante aumento da produtividade (CONAB, 2012).

Desta forma, o RS caracteriza-se por apresentar uma grande importância na produção de arroz no Brasil e no MERCOSUL, apresentando uma área semeada de aproximadamente 1,084 milhões de hectares. A produtividade média de arroz no RS ultrapassa $7,2 \text{ t/ha}^{-1}$, contra uma média de $2,3 \text{ t/ha}^{-1}$ no Brasil (CONAB, 2012).

De acordo com o Lee (1993), existem quatro sistemas de cultivo de arroz, o cultivo irrigado (áreas niveladas com controle da água e inundação durante crescimento das plantas), sequeiro em várzea (falta de controle da água e problemas com enchentes e secas), sequeiro (terrenos inclinados com escoamento de água), e o ecossistema de áreas propensas a enchentes (até cinco meses de submersão completa).

A maior parte da produção de arroz vem do cultivo irrigado, visto que cultivo de sequeiro, está diminuindo a cada safra e isto se torna uma problemática, uma vez que não há espaço disponível para expandir a área cultivada. Com o acelerado desenvolvimento da população, a estimativa é que nos próximos 20 anos, a produção mundial de arroz aumente 30% para atender as necessidades do desenvolvimento populacional e econômico (IRGSP, 2005). Além disso, a produtividade de arroz é reduzida pela presença de diferentes estresses bióticos e abióticos durante o cultivo. Desta forma, para aumentar a produtividade do arroz nestas condições é necessária a obtenção de novas variedades, provenientes de trabalhos de biotecnologia e melhoramento genético (ZHANG et al., 2008).

A utilização da biotecnologia entra como uma grande ferramenta neste processo, auxiliando na identificação de genótipos de arroz com maior potencial de rendimento, maior estabilidade de produção e adaptabilidade as mudanças climáticas globais, além de resistência durável a pragas e patógenos e tolerância a estresses abióticos (WU et al., 1998; BENNETT, 2001; SHIMIZU et al., 2005; WISSUWA, 2005).

2.3 Ferro no solo

Embora presente no solo quase que somente na sua forma oxidada (Fe^{3+}), o ferro pode ser absorvido pela planta como Fe^{2+} (ferroso), Fe^{3+} (férico) e complexos orgânicos (MARSCHNER, 1995; BRIAT; LOBRÉAUX, 1997; KOBAYASHI; NISHIZAWA 2012).

O Fe^{3+} é um composto de baixa solubilidade e sua disponibilidade diminui em ambientes aeróbicos com pH alto, atingindo um mínimo para valores de pH variando de 7,4 a 8,5 sendo que os compostos de ferro ferroso são muito mais solúveis que os compostos féricos (LINDSAY; SCHWAB, 1982).

A solubilidade do ferro tende a aumentar com a diminuição do potencial redox, de maneira que praticamente todo ferro presente no solo esteja na forma reduzida (Fe^{2+}) (LINDSAY, 1979; BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998; AHLERT, 2010). Sendo absorvido em excesso pelas plantas (MAGALHÃES JR. et al., 2009).

Em solos inundados, como requer o cultivo irrigado, aliado com as condições de solo hidromórfico presentes no Rio Grande do Sul, caracterizados pela drenagem natural deficiente a água funciona como uma barreira para a difusão do oxigênio atmosférico para o solo, tornando o ambiente hipóxico. O oxigênio molecular dissolvido na água é consumido pelos microrganismos aeróbicos, que com o tempo são substituídos pelos anaeróbios, resultando num ambiente de redução e acúmulo de CO_2 .

Este acúmulo de CO_2 diminui o pH favorecendo a redução de compostos oxidados (PONNAMPERUMA, 1972). O ferro, ao reagir com formas reduzidas de oxigênio, catalisa a produção de espécies de radicais livres. Estas moléculas altamente reativas podem danificar os componentes celulares, levando a uma perda da integridade celular e possível morte (GUERINOT; YI, 1994). Como consequência destas propriedades de solubilidade e toxidez, as plantas desenvolveram mecanismos de controle no fluxo de ferro (BRIAT; LOBRÉAUX, 1997).

2.3.1 Estratégias de absorção de ferro pelas plantas

O metabolismo do ferro apresenta dois problemas principais para as plantas: deficiência e excesso, ambos devido a questões ligadas a solubilidade (SANTOS; COSTA de OLIVEIRA, 2007). Para atender a necessidade de desenvolvimento, crescimento, evitar a deficiência em solos aerados, no qual o Fe presente apresenta-se em sua forma oxidada trivalente (Fe^{+3}), sendo pouco disponível para as plantas, bem como evitar a toxidez pelo excesso deste elemento, as plantas desenvolveram estratégias específicas que permitem a absorção de ferro em ambas formas divalente (Fe^{+2}) e trivalente (Fe^{+3}) a fim de minimizar disfunções nutricionais que podem afetar o seu funcionamento fisiológico (PONNAMPERUMA, 1972).

A estratégia I, baseia-se na redução do ferro em sua forma férrica (Fe^{3+}) para ferrosa (Fe^{2+}). Inicialmente ocorre a protonação da rizosfera por meio *ATPases*, presentes nas células epidérmicas radiculares, afim de acidificar o pH da solução do solo. Essa acidificação do meio aumenta a solubilidade do ferro na rizosfera e consequente redução do Fe^{3+} oxidado para a forma solúvel Fe^{2+} , através da enzima Fe^{3+} -quelato redutase. Após a redução, o ferro é transportado para o interior da célula da raiz por proteínas específicas IRT1, (*Iron Regulated Transporter 1*). Esta estratégia inclui magnoliopsida e liliopsidas, com exceção de algumas gramíneas (EIDE et al., 1996; ROBINSON et al., 1999; GUERINOT, 2000; HELL; STEPHAN, 2003; KIM; GUERINOT, 2007).

A estratégia II, em geral utilizada pelas poáceas, consiste na quelação do ferro. Essas plantas liberam compostos da família dos ácidos muginêicos, conhecidos como fitosideróforos (FS), que quelam Fe^{3+} na rizosfera (HELL; STEPHAN, 2003). Os FS possuem alta afinidade por Fe^{+3} e se ligam eficientemente ao ferro trivalente na rizosfera, produzindo complexos PS- Fe^{3+} que são transportados para o interior das células da raiz por transportadores específicos da família Yellow Stripe –Like (YSL), sem que seja necessária uma redução extracelular. (MORI, 1999; CURIE et al., 2001; HELL; STEPHAN, 2003; SCHAAF et al., 2004; GENDRE et al., 2007).

Os FS são sintetizados a partir da *L*-metionina via nicotianamina (NA), pela ação das enzimas sintase da nicotinamida (NAS) e transferase da nicotinamida (NAAT). A via de biossíntese do FS foi quase completamente decifrada em cevada (MORI, 1999; NEGISHI et al., 2002). As enzimas envolvidas nessa rota demonstram atividade intensificada em condições de deficiência de ferro (AHLERT, 2010).

Outras estratégias também tem função auxiliar na absorção de ferro, como aumento da concentração de citrato no floema e alterações morfológicas na raiz (SCHMIDT, 1999).

Embora o arroz faça parte da classe das poáceas, que até pouco tempo acreditava-se que usavam somente íon férrico disponível na rizosfera através da liberação de fitosideróforos (RÖMHMELD; MARSCHNER, 1986), já foi comprovado que o arroz também é capaz de absorver Fe^{2+} diretamente da rizosfera, e é possível que esta capacidade esteja relacionada a uma característica adaptativa, tendo em vista que em solos alagados a disponibilidade de ferro Fe^{2+} é muito maior que a de Fe^{3+} (ISHIMARU et al., 2006).

As plantas apresentam estratégias tanto para diminuir os riscos de deficiência como de excesso do ferro. Entretanto, em condições de altas concentrações do elemento no solo, as plantas podem absorvê-lo demasiadamente resultando em problemas severos de toxidez. Desta forma, as plantas necessitam manter a homeostase do ferro, protegendo-se do excesso e absorvendo somente as quantidades necessárias do íon (BRIAT; LOBRÉAUX, 1997; GROSS, et al., 2003).

2.3.2 Excesso de Ferro na planta

A toxidez por ferro é um dos principais distúrbios nutricionais que afetam a produção de arroz irrigado em diversos locais do mundo principalmente em países da Ásia, incluindo China, Índia, Indonésia, Tailândia, Malásia e Filipinas; Oeste da África e América do Sul (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARD, 2001; SOUSA et al., 2004), e foi relatada pela primeira vez há mais de quarenta anos na Ásia, e desde então vem sendo exaustivamente estudada. Áreas ideais para o cultivo de arroz, como na África Ocidental e Central, são pouco exploradas, devido à toxidez por excesso de

ferro. Nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem alcançar 80%, enquanto no Rio Grande do Sul pode chegar a 20% (BACHA, 1993).

Problemas de toxidez em arroz irrigado estão relacionados com o tempo de exposição e com alta concentração do íon ferroso na solução do solo. Desta forma, a redução do rendimento pode variar de 12 a 100%, e a eficácia do mecanismo de tolerância é dependente da intensidade e da duração do estresse, bem como das cultivares utilizadas (PONNAMPERUMA et al., 1972; SAHRAWAT, 2004; ASCH; BECKER; KPONGOR, 2005).

No Rio Grande do Sul, foram descritos os primeiros problemas de toxidez por ferro a partir do final da década de setenta, quando se começou a utilizar cultivares modernas, de porte baixo e com alto potencial produtivo (GOMES et al., 1990; MAGALHÃES JR. et al., 2009). Cultivares altamente produtivas como BR-IRGA 409, BR-IRGA 410 e BRS Pelota, entre outras amplamente difundidas até recentemente na lavoura orizícola gaúcha, têm mostrado sensibilidade à toxidez por ferro (MAGALHÃES JR. et al., 2007).

A concentração de ferro solúvel, que anterior à submergência do solo raramente excede $0,1\text{mg L}^{-1}$, pode chegar, em solos ácidos, a aproximadamente 600mg L^{-1} (PONNAMPERUMA, 1972). Entretanto, já foram detectados em alguns casos, valores até 5.000mg L^{-1} (HANSEN; BREEMEN, 1975). A toxidez por ferro pode ser direta ou indireta. A toxidez direta ocorre devido à absorção excessiva e posterior acúmulo de ferro nos tecidos da planta. Primeiramente é caracterizada pela presença de manchas castanhas (bronzamento), nas folhas jovens, onde o elemento se deposita, em estágios mais avançados de toxidez, ocorrem necrose, retardo no crescimento e consequente redução da produtividade, podendo em caso extremos acarretar a morte da planta (PONNAMPERUMA, 1972; BIENFAIT, 1985; VAHL, 1991; SOUSA, 2004).

A toxidez indireta resulta da limitação à absorção pelas plantas de diversos nutrientes, como cálcio, magnésio, potássio, fósforo e do próprio ferro, devido à precipitação do ferro sobre a epiderme das raízes do arroz (capa férrica). A formação dessa camada de óxido férrico bloqueia os sítios de absorção de nutrientes nas raízes, resultando em uma deficiência nutricional múltipla e no amarelecimento das folhas que evolui do ápice para a base, além do espessamento e paralização do funcionamento

das raízes. Nos estágios iniciais de desenvolvimento as plantas sofrem severo retardo no crescimento e afilham pouco. Já em estágios mais avançados o rendimento de grãos é reduzido devido à produção de panículas menores e alta proporção de espiguetas estéreis (YOSHIDA 1981, LANTIN; NEUE, 1988).

A toxidez indireta é a forma predominante nas condições brasileiras e a mais importante, podendo causar grandes perdas em produtividade (BACHA, 1991; MAGALHÃES JR. et al., 2009).

A fim de evitar a toxidez e sustentar o crescimento, as plantas remobilizam e armazenam o ferro que não é utilizado pelo metabolismo nos vacúolos e em proteínas específicas, chamadas ferritinas. Os vacúolos atuam no acúmulo do excesso do metal e na sua liberação quando o suprimento externo é deficiente. Em arroz, é descrito a ocorrência de duas proteínas da classe das ferritinas, FER1 e FER2 (BRIAT; LEBRUN, 1999; GROSS et al., 2003; KIM; GUERINOT, 2007). A ferritina atua como mecanismo fortemente envolvido na tolerância a esse metal, uma vez que íons de Fe^{2+} se ligam a um sítio específico localizado dentro da subunidade helicoidal, chamado centro ferroxidase. O ferro interage com o oxigênio e é oxidado a Fe^{3+} e depois migra para a cavidade onde se agrega para formar o núcleo de ferro. A expressão de ferritina é dependente de ação de fatores externos, uma vez que sua síntese é desencadeada devido ao excesso ou deficiência de ferro na célula. (AROSIO; LEVI, 2002).

2.4 O Estresse Vegetal

Estresses são fatores que afetam negativamente o crescimento e a produtividade das plantas cultivadas. Estima-se que somente 3,5% da área total cultivada no mundo não é afetada por algum tipo de estresse ambiental. Dentre os estresses aos quais as plantas são submetidas, encontram-se os estresses bióticos, causados por organismos vivos, e os abióticos, os quais são definidos por condições ambientais adversas (2003; PEGORARO, 2012; SHINOZAKI-YAMAGUCHI; MIZOI, 2013).

Em geral, estresses abióticos (anoxia/hipoxia, frio, seca, calor, salinidade, metais pesados, radiação UV-B, dentre outros) induzem uma série de modificações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em plantas. As respostas das

plantas a estresses abióticos são dinâmicas e complexas, e podem ser reversíveis ou irreversíveis, e estas respostas dependem do tecido ou do órgão afetado, e do tempo de exposição ao estresse (CRAMER et al., 2011).

Com relação ao estresse ocasionado pelo excesso de ferro no solo, o manejo para os distintos tipos de toxidez (toxidez direta e toxidez indireta), requer diferente estratégias (SAHARWAT, 2004). Há algum tempo práticas agronômicas, como plantio alternativo, manejo hídrico adequado e aplicação de fertilizantes têm sido utilizados, além disso, ultimamente cultivares de arroz com diferentes níveis de tolerância a toxidez por excesso de ferro vem sendo desenvolvidas através do melhoramento genético de plantas, sendo este o método amplamente utilizado. (FAGERIA; RABELO, 1987; SAHRAWAT et. al, 1996). Entretanto, devido à diversidade de ambientes, em que a toxidez por ferro pode ocorrer, nenhuma dessas opções é universalmente aplicável e eficiente (BECKER; ASCH, 2005). Assim, para evitar perdas ocasionadas por estes desequilíbrios ambientais, é de fundamental importância compreender o impacto do excesso de ferro sobre genes responsivos a esse estresse em diferentes cultivares de arroz, bem como as respostas das plantas frente a distúrbios que perturbam o seu equilíbrio homeostático celular e molecular, pois ainda são pouco conhecidas as interações entre o excesso deste metal e diferentes genótipos de arroz (SAHRAWAT, 2004). Essa informação pode ser utilizada para obtenção de plantas resistentes a estresses. Entre as estratégias empregadas pelas plantas frente a essa problemática está a modificação da síntese de hormônios (SHANKER; VENKATESWARLU, 2011).

2.5 Etileno

2.5.1 Síntese e Sinalização

O etileno (C_2H_4), fitohormônio gasoso, é o mais simples alceno (hidrocarboneto insaturado, com fórmula C_nH_{2n}) existente, que atua como um potente regulador de crescimento. Provavelmente, todas as células das plantas superiores produzem e liberam etileno (OSBORNE, 1989), sendo a quantidade produzida variável com o tecido e com o estágio de desenvolvimento, estando envolvido em vários processos do

desenvolvimento das plantas, além de ser altamente influenciado em resposta a estresses bióticos e abióticos (FACHINELLO; KERSTEN, 1996; SMALLE; VAN DER STRAETEN, 1997). O etileno somente foi descoberto como um fitormônio em 1901, pelo russo Dimitry Neljubov, o qual observou modificações anatômicas em plântulas de ervilha cultivadas no escuro em presença de um gás de carvão presente no laboratório (ZEIGER; TAIZ, 2009).

Atualmente a via de biossíntese do etileno é bem elucidada. A síntese começa a partir do aminoácido metionina o qual é convertido em SAM (S-adenosilmetionina) através da enzima SAM sintetase. A molécula SAM é convertida em ACC (1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico) pela enzima ACC sintase, a qual pode ser induzida por diversos estresses e hormônios. O segundo passo da biossíntese ocorre através da conversão de ACC em etileno, por meio da enzima ACC oxidase (ACO) (Fig. 1).

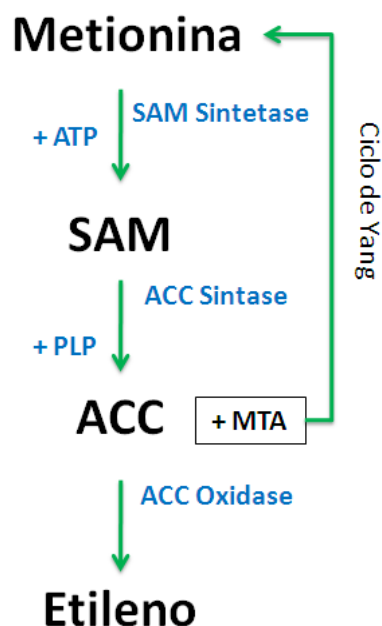


Figura 1. Via de biossíntese do etileno

Após a síntese, o etileno é percebido por receptores (ETRs), localizados na membrana do retículo endoplasmático, os quais levam a transdução do sinal até o núcleo. Em arabidopsis, o etileno é percebido por 5 receptores (ETR1, ETR2, ERS1,

ERS2 e EIN4) (CHANG; STADLER, 2001). Esse processo incluiu reguladores positivos e negativos e ocorre através de uma cascata de sinalização, que regula a expressão de genes alvo que, posteriormente, serão responsáveis por mudanças em vias metabólicas (BAPAT et al., 2010). Na ausência de etileno, os receptores de membrana atuam como reguladores negativos da sinalização do etileno por ativação de CTR1 (*constitutive triple response1*). CTR1 atua inibindo EIN2 (*ethylene insensitive*), que seria responsável pela inibição de EBF1/2 (*EIN3-binding F-box protein*). CTR1 atua inibindo EIN2 (*ethylene insensitive*), que estaria responsável pela inibição de EBF1/2 (*EIN3-binding F-box protein*). Como EBF1/2 estão ativos, inibem EIN3/EIL1 que são responsáveis pela ativação de ERFs (*Ethylene responsive factors*) através da ligação na região promotora (PERE) destes genes, que por sua vez podem se ligar ao elemento de resposta secundário ao etileno, o SERE (*secondary ethylene response element*). Estes apresentam uma sequência *GCC box* na região promotora de genes regulados por etileno e, deste modo, controlando a sua expressão. Quando o etileno está presente, os cinco receptores de membrana inibem CTR1, o qual não vai inibir EIN2, e este atuará na inibição de EBF1/2, permitindo a ação de EIN3/EIL1, que se ligarão na região promotora dos ERFs (*Ethylene responsive factors*), os quais ativarão outros genes responsivos ao etileno (DUGARDEYN; VAN DER STRAETEN, 2008) (Fig. 2), com funções importantes na resposta das plantas a diferentes estádios de desenvolvimento, assim como em diferentes condições de estresses.

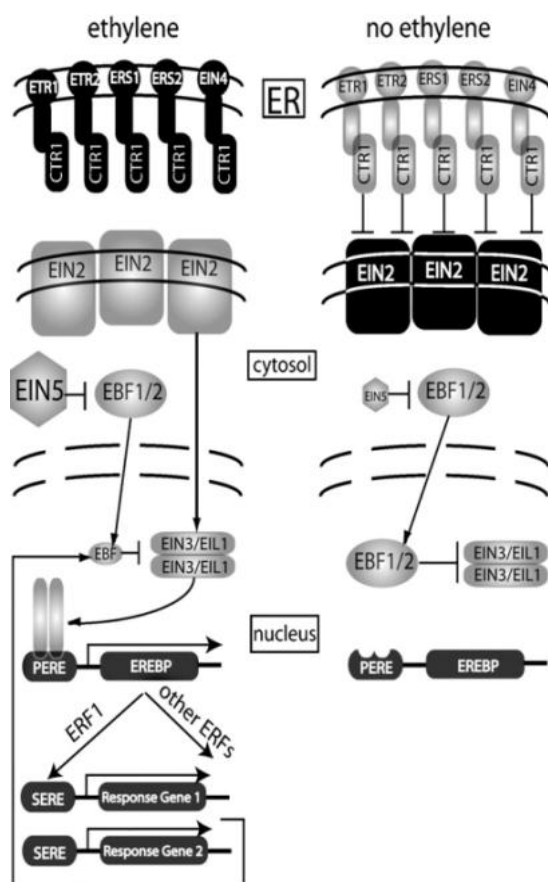


Figura 2. Sinalização do etileno, adaptado de Dugardeyn, 2008.

O papel do etileno no crescimento e desenvolvimento vegetal é importante, principalmente pela interação do etileno com outros hormônios, bem como a necessidade de maiores pesquisas visando identificar fatores que modulam respostas específicas ao etileno (DUGARDEYN, 2008).

2.5.2 Produção de etileno em condições de estresse

Sabe-se, há algum tempo, que pode ocorrer um incremento na síntese de etileno em resposta a uma série de estresses bióticos ou abióticos, como, por exemplo, seca (EL BELTAGY; HALL, 1974), salinidade (EL BELTAGY et al., 1979), fermentos (GOESCHL et al., 1966) encharcamento (KAWASE, 1972; EL BELTAGY; KHALIFA;

HALL, 1974) toxidez por ferro (PENG; YAMAUCHI, 1993; YAMAUCHI et al., 1995). Este aumento da produção, que auxilia na adaptação, e na sobrevivência do vegetal em condições adversas resulta da indução da ACC sintase, levando ao aumento no conteúdo de ACC.

A ACC sintase pertence a uma família multigênica com várias isoformas, as quais apresentam baixa homologia, exceto nos seus domínios catalíticos. Estes diversos membros e grupos são expressos diferencialmente e podem ser induzidos de maneiras distintas a vários fatores ambientais. Isto explica o motivo pelo qual a biossíntese do etileno é afetada por estresses (NAKAJIMA, et al., 1990; NAKAGAWA, et al., 1991; ZAREMBINSKI; THEOLOGIS, 1993). Além disso, outras enzimas relacionadas à rota de biossíntese do etileno, como a ACC oxidase (MORGAN; DREW, 1997; KIM et al., 1998), AdoMet sintetase, enzimas no ciclo de metionina de Yang e enzimas que conjugam ACC também podem ser reguladas por estresses (MORGAN; DREW, 1997).

A utilização de ferramentas bioquímicas e biotecnológicas, no intuito de elucidar os mecanismos de respostas ao estresse por Fe em plantas evidenciou a participação de *ERFs* na regulação de genes envolvidos na absorção e translocação do Fe, esses autores verificaram que o nível da produção de etileno apresentou uma correlação inversa com a concentração de Fe nas plantas, além disso demonstraram que os genes *ACS* e *ACO* aumentaram sua expressão em condições de deficiência de ferro (WU et al., 2011). Entretanto, um aumento de expressão para esse mesmo gene (*ACO*) em condições de toxidez por ferro em raízes de arroz foi relatado (QUINET et al., 2012).

Estudos anteriores demonstravam que sob deficiência de ferro, apenas as plantas que apresentavam a Estratégia I podiam induzir a produção e sinalização de etileno (ROMERA et al., 1999; ROMERA, ALCANTARA, 2004), porém estudos recentes demonstraram que sob condições limitantes de Fe, o arroz, que apresenta ambas as estratégias, I e II, também apresentou aumento na produção e sinalização de etileno. Isto sugere que o etileno está envolvido na regulação em ambos sistemas de absorção de Fe^{2+} e PS-Fe^{3+} , no arroz (WU et al., 2011).

2.6 ERFs - Ethylene responsive factors

ERFs (*Ethylene responsive factors*) são fatores de transcrição responsivos ao etileno, caracterizados pelo domínio AP2/ERF, composto por aproximadamente 60 aminoácidos o qual está envolvido na associação ao DNA (ALLEN et al., 1998). Estes genes foram identificados primeiramente em *Nicotiana tabacum*, como elementos que se ligam às proteínas responsivas ao etileno (*ethylene-responsive element binding proteins* - EREBPs) (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995).

A família *ERF* pode ser dividida em duas subfamílias, a subfamília *ERF* e a subfamília CBF/DREB (SAKUMA et al., 2002). A fim de modular a expressão de uma grande variedade de genes responsivos ao etileno, a maioria dos *ERFs*, se liga ao motivo GCC-Box que apresentam um domínio muito conservado GCCGCC, indicando que uma cascata de sinalização está envolvida na sinalização deste hormônio, assim os *ERFs* apresentam uma função *trans* ativação, e como foi comentado, atuam na última etapa da transdução de sinal (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995). Alguns *ERFs* atuam como ativadores de transcrição dependentes do GCC-Box e outros atuam como ativadores de repressores que inibem a transcrição de determinados genes e de outros fatores de transcrição (FUJIMOTO et al., 2000). Através de uma análise computacional com o auxílio de bancos de dados, 122 genes *ERFs* em *Arabidopsis* e 139 no arroz foram identificados (Nakano et al., 2006).

A família *ERF* apresenta membros bastante conhecidos e caracterizados, com alta importância biológica e econômica, como os elementos DREBs (*dehydration responsive element binding*) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994), relacionados ao estresse por frio, seca e salinidade. A expressão constitutiva de *Dreb1a* e *Dreb1b* em plantas de *Arabidopsis* induziu a expressão de genes *Cor* (*cold-regulated*) e aumentou a tolerância ao congelamento em plantas (GILMOUR et al., 2000; GILMOUR; FOWLER; THOMASHOW, 2004). Resultados similares foram observados para a ação constitutiva da proteína *DREB2*, sob condições de estresses por desidratação e alta salinidade (LIU et al., 1998; SAKUMA et al., 2006).

Muitos trabalhos tem demonstrado a importância dos *ERFs* diante diversos estresses bióticos ou abióticos. Uma série de perturbações ambientais, podem levar a

superexpressão de genes *Erf* aumentando a tolerância das plantas frente estas situações, como por exemplo, frio (SAKUMA et al., 2006), salinidade (WU et al., 2008), seca (KARABA et al., 2007), anoxia/hipóxia (XU et al., 2006), excesso de ferro (QUINET et al., 2012).

Conhecendo a importância das proteínas pertencentes à família *ERF* em processos celulares, como resposta a diferentes estresses, regulação do metabolismo, transdução de sinal de hormônios, genes *ERFs* são considerados importantes em estudos de melhoramento, com a finalidade de investigar seu comportamento frente estresses ambientais para a obtenção de plantas resistentes a condições ambientais adversas, mantendo a alta produtividade.

2.7 Elementos regulatórios da transcrição

As plantas desenvolveram ao longo do tempo, capacidades de responder a estímulos externos e reagir contra adversidades, percebendo e transferindo sinais intra e extracelulares, através da ativação ou inativação de genes.

Análises genômicas e de transcritos indicam que há diversos sistemas responsáveis pelo controle da expressão gênica durante o estresse. Nessas condições foram identificadas diferentes regiões e/ou estruturas de fatores de transcrição que estão envolvidos na expressão desses genes (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). Estes fatores de transcrição se ligam em regiões específicas do DNA, denominadas *cis acting regulatory elements* (CARE), interagindo de forma específica com esses elementos e coordenando a iniciação da transcrição (KORNBERG, 2007).

O início da transcrição se dá através do reconhecimento e da ligação de elementos *trans* a sequências específicas de DNA. Estes elementos são classificados de acordo com o domínio de ligação no DNA, onde fatores de transcrição que possuem estruturas de reconhecimento semelhantes pertencem à mesma família. Os fatores de transcrição atuam sinergicamente, assim o nível de transcrição dependerá de quais fatores de transcrição estão ativos (ALBERTS et al., 2002).

Os elementos *cis* são motivos conservados curtos, de cinco a 20 nucleotídeos, encontrados na região promotora dos genes (ROMBAUTS et al., 2003), nos *íntrons* e

próximos à região 3' (DORSETT, 1999). Elementos *cis* são interruptores moleculares envolvidos na regulação transcricional de uma rede dinâmica de genes que controlam vários processos biológicos, incluindo resposta a estresses abióticos, hormônios e processos de desenvolvimento (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI 2005).

A região promotora é dividida em duas partes, a região proximal e a região distal. Na região proximal ocorre o acoplamento do complexo da RNA polimerase II para direcionar a transcrição a níveis basais (BERK, 1999). A parte distal da região promotora contém os elementos *cis* que regulam a expressão espaço temporal dos genes (FESSELE et al., 2002).

A identificação de elementos *cis* em regiões promotoras de genes, com perfis de expressão diferencial sob determinadas condições de estresse, pode ser utilizada no entendimento da regulação das redes gênicas durante condições ambientais adversas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Capão do Leão. Foram utilizados três genótipos de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) um pertencente à subespécie *japonica*, Nipponbare, e dois pertencentes à subespécie *indica*, Epagri 108 (tolerante à toxidez por ferro) e BR-IRGA 409 (sensível à toxidez por ferro), os quais foram previamente caracterizados segundo resultados experimentais a campo conforme descrito pela SOSBAI (2010).

Inicialmente as sementes foram tratadas em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água estéril, e germinadas em papel filtro estéril, umedecido com água ultrapura e mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 15 dias, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Posteriormente as plântulas foram dispostas em telas de náilon, adaptadas a recipientes plásticos de dois litros de capacidade, de modo a manter a raiz permanentemente em contato com a solução nutritiva padrão para arroz de Camargo e Oliveira (1981) modificada: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4 μM ; MgSO_4 2 μM ; KNO_3 4 μM ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435 μM ; KH_2PO_4 0,5 μM ; MnSO_4 2 μM ; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; Na_2MoSO_4 0,10 μM ; H_3BO_3 10 μM em pH 4,0 $\pm$ 0,1. Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água a temperatura ambiente e fotoperíodo de 16 horas durante 14 dias. Após a coleta das amostras controle (0 hora), as plântulas foram transferidas para os recipientes contendo tratamento de estresse por ferro contendo solução nutritiva mais 2.000 mg L⁻¹ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 4,0 $\pm$ 0,1 conforme protocolo descrito por Asch et al. (2005). Após a transferência/início do estresse as coletas foram feitas em 6, 12, 18 e 24 horas, removendo-se a parte aérea a qual foi envolvida em papel alumínio e, rapidamente, congelada com nitrogênio líquido.

3.2 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de 0.2g de tecido foliar macerado com nitrogênio líquido e transferido para um microtubo (1,5 mL). Em seguida, foram acrescentados 500 µL de Pure Link TM mantendo o tubo na horizontal por 5 minutos a temperatura ambiente (~25°C).

Para limpar a solução, foi realizada uma centrifugação de 2 minutos a 12.000 x *g* (~25°C). O sobrenadante foi transferido para um tubo livre de RNases e adicionados 0,1 mL de NaCl (5 M) e 0,3 mL de clorofórmio, homogeneizando a solução por inversões do tubo. A amostra foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 12.000 x *g* para separar as fases, transferindo 400 µL da fase aquosa superior para um tubo livre de RNases adicionados 400 µL de isopropanol, deixando a temperatura ambiente (~25°C) por 10 minutos, antes de executar mais uma centrifugação (12.000 x *g*) a 4°C por 10 minutos.

O sobrenadante foi retirado, e adicionado 1 mL de etanol 75% ao precipitado, logo foi realizado mais uma centrifugação à temperatura ambiente (~25°C) por 1 min a 12.000 x *g*. O etanol foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma micropipeta, após foi adicionado 25 µL de água livre de RNases para ressuspender o RNA.

A quantidade de RNA foi mensurada espectrofotômetro (NanoVue - GE) e através de eletroforese em gel de agarose (2%).

3.3 Síntese de cDNAs

Para a síntese do cDNA, o RNA total foi tratado com DNase I (*Invitrogen*TM) e os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa, a partir de no mínimo 2µg de RNA total em um volume final de 20µL utilizando a enzima *SuperScript III* (*Invitrogen*) de acordo com os seguintes passos: em um tubo livre de RNases foram adicionados 2,0 µL de extrato de RNA previamente diluído, 1,0 µL DNase I (1 U.µL⁻¹), 1,0 µL de tampão (DNase I reaction buffer) 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 6,0 µL H₂O e submetidos a 25°C por 15 minutos. Posteriormente foi adicionado mais 1,0 µL de EDTA (25 mM; pH 8,0) submetendo a 65°C por 10 minutos. Logo foram colocados mais 1,0 µL de Oligo DT (50 µM), 1,0 µL de DNTP Mix

(10 mM) e submetida a 65°C por 5 minutos, seguido de mais 1 min a 0°C. Mais 4,0 µL de tampão (RT Buffer 5x), 4,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de DTT (1,4-Dithiothreitol) (0,1 M), 1,0 µL de RNase OUTTM (40 U µL⁻¹) e 1,0 µL de *SuperScript III* (200 U µL⁻¹) submetendo a 50°C por 50 minutos, seguido de mais 5 minutos a 85°C. Por fim adicionou-se 1,0 µL de RNase H (2 U µL⁻¹) submetendo-se a 37°C por 20 minutos, completando a reação de síntese de cDNA.

A qualidade dos cDNAs foi avaliada através de uma reação de amplificação com o gene constitutivo *GAPDH* (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase).

3.4 Análise RT-PCR

No experimento de validação, foram analisados 32 genes *ERFs*. As sequências foram obtidas a partir do banco de dados do The Rice Annotation Project Database - *RAP-DB* (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). O desenho dos *primers* foi realizado utilizando o programa VectorTM Software (Invitrogen®, Carlsbad, California, United States). O critério usado para a seleção dos primers foi de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems®, Foster City, California, United States), respeitando os seguintes parâmetros exigidos: formação de um *amplicon* de tamanho variando entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60%, finais 3' com menos de duas bases C e G nos últimos cinco nucleotídeos e temperatura de dissociação variando entre 60 e 65°C (Tab. 1):

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos utilizados nas análises de expressão em RT-PCR. CGF/FAEM/UFPel, 2012

Sequências	Locus	Forward	Reverse
AK241243	Os03g0191900	ATGGCGACGACAGTGGATTGGT	AAGGACACCATGGACGGAGCAA
AK068312	Os08g0408500	ATGGCTGACCTGACCGAGCATC	CTTGCTCCGACGGTGAATGAGG
AK105991	Os02g0752800	GTCGCCGACAGATGCAGAAGATC	CCCATGTAGTGAACCCGTGGA
AK243146	Os02g0676800	GCACACACCAGATCGCATCCTC	GGTTCGAGCGCTTTCATGAGCT
AK071519	Os09g0522200	ATGTGCGGGATCAAGCAGGAGA	TGCCTCGTCTCCCTGAACCTGG
AK062422	Os09g0522000	AGCTCGACGACGGGTTTCAGTT	GTAGCTCCAGAGCGGCATGTCCG
AK108830	Os02g0657000	GGCAAGTGGGTGTCGGAGATCA	CAGCCAGATGCGCGACTTCTTC
AK067313	Os01g0165000	TGCTCCGTGCAAGTGAGGAAGA	CAGCGATTGAATCAGGGCCATC
AK099221	Os05g0346200	GGGGAAAGGAGGACCGGAGAAT	ACCCACTTGCCCCAGGTACGTT
AK102559	Os05g0473300	GGAAGGAGACGTGGGGATGGAG	GCGCGAGCTTGCTTCTTCTTCC
AK108143	Os08g0565200	GCAGCAGCAAGTCACGCAAGTG	CTTCCCCTTCATGCACCCCTTC
AK101054	Os01g0224100	TGTGGCCTTTGGAGATGGAGGA	TCACCTCGACATGCTCCGTCCT

AK073133	Os03g0182800	GTGCAATCCTCGCCGATTTCAC	AACTCCGCCTCGAAGTCGACGT
AK101949	Os03g0183000	GCGGCAAGAGCAAGAGCAAGAG	GCGTCGTCGAAGTCGGAGTCAT
AK109360	Os07g0617000	CCATTCTCGGCGACCTTCACTT	CGTCGCCACCATCTCTACCCTT
AK288040	Os07g0674800	ACTTCATCCCGCAGCGGGAA	GTGGTCGAAGTCGGCGGCTT
AK064027	Os02g0782700	GCCATCATCCACCACCTGAAGG	TTCTTCTTCTCGGGCCACAGGA
AK069833	Os06g0194000	GCCATCCTCTCCGACCTCATCC	CTCCTCGCGCCCTTGTCTTCT
AK104576	Os09g0434500	GGTGTCGCGTGTGGCTTGAA	CTTGCGGGCTTCAGCGTCATAT
AK072749	Os09g0286600	ACGGTCAGCATGTCGTTGTTGC	GCCGTGGACGCACTTGTCATA
AK067373	Os04g0669200	CACTACCACCTCCCCGGGAA	TCGAGGACTCGACGGTGGAG
AK242393	Os05g0497200	CGGGAGGAGGCGGTGGAGTA	TTCCACGGGTCCCGGATCTC
AK241762	Os08g0173700	GGAGATCCGCAACCCGTACACC	TGGAGATGGCGGAGAGGTCGTA
AK109390	Os03g0860100	CCGCCTCTCAGCCCATCGATAT	GATGGAGTGGTGGCTTGGGCTT
AK241281	Os09g0572000	ATGATGCAGCCACCGTACACGT	GGCGGCAAGCTGCTATGGATAT
AK243188	Os04g0546800	CCTCATCCTCCTGCACCACCAC	GCCTCGCCTCTCTTCTCCGTT
AK109141	Os04g0547600	ATGGACTTCCACCACGGAGACG	GAAGGTGCTCGCGGATGAACCTC
AK241246	Os02g0655200	AGTTCTCGACGGCCTTCGCTTT	TACCCGTCACATGCATGCGCTA
AK064252	Os08g0537900	CAGCTCTGCATCGTCAGCGATC	TCTTGTGCCGACCACGATGATG
AK109226	Os02g0521100	GCGGCGCAGATCCTGGACTT	AGAGACCCCGACGAGCCGCT
AK288158	Os08g0360800	TCCGCACCATCTCAACTTTCCC	AGGGAGGAGCGGCTTGAGAGAA
AK287544	Os12g0603300	CCCGGGAAGGAGGTGGAGTACA	CTCGAACTCACGGCCGTCGTAC
GAPDH	Os04g0486600	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT	CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT

As curvas de eficiência de amplificação para cada par de “*primers*” dos genes estudados e para o gene constitutivo foram obtidas a partir de uma série de diluições do cDNA (1:1; 1:5; 1:25; 1:125). Também foram geradas curvas de dissociação para verificar a especificidade dos *primers*. Essas curvas padrão foram representadas através de um gráfico de regressão linear do valor Ct (*Threshold Cycle*) em comparação ao log das diluições de cDNA, apresentando um valor denominado de *slope*. O *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct. O Ct é o ponto onde a curva de amplificação que tem fase de crescimento com ângulo igual ou próximo a 45 graus entre as coordenadas x e y, ou seja ciclo da PCR vs. fluorescência dos amplicons, neste ponto a curva é cortada por uma linha (*Threshold*). Quando diferentes amostras fazem parte de uma placa em análise, o programa do computador estima um único *Threshold* e este serve para estimar o Ct para cada amostra. O valor Ct é utilizado tanto para cálculos da eficiência dos primers quanto para estimar as diferenças na quantidade de transcritos em diferentes amostras.

A eficiência de cada conjunto de *primers* para utilizar em reações de RT-PCR foi determinado através do cálculo utilizando a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ descrita por

Rasmussen (2001). O valor da eficiência deve ser próximo a 100% ($100\% \pm 10\%$) e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R^2 (coeficiente de determinação), também é gerado a partir da curva padrão e indica o quanto os valores C_t sobrepõem os pontos da reta obtida pelos valores log das diluições. Quanto mais parecidas estiverem as replicas sobre a reta melhor será a eficiência do primer. Para cada sequência analisada, o gene *GAPDH* foi utilizado como um controle endógeno para quantificar a abundância de cDNA.

Após o cálculo das eficiências de amplificação individuais dos genes alvo e endógeno foi construído um gráfico representativo da validação experimental (dados não apresentados). No eixo X foram colocados os valores de log da concentração das amostras e no eixo Y a diferença entre a média do C_t do gene de interesse e a média do C_t do controle endógeno ($\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ gene endógeno}$), normalizando a amplificação do gene alvo em função do gene endógeno. O valor da inclinação da curva deve ficar entre -0,1 e 0,1 (Applied Biosystems /suporte@appliedbiosystems.com).

A amplificação RT-PCR foi realizada em aparelho 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®), utilizando SYBR® Green (Applied Biosystems®) a partir de: 2,0 μ l de tampão 10x; 1,2 μ l de $MgCl_2$ 50 mM; 0,4 μ l de dNTPs 5 mM; 1,0 μ l de cada oligonucleotídeo (10 μ M); 0,05 μ l de Platinum Taq - DNA polimerase (5 U/ μ l); 2,0 μ l de SYBR green (1x); 0,4 μ l de ROX, 1,0 μ l de cDNA (diluída 1:25, selecionada com base nos resultados das análises de validação) e água para completar o volume final de 20 μ l. As condições para a reação de amplificação foram as seguintes: Desnaturação inicial (95°C, durante 10 minutos); 40 ciclos (Desnaturação 95°C, durante 1 minuto; Anelamento 60°C, durante 1 minuto; Extensão 72°C, durante 1 minuto) ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. E para finalizar, Extensão final (72°C, durante 5 minutos). O C_t foi obtido, e o nível de expressão relativa foi calculado com base na região exponencial da curva da reação de PCR (Applied Biosystems®). O C_t foi obtido durante o ciclo de reação e o $\Delta\Delta C_t$ foi calculado baseado na reação exponencial de PCR usando $REL = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.5 Identificação de elementos *cis* na região promotora de genes *ERFs*

A sequência correspondente à região promotora de cada membro da família *ERF* foi obtida no banco de dados *RAP-DB - The Rice Annotation Project* (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Neste estudo utilizaram-se sequências com 1000pb, recortadas antes da UTR 5'. A região promotora de cada gene foi submetida à análise para identificação de elementos *cis*.

A identificação destes elementos foi feita utilizando-se um programa desenvolvido por Maia et al. (The New PLACE, dados não publicados). Inicialmente o programa identificou os elementos *cis* conhecidos de acordo com o portal *PLACE - Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (HIGO et al., 1999). Posteriormente, para verificar se os elementos encontrados não estão presentes na região promotora ao acaso, uma análise estatística foi realizada, utilizando-se o teste Z. Para o cálculo do valor Z, foi calculada a diferença do número de ocorrências do motivo para cada região *upstream* dos genes (OP) pela média de ocorrência no genoma (OG) e dividida pelo desvio padrão (DP), $Z = (OP - OG) / DP$. Deste modo, o cálculo de probabilidade (p) para cada motivo foi realizado da seguinte forma, $p = 1 - z$ (tabelado, a 5% de probabilidade). Os elementos que apresentaram valor de p igual ou inferior a 5% foram considerados como ocorrência não aleatória (ROMBAUTS et al., 2003). De acordo com o número de ocorrências de elementos *cis*, os *ERFs* foram classificados em genes de regulação complexa (ocorrência de elementos *cis* acima da média geral de ocorrências mais um desvio padrão), genes de regulação simples (ocorrência de elementos *cis* abaixo da média geral de ocorrências menos um desvio padrão) e genes de regulação normal (os genes que ficaram entre estes limites). Além disso, verificaram-se os elementos *cis* de maior ocorrência entre os genes.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados quanto a normalidade (teste de Shapiro Wilk), a homocedasticidade (teste de Hartley) e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das

cultivares e dos tempos pelos intervalos de confiança a 95%. A presença de correlações entre as variáveis dependentes do estudo foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson ($p \leq 0,0001^*$) (SAS INSTITUTE, 2002).

A análise de componentes principais (ACP) foi extraída a partir de uma matriz de correlação (R). Dessa forma, a informação contida nas variáveis originais foi projetada em um número menor de variáveis subjacentes chamadas de Componentes Principais (CPs). O critério para descarte de variáveis (CPs) utilizado foi recomendado por Jolliffe (2002), esse critério estabelece que se deve reter um número de componentes principais que contemple pelo menos, entre 70 e 90% da variação total. Após a seleção do número de CPs, foram obtidos os seus respectivos autovalores, com seus correspondentes autovetores. O procedimento gráfico adotado foi o *biplot*, a partir dos escores (cargas) dos componentes principais selecionados (SAS INSTITUTE, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do experimento referente à validação dos oligonucleotídeos (*primers*) são apresentados na tab. 2. A qualidade da curva padrão foi aferida a partir do *slope* da equação de regressão, utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação, assim como do coeficiente de determinação (R^2) (DEPREZ et al., 2002).

Das 32 sequências avaliadas no experimento de validação, 17 apresentaram os valores de *slope* (entre 1,8 e 2,2) e coeficiente de determinação (superior a 95%) de acordo com o recomendado. Isto pode ser evidenciado entre as sequências AK241243, AK105991, AK071519, AK108830, AK067313, AK099221, AK102559, AK101054, AK073133, AK101949, AK069833, AK109360, AK104576, AK072749, AK109390, AK241246 e AK109226.

Tabela 2. Resultados do experimento de validação dos 32 *ERFs* analisados no experimento de validação, em relação ao padrão de referência *GAPDH*. CGF/FAEM/UFPel, 2012

Sequências	<i>Slope</i>	Eficiência	Eficiência %	R^2
AK241243	-3,255	2,0	103	0,98
AK068312	-2,801	2,3*	128	0,907**
AK105991	-2,864	2,2	123	0,98
AK243146	-0,769	20,0*	0	0,042**
AK071519	-3,42	2,0	96	0,966
AK062422	-1,359	5,4*	444	0,21**
AK108830	-3,579	1,9	90	0,959
AK067313	-3,463	1,9	94	0,967
AK099221	-3,523	1,9	92	0,951
AK102559	-3,271	2,0	102	0,954
AK108143	-1,286	6,0*	499	0,613**
AK101054	-2,917	2,2	120	0,971
AK073133	-3,108	2,1	110	0,991
AK101949	-2,858	2,2	124	0,987
AK109360	-3,115	2,1	109	0,952
AK288040	-0,228	24320,1*	2431908	0,228**
AK064027	-5,226	1,6*	55	0,964
AK069833	-3,424	2,0	96	0,973
AK104576	-3,273	2,0	102	0,981
AK072749	-3,717	1,9	86	0,964
AK067373	-5,657	1,5*	50	0,927**
AK242393	-2,611	2,4*	142	0,862**
AK241762	-1,37	5,4*	437	0,843**

AK109390	-3,433	2,0	96	0,963
AK241281	-3,591	1,9	90	0,893**
AK243188	-4,417	1,7	68	0,951
AK109141	-3,342	2,0	99	0,839**
AK241246	-2,869	2,2	122	0,974
AK064252	-2,686	2,4*	136	0,870
AK109226	-3,186	2,1	106	0,968
AK288158	-1,911	3,3*	234	0,807
AK287544	-1,694	3,9*	289	0,906

*genes com eficiência inferior e/ou superior ao recomendado; **genes com coeficiente de determinação inferior e/ou superior ao recomendado.

A partir destes resultados, foi possível identificar quais sequências apresentaram os valores mais ajustados, para que posteriormente fosse realizada a quantificação relativa.

4.1 Expressão gênica de *ERFs* por RT-PCR

A expressão relativa das 17 sequências de *ERFs* foram avaliadas em estresse por ferro em três cultivares. Uma pertencente à subespécie *japonica*, cultivar Nipponbare e duas pertencentes à subespécie *indica*, cultivares BR - IRGA 409 (sensível à toxidez por ferro) Epagri 108 (tolerante à toxidez por ferro). Observou-se que houve interação significativa entre os fatores estudados para todas as variáveis.

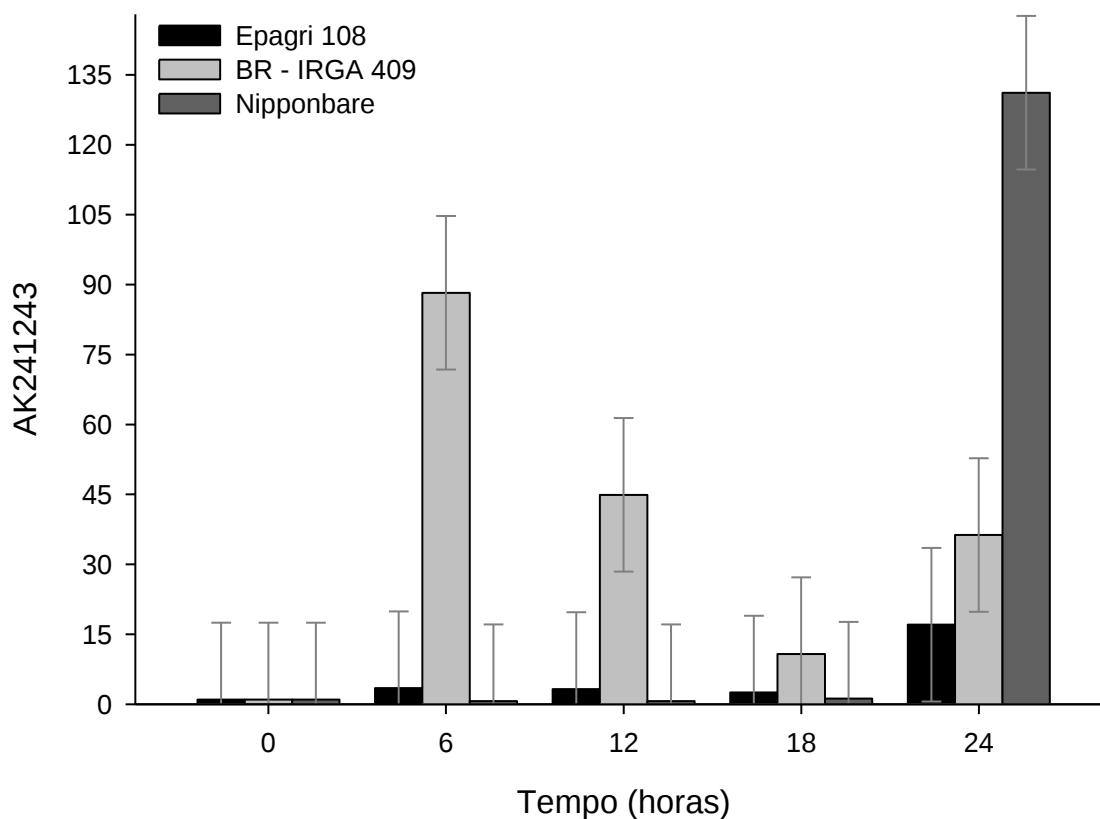


Figura 3 . Acúmulo de transcritos da sequência AK241243 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Analisando o perfil de expressão da sequência AK241243 na cultivar Epagri 108, não foram observadas variações significativas nos níveis de transcritos durante todos os tempos testados. Na cultivar BR-IRGA 409, foi verificada uma indução de aproximadamente 90 vezes, às 06 horas de estresse, seguida de uma repressão após 12 horas de estresse. Na cultivar Nipponbare, o AK241243 também manteve um baixo nível de transcritos nas primeiras horas estudadas, seguido de uma forte indução de aproximadamente 135 vezes, após 24 horas de estresse (Fig. 3).

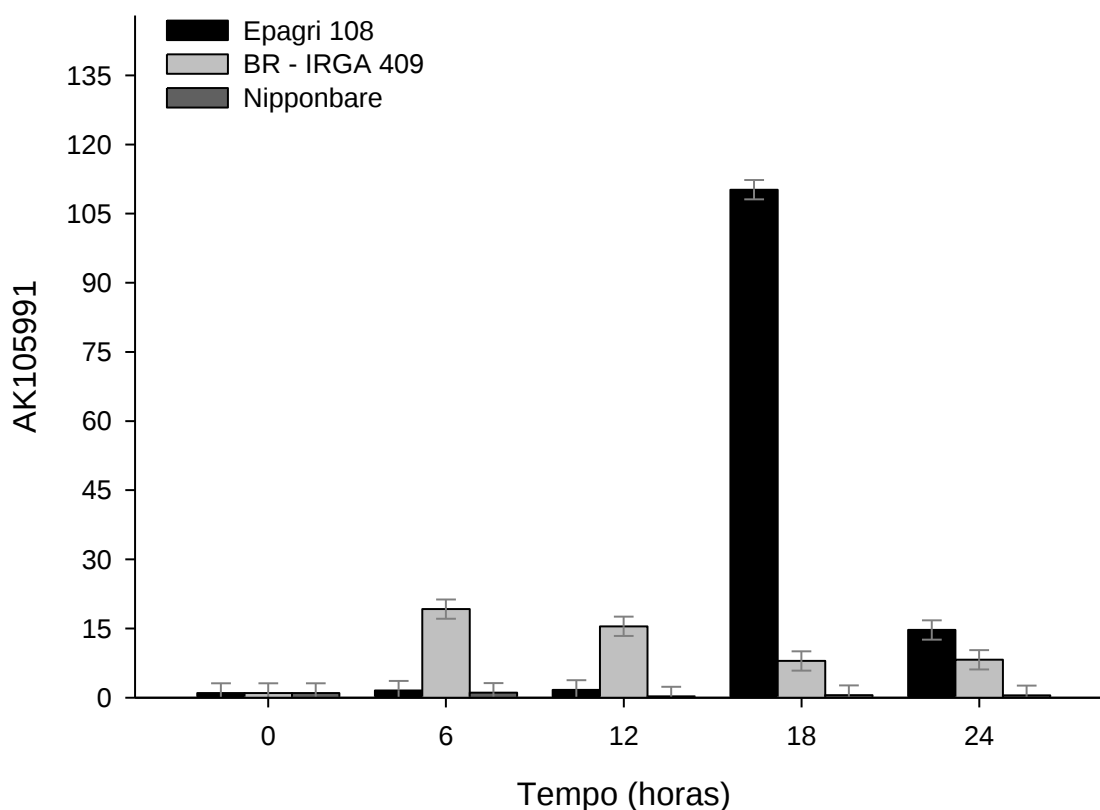


Figura 4. Acúmulo de transcritos da sequência AK105991 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Sob condições de excesso de ferro, o nível de transcritos da sequência AK105991 foi tardiamente induzido na cultivar tolerante, apresentando um aumento nos níveis de transcritos de aproximadamente 115 vezes, após 18 horas de estresse. Na cultivar BR - IRGA 409 o gene AK105991 apresentou uma indução precoce, seguido de um decréscimo da expressão, após 18 horas. Já para a cultivar Nipponbare, houve uma repressão do gene sob este estresse em todos tempos analisados (Fig.4).

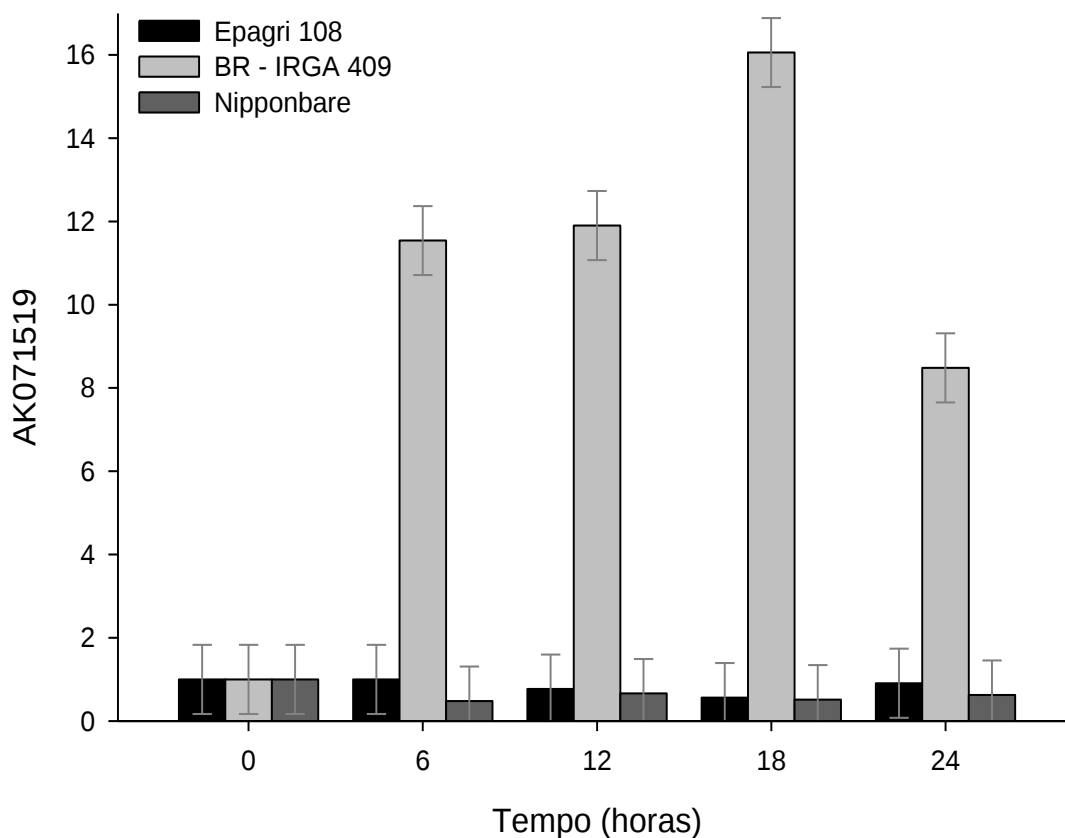


Figura 5. Acúmulo de transcritos da sequência AK071519 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Na cultivar BR - IRGA 409, da sequência AK071519 foi induzido nas primeiras horas de estresse, alcançando seu pico de expressão às 18 horas, com posterior redução no nível de transcritos às 24 horas. Nas cultivares Epagri 108 e Nipponbare este gene exibiu um comportamento semelhante, mantendo um baixo nível de expressão em todos tempos analisados (Fig.5).

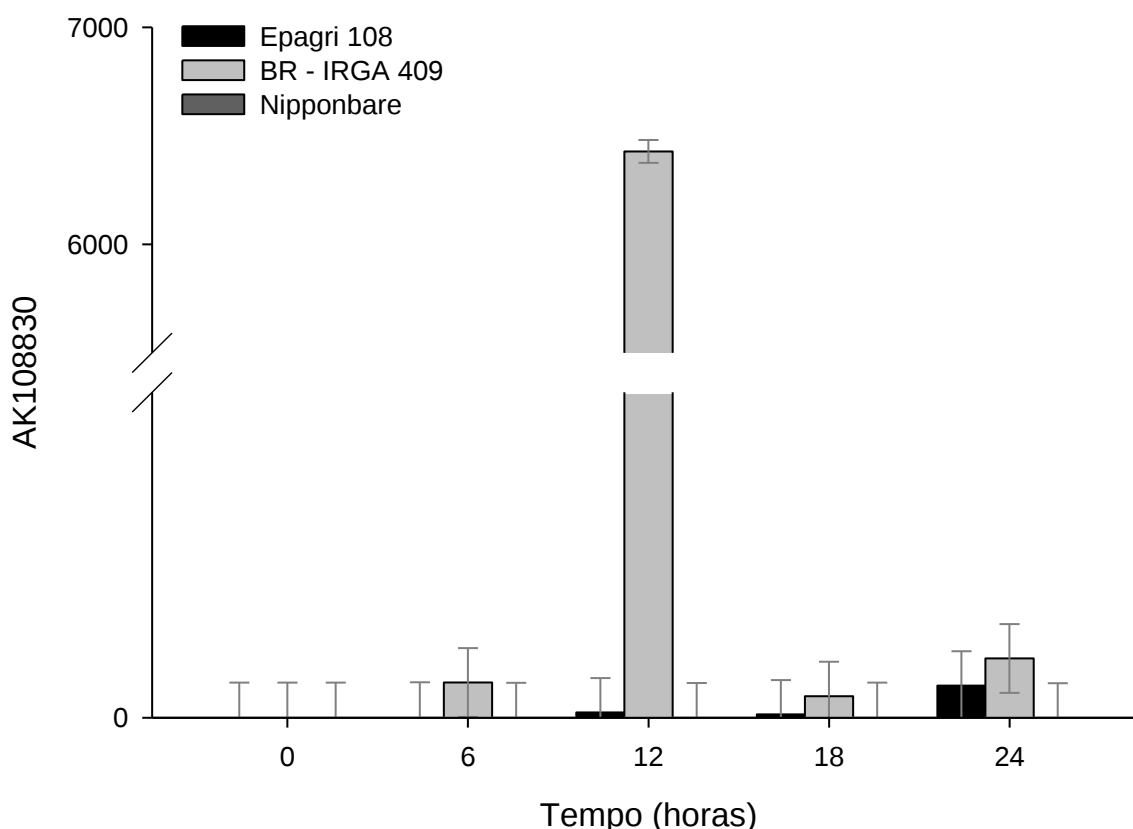


Figura 6. Acúmulo de transcritos da sequência AK108830 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

De forma interessante, a sequência AK108830 foi fortemente induzida somente na cultivar BR - IRGA 409, após 12 horas de estresse, apresentando um aumento nos níveis de transcritos de aproximadamente 7000 X, seguido de uma brusca repressão nos demais tempos analisados. É possível analisar ainda, que praticamente não houve aumento no nível de transcritos para o mesmo gene, nas cultivares Epagri 108 e Nipponbare. Esses resultados sugerem que este gene é necessário em grandes quantidades para compensar os efeitos do acúmulo de ferro, como resposta vigente das plantas sensíveis frente ao estresse, uma vez que a planta tolerante não apresentou indução dessa sequência. (Fig.6).

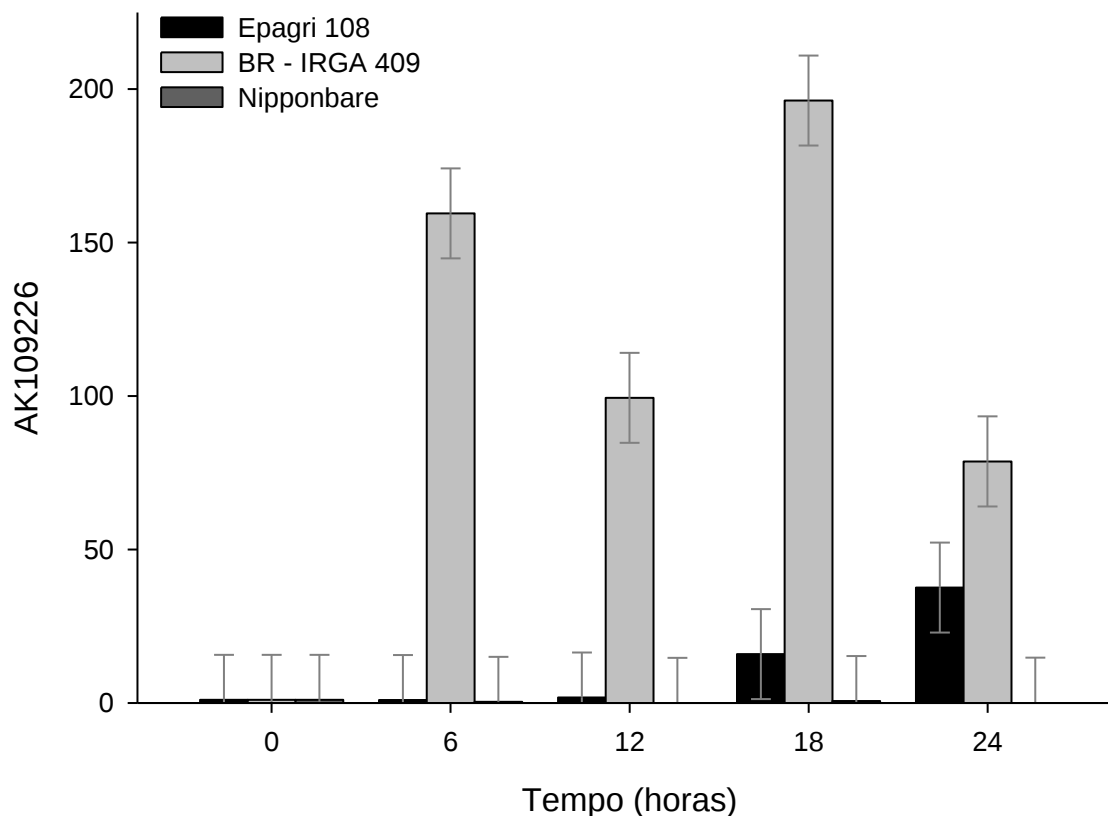


Figura 7. Acúmulo de transcritos da sequência AK109226 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

O AK109226, na cultivar Epagri 108, apresentou o comportamento de um gene mais diretamente dependente do etileno, uma vez que aumentou gradativamente seu nível de transcritos em estresse por ferro, uma condição que acompanha o aumento do nível deste hormônio (YAMAUCHI; PENG, 1995). Na cultivar BR - IRGA 409, o AK109226 foi fortemente induzido, com um aumento no nível de transcritos após 06 horas de estresse, seguido de uma leve e transiente redução às 12 horas, atingindo seu pico de expressão de aproximadamente 200 vezes às 18 horas de exposição à toxidez, com posterior redução no nível de transcritos às 24 horas, apresentando um

comportamento cíclico, o que sugere um controle modular da expressão de outros genes à jusante. Também foi observado que houve uma inibição deste gene na cultivar Nipponbare, em todos tempos analisados (Fig. 7).

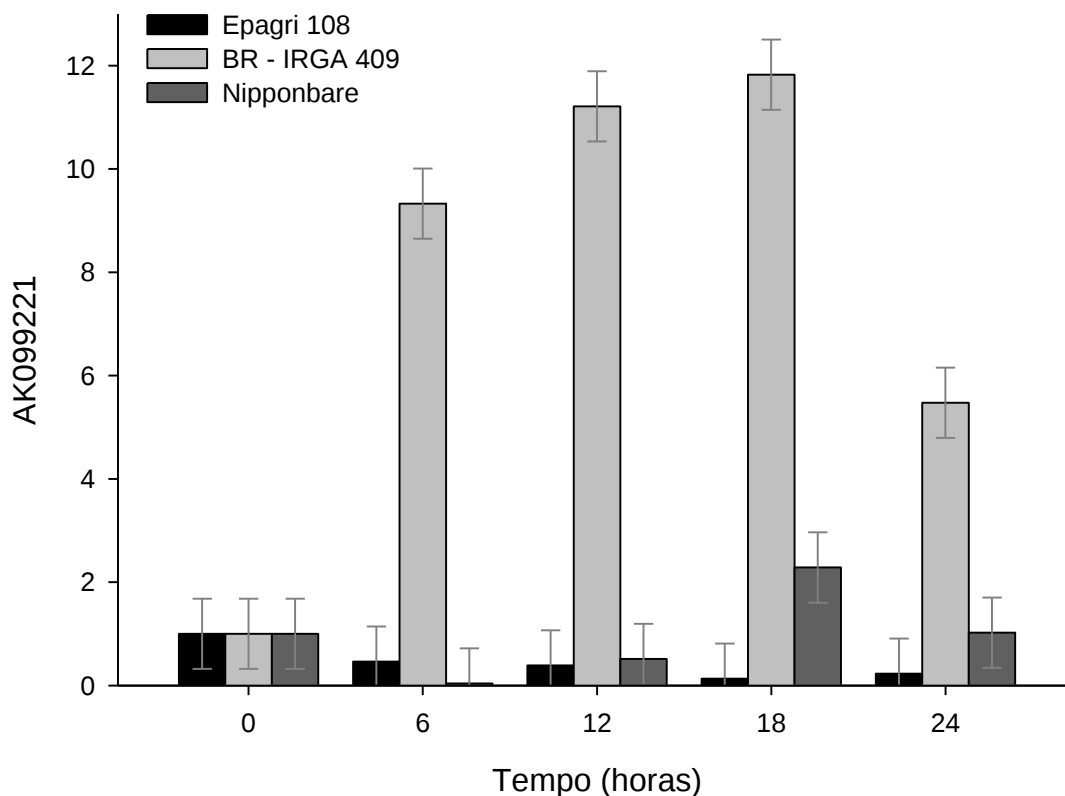


Figura 8. Acúmulo de transcritos da sequência AK099221 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Analisando o comportamento do AK099221, na cultivar Epagri 108, os níveis de transcritos permaneceram similares entre os tempos estudados. Foi possível observar que a cultivar BR - IRGA 409 apresentou um comportamento distinto das demais com um brusco aumento entre 0 e 06 horas, seguido de acréscimo gradual no nível de expressão entre 06 e 18 horas. Após 18 horas foi observada uma redução no nível de

transcritos. Esses resultados indicam que a cv. sensível, sob condições de estresse ativa a síntese de moléculas capazes de induzir alguns genes *ERFs*.

Na cultivar Nipponbare, os níveis de transcritos foram similares aos obtidos na cultivar Epagri 108 até às 12 horas, apresentando níveis bem superiores às 18 horas (Fig.8).

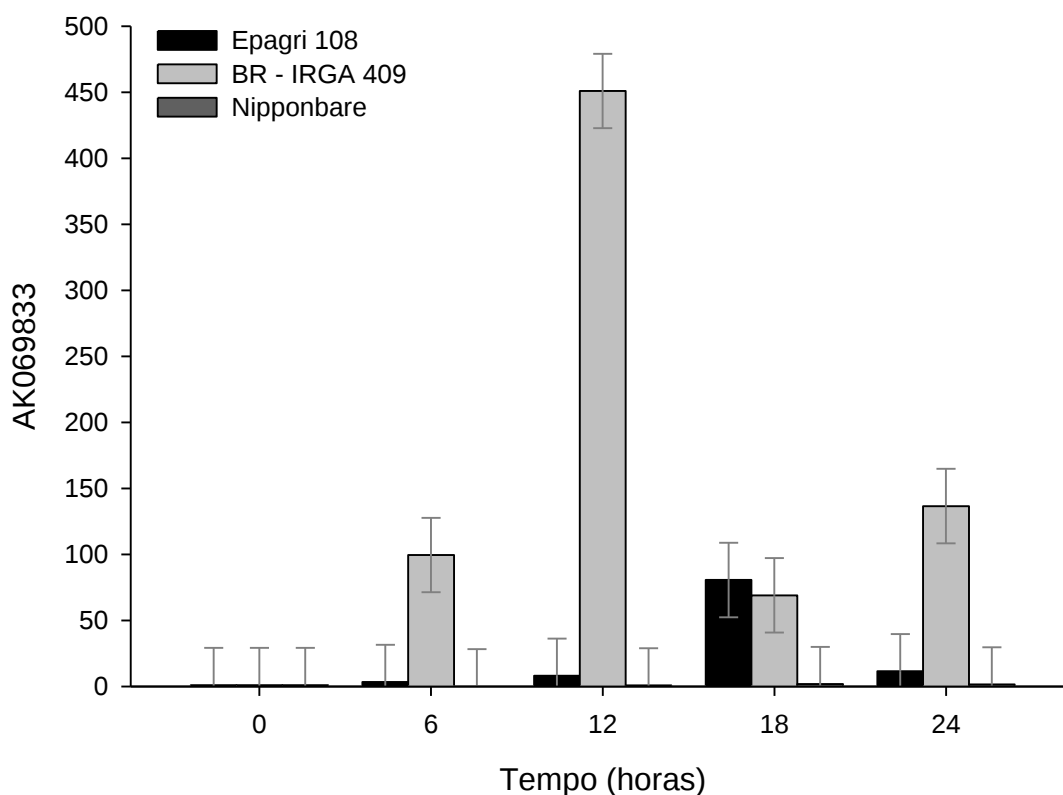


Figura 9. Acúmulo de transcritos da sequência AK069833 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso por Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Da mesma forma que na sequência AK108830 (Fig. 6), a sequência AK069833 foi fortemente induzida após 12 horas de estresse por ferro, na cultivar BR - IRGA 409, apresentando um aumento no nível de expressão próximo a 500 vezes, com uma posterior redução às 18 horas de estresse, seguido de um leve aumento no nível de transcritos após 24 horas. Esse comportamento reforça a hipótese citada anteriormente, de que sob condições de estresse, as plantas sensível sintetizam moléculas capazes

de sinalizar os genes *ERFs*. Na cultivar Epagri 108, houve uma indução às 18 horas de estresse, com posterior queda às 24 horas, enquanto que para a cultivar Nipponbare, não foram observadas variações nos níveis de transcrito para esta sequência (Fig. 9).

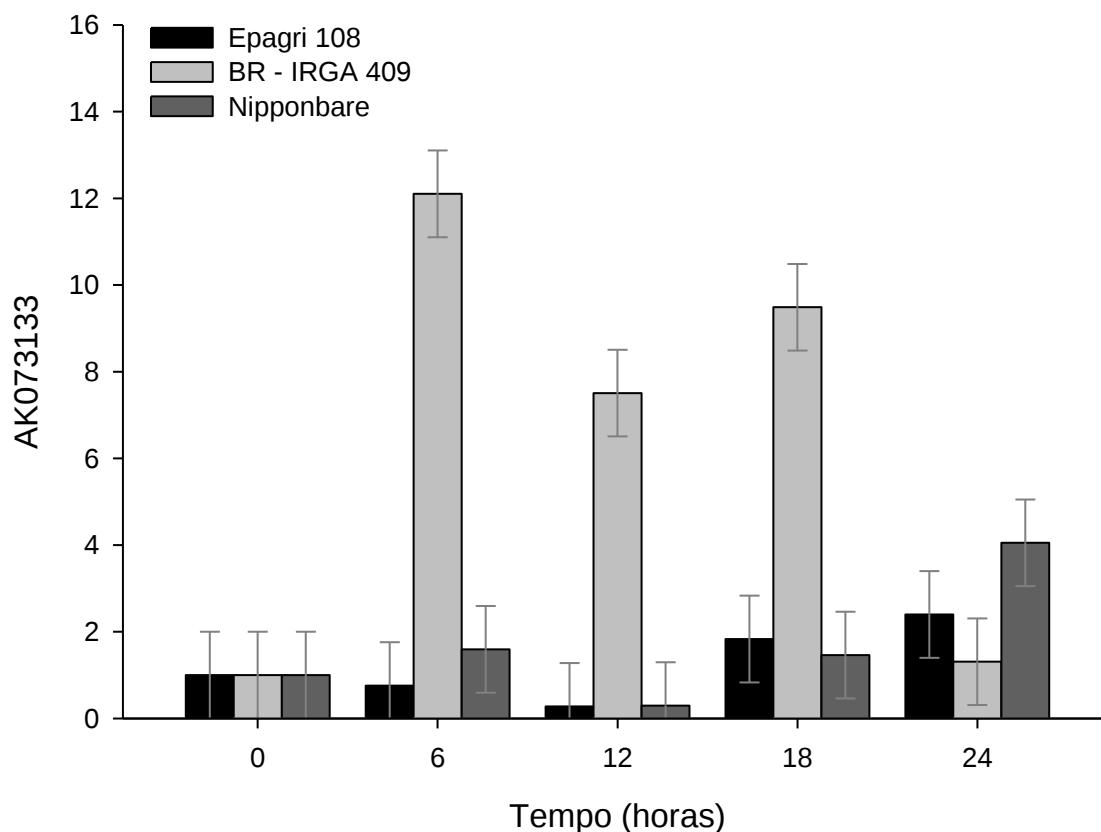


Figura 10. Acúmulo de transcritos da sequência AK073133 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

De uma maneira geral, os dados obtidos por RT-PCR para a sequência AK073133, demonstraram que houve uma manutenção no nível de transcritos para a cultivar Epagri 108 em todos tempos analisados. Comportamento semelhante pode ser observado para a cultivar Nipponbare, porém com aumento nos níveis de transcritos às 24 horas de estresse. A cultivar BR - IRGA 409, apresentou um drástico aumento (12 vezes) às 06 horas, permanecendo com altos níveis de expressão até às 18 horas. Ao

contrário dos outros dois genótipos, a BR - IRGA 409 apresentou redução do nível de transcritos às 24 horas de exposição ao ferro (Fig. 10).

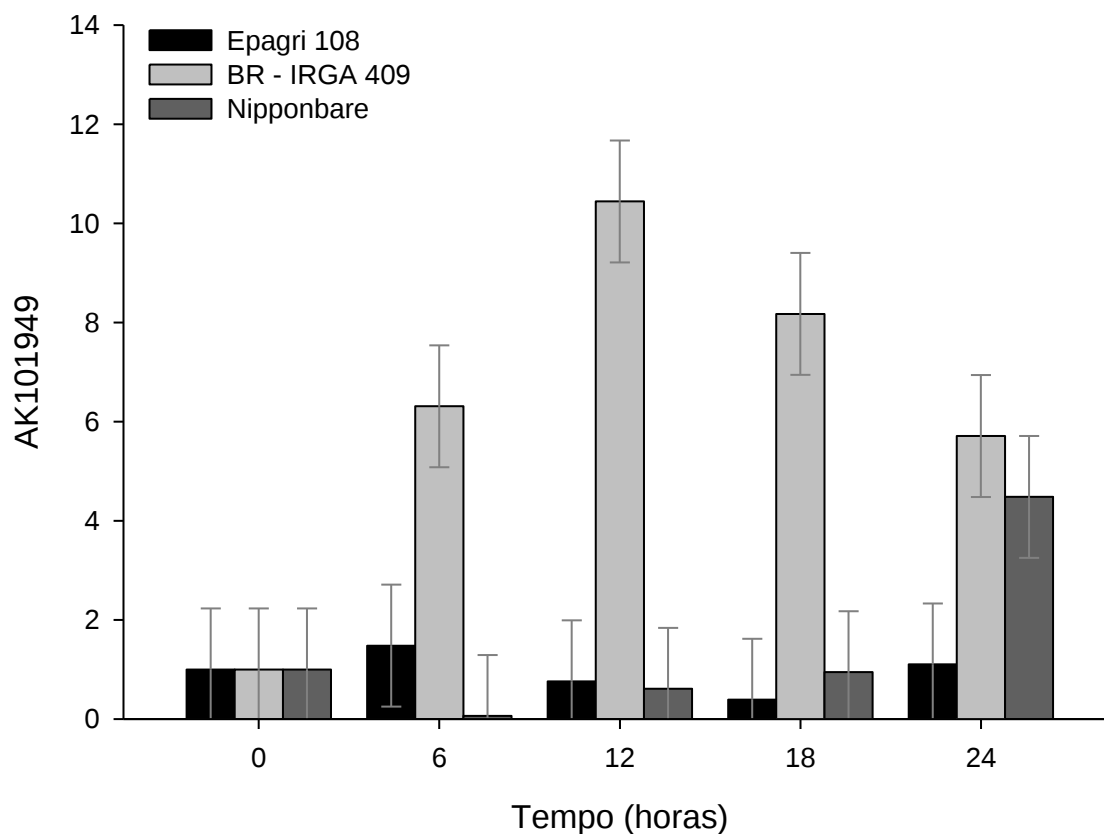


Figura 11. Acúmulo de transcritos da sequência AK101949 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Como em muitas sequências estudadas desta família de *ERFs*, a sequência AK101949, também exibiu um aumento no nível de transcritos na cultivar sensível ao estresse por ferro, BR - IRGA 409, apresentando um aumento no nível de expressão às 06 horas de estresse, mantendo-se em altos níveis de transcritos até às 24 horas.

Na cultivar Nipponbare os níveis de transcritos mantiveram-se baixos nas primeiras horas de estresse, porém apresentaram um aumento às 24 horas. Na cultivar

Epagri 108, não foi observado uma variação significativa nos níveis de transcritos em todos os tempos analisados (Fig. 11).

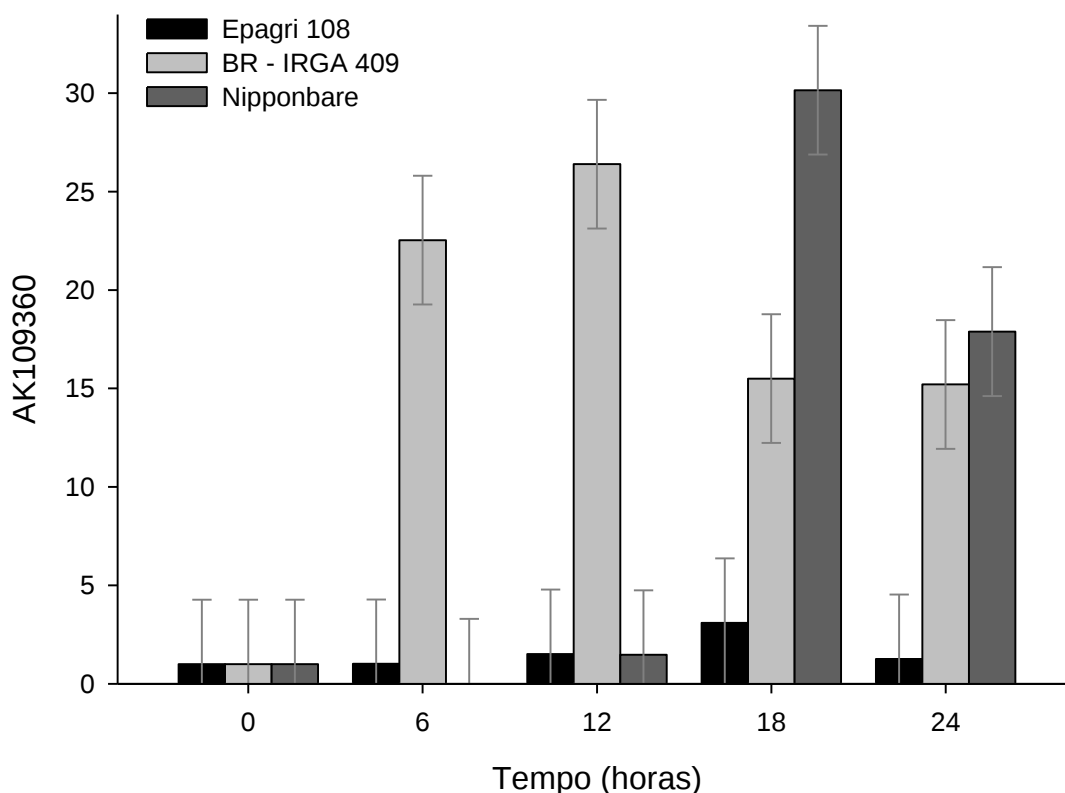


Figura 12. Acúmulo de transcritos da sequência AK109360 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de FeSO₄ 7H₂O) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Percebe-se um aumento no nível de transcritos para a sequência AK109360 nas cultivares BR - IRGA 409 e Nipponbare. A cultivar Epagri 108, apresentou um nível constante de expressão durante todos os períodos analisados. Na cultivar BR - IRGA 409, foi observado altos níveis de transcritos a partir das 06 horas de exposição ao estresse, com uma leve redução a partir das 18 horas. O pico de expressão do

AK109360, chegou a aproximadamente 25 vezes nesta cultivar, às 18 horas de estresse. Na cultivar Nipponbare, a sequência AK109360 foi tardiamente induzida, apresentando um comportamento diferente das demais cultivares, com aumento no nível de expressão de aproximadamente 30 vezes, às 18 horas de estresse, com posterior redução no nível de transcritos para 18X às 24 horas (Fig. 12).

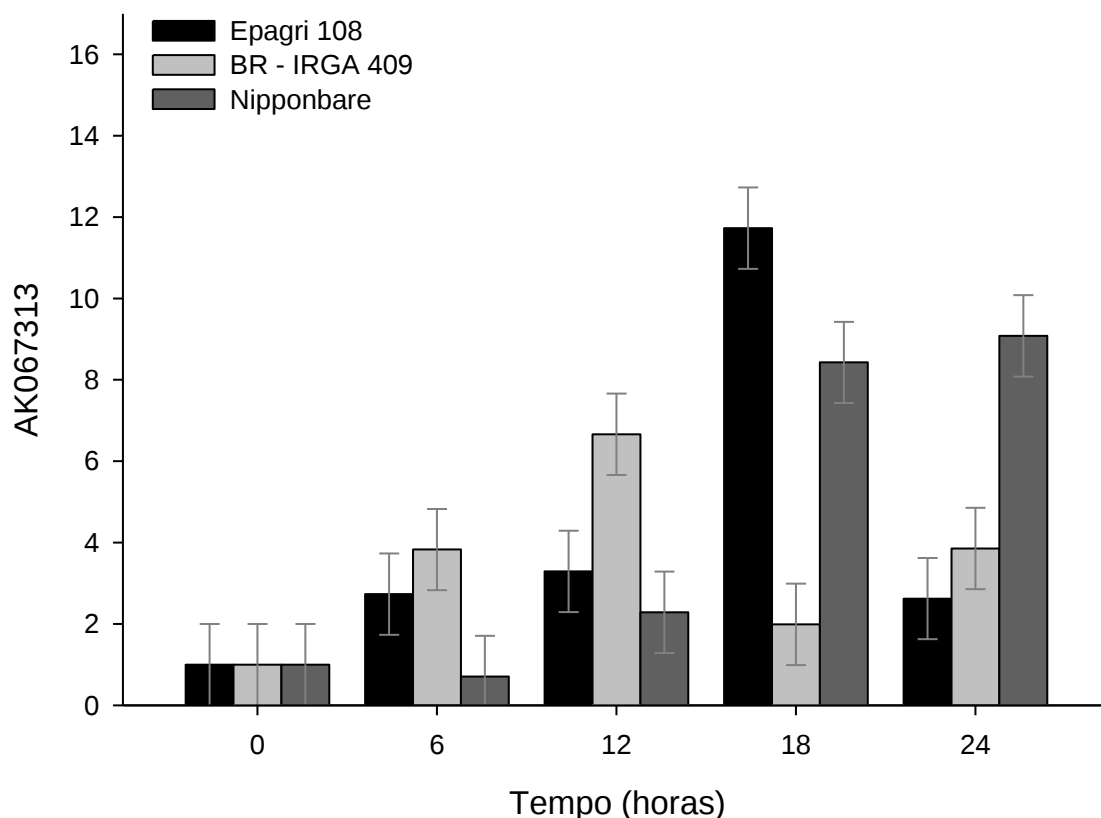


Figura 13. Acúmulo de transcritos da sequência AK1067313 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

O transcrito AK1067313 apresentou níveis levemente maiores às 12 horas de estresse, com um pico de expressão às 18 horas (12 X) na cultivar Epagri 108. Na cultivar Nipponbare, foi observado um aumento após às 18 horas (09 X), enquanto que

na cultivar BR - IRGA 409, os níveis de transcritos oscilaram entre níveis baixos (0 horas), médios (06, 12 e 18 horas) e altos (12 horas), alcançando um pico de aproximadamente 7 X (Fig. 13).

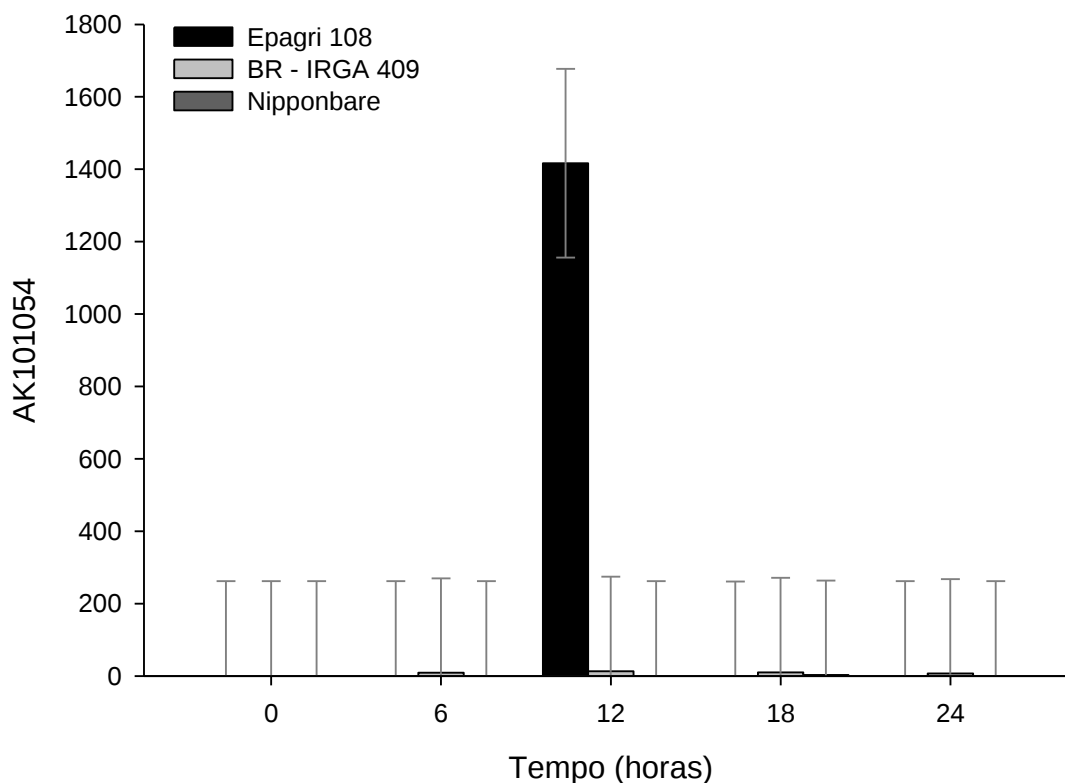


Figura 14. Acúmulo de transcritos do gene AK101054 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Nas cultivares BR - IRGA 409 e Nipponbare, não foram observados variações significativas entre genótipos e entre tempos de exposição ao estresse para os transcritos de AK1101054. Entretanto, os níveis de transcritos desse gene para cultivar Epagri 108 foram surpreendentemente altos (1.500 X), sendo induzido somente às 12 horas de estresse.

Comportamento semelhante foi observado na cultivar sensível, BR - IRGA 409 para o AK108830 (Fig. 6), sugerindo que estes transcritos sejam parte importante das estratégias de respostas ao ferro nos genótipos sensíveis analisados (Fig. 14).

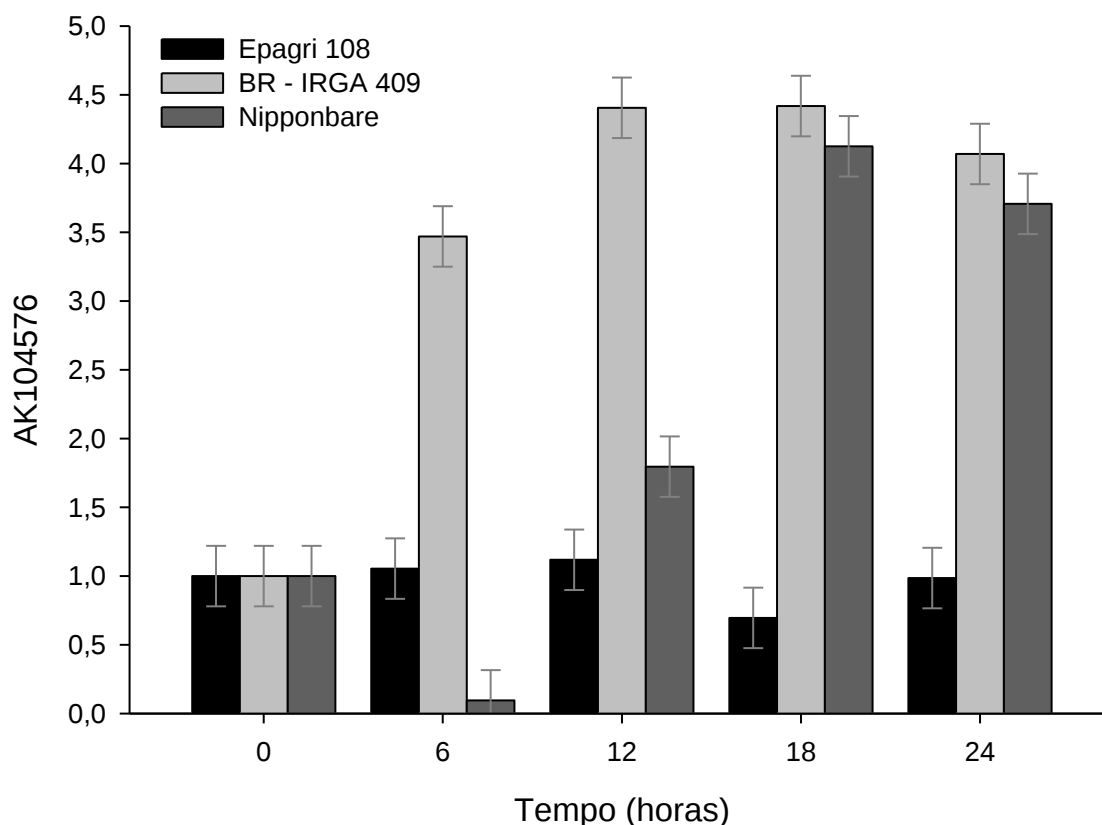


Figura 15. Acúmulo de transcritos da sequência AK104576 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

É possível observar uma manutenção dos níveis de expressão da sequência AK104576 em todos tempos analisados para a cultivar Epagri 108. Na cultivar BR - IRGA 409 houve uma forte indução de expressão às 06 horas. Entre 12 e 24 horas o nível de transcritos manteve-se alto, evidenciando mais uma vez que as plantas sensíveis sob condições de estresse por Fe ativam mecanismos capazes de induzir genes da família ERF.

Foi possível observar uma inibição transcricional às 06 horas de estresse, na cultivar Nipponbare. Com posterior aumento gradual até às 18 horas, o qual manteve-se até as 24 horas (Fig. 15).

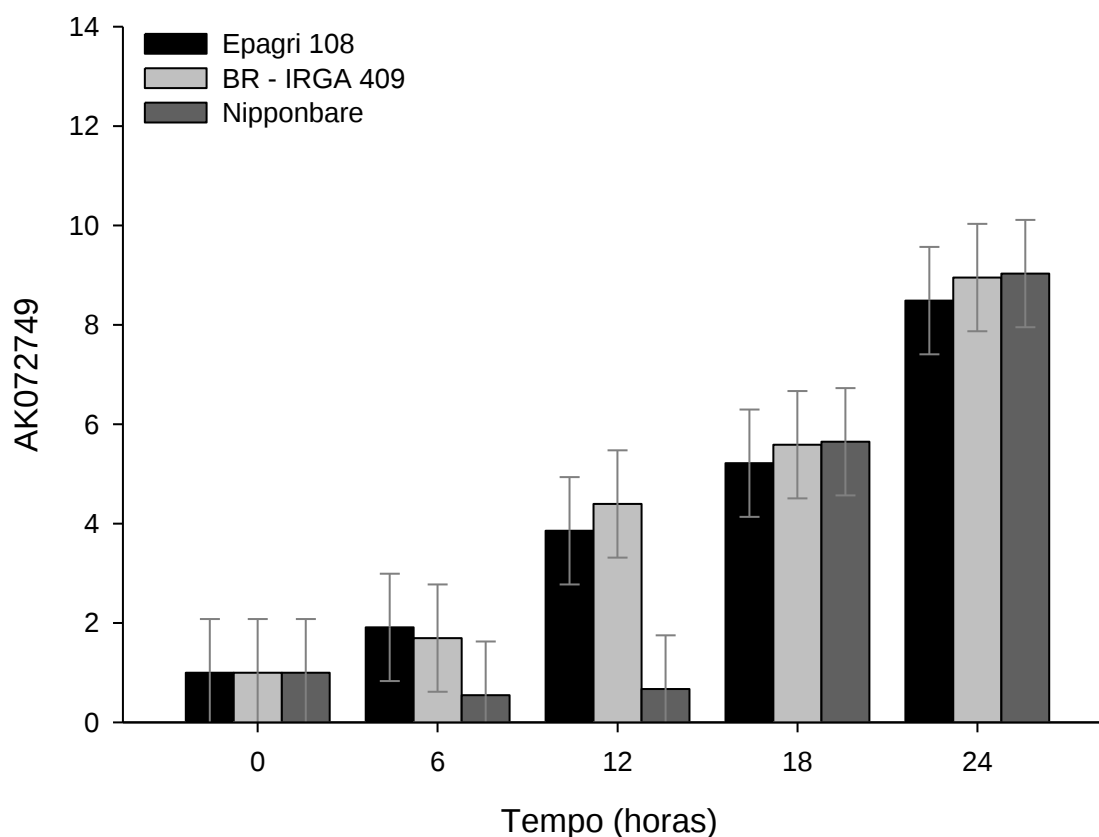


Figura 16. Acúmulo de transcritos da sequência AK072749 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Dentre as sequências estudadas desta família de *ERFs*, sob condições de excesso de ferro, a sequência AK072749, foi a única que apresentou um comportamento semelhante em todas cultivares, com exceção do menor nível de transcritos no genótipo Nipponbare as 12h. É possível observar que houve um aumento

no nível de transcritos ao longo dos tempos estudados nas três cultivares. Este comportamento observado, provavelmente não está associado a mecanismos de tolerância, visto que nas três cultivares o AK072749 apresentou o mesmo desempenho (Fig. 16).

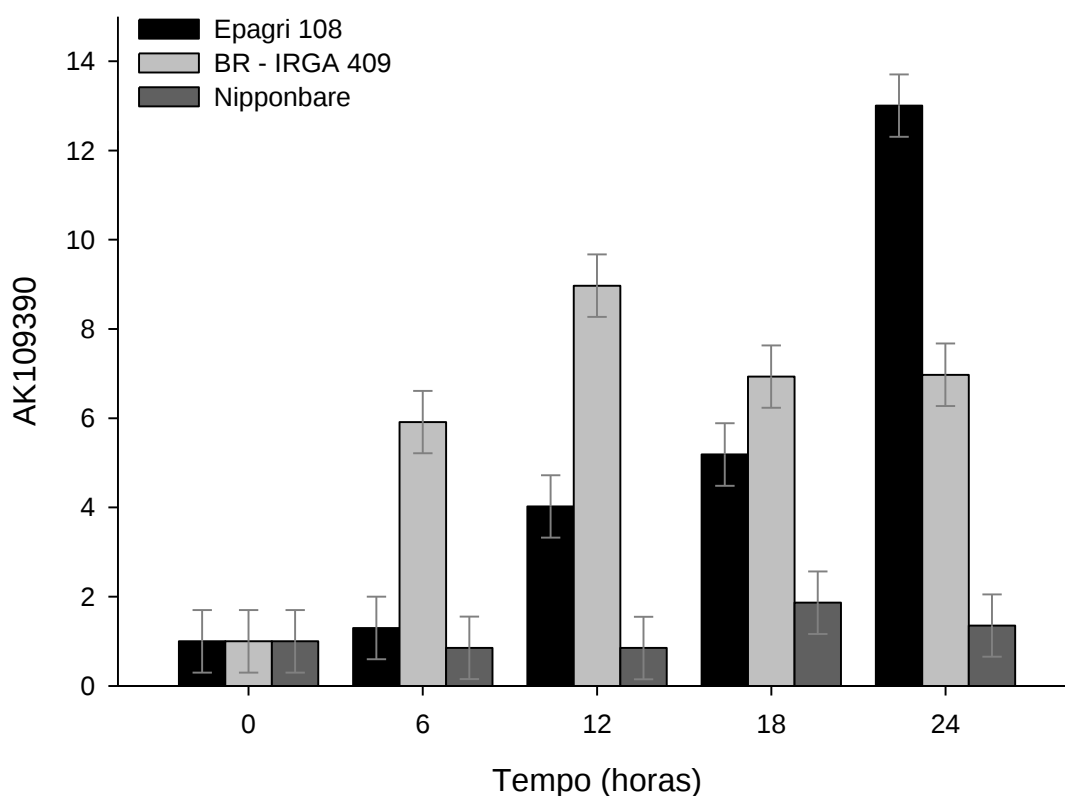


Figura 17. Acúmulo de transcritos da sequência AK109390 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Na cultivar BR - IRGA 409 o AK109390 exibiu um aumento progressivo dos níveis de transcritos até às 12 horas de exposição ao excesso de ferro. Às 18 horas houve uma leve repressão que se manteve até às 24 horas. Na cultivar Epagri 108 houve um aumento transcricional gradativo ao longo de todos os tempos analisados, alcançando um pico no nível de expressão (13 X), às 24 horas (Fig. 17).

A cultivar Nipponbare, manteve um baixo nível de transcritos em todos os tempos.

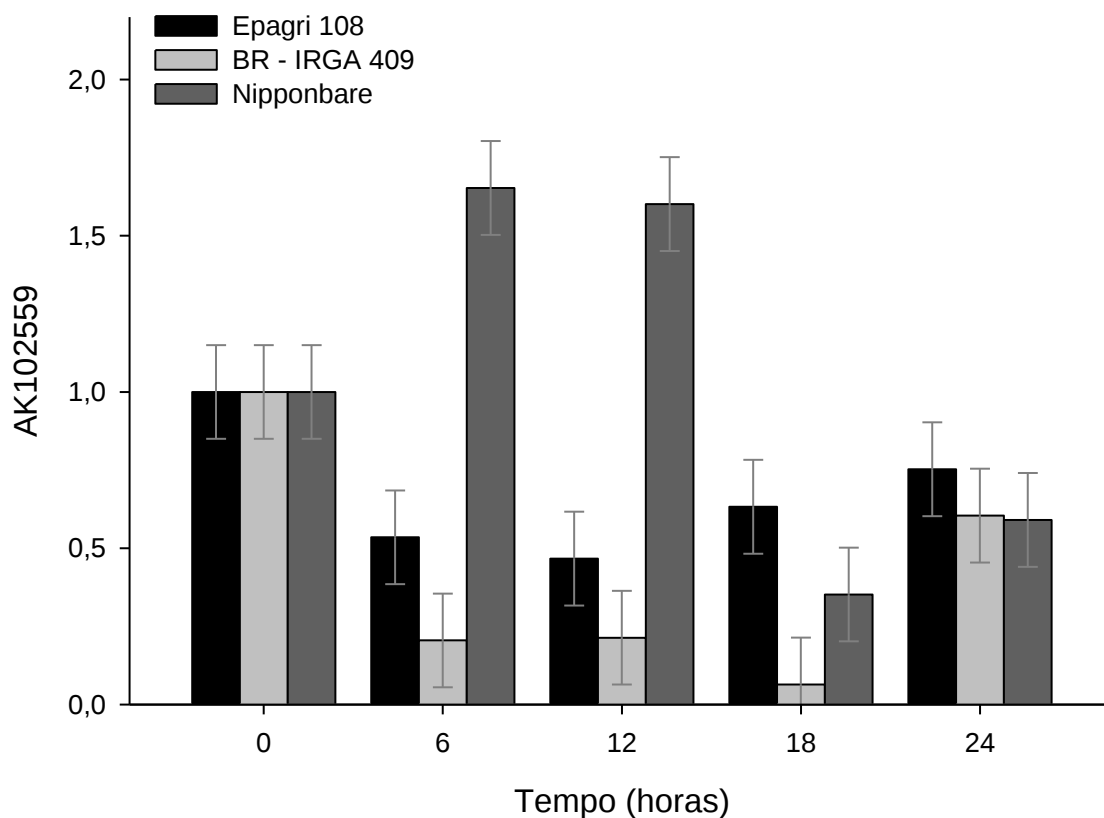


Figura 18. Acúmulo de transcritos da sequência AK102559 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Analisando o perfil de expressão do AK102559 é possível observar que esta sequência foi negativamente regulada nas cultivares Epagri 108 e BR-IRGA 409, as quais mantiveram baixos níveis de transcritos nos posteriores tempos analisados.

Comportamento diferente foi observado na cultivar Nipponbare, a qual apresentou uma forte indução nos níveis de transcritos às 06 horas que se manteve até às 12 horas. Após este período houve intensa redução no nível de expressão. Este aumento nos níveis de transcritos nas primeiras 06 horas, observadas somente na

cultivar Nipponbare, pode ser uma diferença nos mecanismos de estratégia que a planta deste genótipo apresentou, frente a exposição de excesso de ferro (Fig. 18).

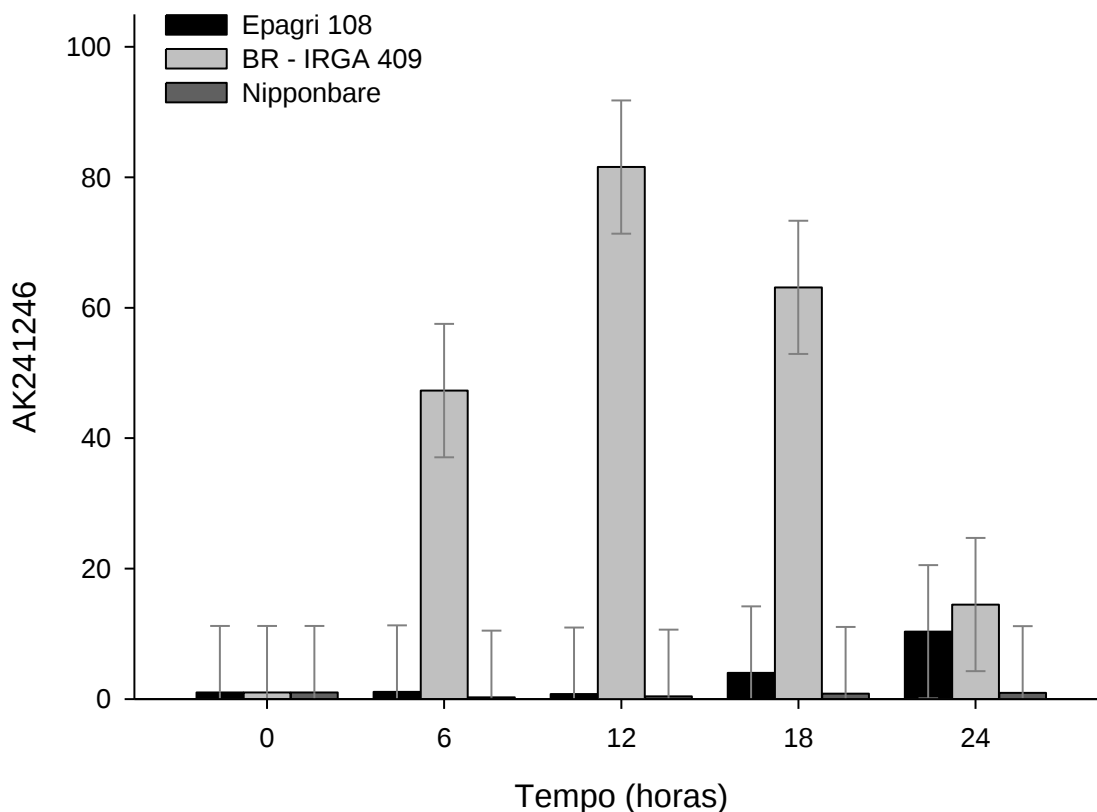


Figura 19. Acúmulo de transcritos da sequência AK241246 nas cultivares Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare, sob condições de excesso de Fe (7,2mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em diferentes tempos. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Observa-se que a sequência AK241246 apresentou um baixo nível de transcritos nas cultivares Epagri 108 e Nipponbare. Contrariamente, na cultivar BR - IRGA 409, esta sequência mostrou um aumento gradual somente nas primeiras horas sob excesso de ferro, apresentando um pico de expressão às 12 horas de aproximadamente 80 vezes, que manteve-se até às 18 horas. Após este período houve redução nos níveis de transcritos, indicando que esse gene age como um mecanismo precoce de resposta a estresse, e pode estar associado com a sinalização para a tolerância da planta ao estresse (Fig. 19).

Ao analisar o perfil de expressão das 17 sequências *ERFs* em arroz, pode-se verificar que a maioria responde ao estresse por excesso de ferro. Nesta condição, verificou-se a indução de praticamente todos os locos, porém com diferenças nos níveis de transcritos, entre as cultivares. Sabe-se que em condições de excesso de ferro há produção de etileno (YAMAUCH; PENG,1995), desta forma a indução das sequências *ERFs* observada neste estudo, pode ter se dado devido ao aumento deste hormônio.

Observou-se que grande parte das sequências analisadas (AK071519, AK108830, AK109226, AK099221, AK069833, AK073133, AK101949, AK104576 e AK241246) foram mais expressas na cultivar BR - IRGA 409. Isto pode ser explicado pelo fato desta cultivar ser sensível ao excesso de ferro, podendo ter sintetizado etileno em maiores quantidades, o que provavelmente induziu estas sequências em resposta ao estresse, porém parece que estes *ERFs* estão envolvidos em um mecanismo de resposta ineficiente, uma vez que a planta manteve-se sensível ao estresse.

Para a cultivar Epagri 108, observou-se um maior aumento nos níveis de transcritos para as sequências AK105991, AK1067313, AK101054 e AK109390. A indução destes *ERFs* pode estar potencialmente associada à expressão da tolerância nesta cultivar.

A sequência AK072749 foi à única que apresentou um comportamento similar em todas cultivares. O aumento gradativo nos níveis de transcritos exibido por este *ERF*, são característicos de um gene dependente de etileno. Comportamento semelhante foi observado para a sequência AK101949 na cultivar Nipponbare, sugerindo que estes *ERFs* podem ser estimulados pela produção deste hormônio, no entanto, não parece estar associados com os mecanismos de tolerância, uma vez que foram induzidas nas três cultivares.

Interessantemente os genes AK108830 e AK101054 apresentaram uma forte indução somente às 12 horas, nas cultivares BR - IRGA 409 e Epagri 108 respectivamente. O comportamento específico destes dois *ERFs* sugere que ambos apresentam um papel supostamente importante nessas cultivares.

Estudos sugerem que o etileno atua em uma rota de sinalização complexa, composta por cascatas de fosforilação, redes de regulação transcricional e mudanças em *mRNAs* e proteínas. A interação do etileno com outras moléculas sinalizadoras vai

determinar quais sequências responsivas ao etileno serão ativadas em determinada célula e em determinado período, resultando em uma diversidade de respostas (STEPANOVA; ALONSO, 2009), como observadas nestas sequências.

Os genes *ERFs*, além de serem regulados por etileno, respondem também a outras moléculas como ácido salicílico, ácido jasmônico, ácido giberélico e à interação entre esses hormônios (SAKUMA et al., 2002). Desta forma a regulação diferencial entre essas sequências, sob condições de estresse por toxidez por ferro, observada nesse estudo, pode também ser explicada pela afinidade de um dado *ERF* a determinado hormônio, levando a uma sinalização cruzada, responsável pela indução e repressão de diferentes membros desta família.

Outros compostos como ácido abscísico e estresse oxidativo, também podem influenciar na regulação dos *ERFs*, porém não se sabe ainda de que forma cada composto afeta a expressão de um membro específico desta família (FUKAO; YEUNG; BAILEY-SERRES, 2011).

O estresse por toxidez por ferro não apresentou efeito na regulação dos *ERFs* AK105991, AK109226, AK069883, AK101054, analisados na cultivar Nipponbare. Sabe-se que existem outros possíveis sinalizadores para indução de *ERFs*, como as ROS (WU et al., 2008) formadas sob condições de toxidez por ferro (QUINET et al., 2012), mas estas moléculas também parece, não ter apresentado efeito na regulação destes *ERFs*. Assim, sugere-se que estes *ERFs* não estão envolvidos no processo de defesa da planta frente este estresse.

Além disso, trabalhos têm demonstrado que mesmo dentro de uma família gênica, diferentes *ERFs* são afetados pelo excesso de ferro, dependendo da duração de exposição ao metal (QUINET et al., 2012). Isto explica a variação no acúmulo de transcritos encontrada, mesmo quando comparados em uma mesma cultivar. Indicando a presença de uma regulação específica para cada membro da família de *ERF*.

A repressão de dois *ERFs* (AK065979 e AK110871) e a indução de um (AK101501) foi observado sob condições de toxidez por ferro (QUINET et al., 2012). Através de análise por microarranjo quatro sequência *ERFs* (AK243188, AK105725/ AK068312, AK241281 e AK109390), foram superexpressas em condições de toxidez por ferro (FINATTO, 2012). Esses trabalhos dão suporte à hipótese que membros da

mesma família são regulados diferentemente pelo mesmo estresse. Comportamento semelhante foi encontrado neste estudo para o *ERF* AK109390, o qual também apresentou aumento em seus níveis de transcritos.

Apesar de nos últimos anos ter crescido o número de pesquisas relacionadas ao metabolismo e homeostase do ferro, bem como estudos de expressão de genes relacionados às respostas das plantas em condições de estresse por este metal, grande parte destes trabalhos tem sido apenas investigadas sob deficiência de ferro. Desta forma, estudos associados aos aspectos moleculares em resposta ao excesso de ferro, permanecem em grande parte desconhecido.

Estudos anteriores (WANG; GARVIN; KOCHIAN, 2002), verificaram uma rápida indução do gene *ERF*₃ em raiz de tomate, após 3 horas sob deficiência de ferro, potássio e fósforo, sugerindo que este gene pode desempenhar um papel importante em vias de transdução de sinal, vinculando mudanças no status do mineral com alterações na expressão do gene facilitando a homeostase do ferro.

Analizando o envolvimento dos hormônios auxina e etileno no desenvolvimento de células epidérmicas de raízes de *Arabidopsis*, os autores verificaram um aumento nos níveis de etileno em resposta a deficiência de ferro, sugerindo que algumas respostas adaptativas são induzidas por etileno ou pela interação de auxina/etileno. (SCHIMIDT; SCHIKORA, 2001).

Objetivando determinar a relação entre a produção de etileno e o desenvolvimento dos sintomas de bronzeamento no arroz, trabalhos demonstraram que a síntese de etileno poderia ser estimulada até cerca de 20 vezes mais em plântulas estressadas com Fe^{2+} , alcançando um pico na produção após 24 horas de incubação (PENG; YAMAUCHI, 1993). Um cenário semelhante, com aumento nos níveis de transcritos para estas sequências dependentes de etileno, pode ser observada para os *ERFs* AK241243, na cultivar Nipponbare, AK109390, na cultivar Epagri 108 e AK072749 nas três cultivares. Quando estas plântulas foram tratadas com inibidores de etileno, observou-se um atraso na produção deste hormônio em resposta ao estresse por Fe^{2+} , porém os sintomas de bronzeamento não foram suavizados, excluindo desta forma, a possibilidade de que o etileno esteja envolvido no desenvolvimento deste sintoma.

O aumento da síntese de etileno em condições de excesso de ferro, como foi mencionado, provavelmente faz parte de um processo de aclimação que as plantas desenvolveram para lidar com a condição de estresse. Esta suposição é baseada no fato que o etileno pode estimular a formação de aerênquimas nos tecidos das plantas, auxiliando na transferência passiva do O_2 das folhas para as raízes, o qual subsequentemente se dissipa na rizosfera, a fim de aumentar o poder de exclusão de ferro (PENG; YAMAUCHI, 1993).

Um trabalho comparando dias e semanas de exposição ao excesso de ferro verificou a expressão precoce de genes envolvidos na regulação hormonal. A expressão ocorreu quase que exclusivamente nos primeiros dias de tratamento e em sua maioria, referiam-se a genes codificadores de proteínas associados com a percepção de sinais, resposta de hormônios e fatores de transcrição, como os *ERFs* (QUINET et al., 2012).

As respostas das plantas a estresses é algo complexo, que além de envolver distintos hormônios, compreende também diferentes genes e fatores de transcrição (SINGH; FOLEY; OÑATE-SÁNCHEZ, 2002; AARTS; FIER, 2003). Considerando esta complexidade é difícil afirmar que os *ERFs* analisados neste estudo sejam primariamente regulados pelo excesso de ferro. Desta maneira, de acordo com Santos (2012), são necessários maiores estudos relacionados à forma de regulação destas sequências, o qual contribuirá imensamente para obtenção de transgênicos com transcrição controlada, de acordo com determinadas condições ambientais estressoras.

4.2 Análise de Correlação entre os *ERFs*

Através da análise de correlação apresentada na tab. 3, as variáveis AK071519 e AK099221 foram as que evidenciaram o maior coeficiente de correlação positiva ($r = 0,98^*$). Representando que quando ocorre um aumento de expressão do AK071519, igualmente é verificado um aumento na expressão do AK099221. Nesse contexto, outras correlações positivas também foram relevantes entre o gene AK071519 com AK073133 ($r = 0,81^*$); AK101949 ($r = 0,86^*$); AK104576 ($r = 0,68^*$); AK241246 ($r = 0,78^*$); AK109226 ($r = 0,96^*$). Da mesma forma, entre o gene AK101949 com AK069833

($r = 0,68^*$); AK104576 ($r = 0,80^*$); AK241246 ($r = 0,80^*$); AK109226 ($r = 0,77^*$). Também, ocorreu correlação positiva entre AK241243 e AK073133 ($r = 0,74^*$); AK108830 e AK069833 ($r = 0,87^*$); AK109360 e AK104576 ($r = 0,89^*$); AK069833 e AK241246 ($r = 0,91^*$); AK241246 e AK109226 ($r = 0,77^*$);

Outras correlações positivas que podem ser evidenciadas foram as do AK073133 com AK101949 ($r = 0,88^*$) e AK109226 ($r = 0,82^*$); AK099221 com AK073133 ($r = 0,89^*$); AK101949 ($r = 0,91^*$); AK069833 ($r = 0,77^*$); AK104576 ($r = 0,78^*$); AK241246 ($r = 0,90^*$) e AK109226 ($r = 0,91^*$). É importante evidenciar que todas estas correlações positivas ocorreram entre as sequências, as quais apresentaram maiores níveis de expressão na cultivar sensível a toxidez, BR - IRGA 409.

Entretanto, a correlação entre as sequências AK099221 com AK102559 ($r = -0,72^*$), AK067313 com AK102559 ($r = -0,57$; $p = 0,002$); AK102559 com AK073133 ($r = -0,62$; $p = 0,0004$) e AK101949 ($r = -0,62$; $p = 0,0004$) foram negativas indicando que o incremento na expressão de um dos genes analisados acarreta em decréscimo na expressão do outro gene.

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis respostas, considerando três genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao excesso de Fe^{2+} (0; 6; 12; 18 e 24h), através da análise de RT-PCR. CGF/FAEM/UFPel, 2012

Sequência	AK2412 43 (1)	AK1059 91 (2)	AK0715 19 (3)	AK1088 30 (4)	AK0673 13 (5)	AK0992 21 (6)	AK1025 59 (7)	AK1010 54 (8)	AK0731 33 (9)	AK1019 49 (10)	AK1093 60 (11)	AK0698 33 (12)	AK1045 76 (13)	AK0727 49 (14)	AK1093 90 (15)	AK2412 46 (16)	AK1092 26 (17)
(1)	1,000	0,033*	0,261	0,224	0,241	0,263	-0,490	-0,076	0,743	0,3520	0,5781	0,1995	0,4459	0,6604	0,0914	0,3267	0,2612
(2)		1,000	0,092	0,098	0,609	0,106	-0,221	-0,061	0,162	0,1054	0,0259	0,2061	-0,105	0,1614	0,3465	0,0402	0,0718
(3)			1,000	0,647	0,0003	0,582	0,239	0,728	0,4095	0,5933	0,8979	0,3024	0,5585	0,4028	0,0766	0,8358	0,7058
(4)				1,000	0,077	0,426	<,0001	0,0012	0,591	<,0001	<,0001	0,0027	0,0019	<,0001	0,4259	0,0108	<,0001
(5)					1,000	0,2753	0,6226	-0,332	-0,056	0,4598	0,6637	0,4308	0,8692	0,4612	0,1245	0,4690	0,6968
(6)						1,000	0,1562	0,0005	0,0836	0,7654	0,0181	0,0003	0,0316	<,0001	0,0135	0,5619	0,0180
(7)							1,000	0,1760	-0,568	-0,043	0,1819	0,2632	0,5515	0,3544	0,2558	0,5652	0,3668
(8)								0,3522	0,0025	0,8217	0,3948	0,2036	0,0035	0,0970	0,1805	0,0049	0,0713
(9)								1,000	-0,724	-0,108	0,890	0,9116	0,6190	0,7749	0,7849	0,1077	0,4496
(10)									<,0001	0,5825	<,0001	<,0001	0,0006	<,0001	<,0001	0,6083	0,0164
(11)									1,000	-0,159	-0,615	-0,622	-0,632	-0,494	-0,575	-0,552	-0,615
(12)										0,3739	0,0004	0,0015	0,0009	0,0087	0,0009	0,0034	0,0014
(13)										1,000	-0,130	-0,092	-0,135	-0,086	-0,140	0,0350	0,0322
(14)											0,5006	0,6322	0,4933	0,6494	0,4345	0,8594	0,8707
(15)											1,000	0,8755	0,5424	0,3509	0,6363	0,0974	0,4675
(16)												<,0001	0,0035	0,0788	0,0001	0,6506	0,0160
(17)												1,000	0,6294	0,6757	0,8054	0,2861	0,4568
													0,0003	<,0001	<,0001	0,1565	0,0127
													1,000	0,5212	0,8898	0,4436	0,2116
														0,0045	<,0001	0,0205	0,2796
														1,000	0,5305	0,2023	0,6105
															0,0018	0,2925	0,0007
															1,000	0,3524	0,3010
																0,0518	0,0940
																1,000	0,4970
																	0,0098
																	1,000
																	0,5714
																	0,0019
																	1,000
																	<,0001
																	1,000

* Coeficiente de correlação de Pearson. ** Valores de p

4.3 Identificação de elementos *cis* em regiões promotoras de genes *ERFs*

Das 17 sequências utilizadas para obtenção de promotores e identificação de elementos *cis*, identificaram-se 139 diferentes elementos *cis* significativos ($p \leq 5\%$), com ocorrência de pelo menos um por gene. Dentre os promotores analisados verificou-se uma média de ocorrências de 4 vezes, e um desvio padrão de 6, assim todos os *ERFs* foram considerados de regulação complexa (Tab. 4), pois apresentaram um número de ocorrência acima de 10 (maior que a média mais um desvio padrão). Sugere-se que para a indução de genes de regulação complexa, uma maior interação de elementos *cis* é necessária, enquanto que para a ativação de genes de regulação simples, uma maior interação entre estes fatores é requerida.

Tabela 4. Número de ocorrências de elementos *cis* em promotores de *ERFs* de genes considerados de regulação complexa. CGF/FAEM/UFPel, 2012

Regulação Complexa	Nº Cis	Ocorrências
AK241246 (Os02g065520)	12	16
AK067313 (Os01g016500)	11	15
AK108830 (Os02g065700)	14	21
AK102559 (Os05g047330)	12	20
AK101949 (Os03g018300)	30	47
AK101054 (Os01g022410)	11	21
AK109226 (Os02g052110)	11	22
AK099221 (Os05g034620)	21	49
AK073133 (Os03g018280)	12	28
AK109390 (Os03g086010)	15	34
AK241243 (Os03g019190)	13	34
AK071519 (Os09g052220)	19	49
AK105991 (Os02g075280)	6	20
AK069833 (Os06g019400)	18	61
AK072749 (Os09g028660)	12	42
AK109360 (Os07g061700)	11	41
AK104576 (Os09g043450)	9	37

Nº de *cis*: Número de diferentes elementos *cis* presente em um determinado gene.

Ocorrências: Quantidade total de elementos *cis* presente em determinado gene.

Tabela 5. Número de ocorrências dos elementos *cis* significativos dentro do grupo dos 17 *ERFs*. CGF/FAEM/UFPeI, 2012

Elementos <i>Cis</i>	Ocorrências	Elementos <i>Cis</i>	Ocorrências
BOXCPSAS1	3	XYLAT	4
BOXIINTPATPB	3	ARFAT	4
CAREOSREP1	3	BS1EGCCR	5
CARGCW8GAT	3	POLASIG1	5
DRE2COREZMRAB17	3	QELEMENTZM13	5
ERELEE4	3	T/GBOXATPIN2	5
IRO2OS	3	300ELEMENT	5
NAPINMOTIFBN	3	CGACGOSAMY3	6
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	3	GCCCORE	6
REBETALGLHCB21	3	RBCSCONSENSUS	6
RHERPATPA7	3	TATABOX2	6
RYREPEATBNNAPA	3	ACGTABOX	6
SEF4MOTIFGM7S	3	AUXREPSIAA4	6
300CORE	3	CGCGBOXAT	7
SV40COREENHAN	3	POLASIG3	7
ABREOSRAB21	3	ACGTABREMOTIFA2OSEM	7
TRANSINITDICOTS	3	CURECORECR	8
ABRERATCAL	3	GT1CONSENSUS	8
WBOXHVIS01	3	REALPHALGLHCB21	8
AMYBOX1	3	EBOXBNNAPA	9
ANAERO1CONSENSUS	3	MYB1AT	9
BIHD1OS	4	MYCCONSENSUSAT	9
CCAATBOX1	4	ROOTMOTIFTAPOX1	9
HEXMOTIFTAH3H4	4	IBOXCORE	10
IBOXCORENT	4	ARR1AT	10
LTRE1HVBLT49	4	GATABOX	11
MYBGAHV	4	NODCON1GM	12
NODCON2GM	4	TAAAGSTKST1	12
POLASIG2	4	GT1GMSCAM4	13
RAV1AAT	4	GTGANTG10	15
SEF1MOTIF	4	OSE1ROOTNODULE	16
SITEIIATCYTC	4	CACTFTPPCA1	29
WBOXNTCHN48	4	DOFCOREZM	62

Foram observados elementos *cis* com diferentes números de ocorrências, variando de uma a 62 ocorrências. Os elementos *cis* que apresentaram número de ocorrências acima de três são apresentados na Tab. 5.

4.4 Associação de elementos *Cis* com perfil de expressão de *ERFs* em condições de excesso de ferro

Para relacionar a presença de determinado elemento *cis* com um dado perfil de expressão, os elementos *cis* significativos foram comparados com o perfil de expressão obtido em cada cultivar. Para esta comparação, utilizou-se as sequências que apresentaram maior nível de transcritos dentro de cada cultivar. Desta forma, verificou-se a presença de elementos *cis* comuns na região promotora de *ERFs* pertencentes ao mesmo grupo.

Ao analisar os elementos *cis* presentes na região promotora das nove sequências superexpressas na cultivar BR - IRGA 409, observou-se que os elementos *cis* BIHD1OS, BOXCPSAS1, CAREOSREP1, DOFCOREZM, RBCSCONSENSUS, REALPHALGLHCB21, REBETALGLHCB21, SV40COREENHAN, T/GBOXATPIN2, TAAAGSTKST1, TATABOX2, TGACGTVMAMY, ABRERATCAL, ACGTABOX, -300ELEMENT, ACGTCBO, foram comuns em no mínimo, duas sequências *ERFs*, indicando que esses elementos podem estar envolvidos no mecanismo de regulação destas sequências na cultivar sensível a toxidez.

Observando as sequências que foram induzidas na cultivar Epagri 108, foi possível analisar que os elementos *cis* NODCON1GM e OSE1ROOTNODULE foram comuns nas sequências AK101054 e AK109390, respectivamente e T/GBOXATPIN2 nas sequências AK067313 e AK109390, contudo verificou-se que não há elementos *cis* comuns para a sequência AK105991. Desta forma, sugere-se que a regulação destes *ERFs* ocorre através da combinação destes elementos com outros elementos presentes nos promotores destas sequências, com a finalidade de ativar mecanismos que induzam as estratégias de tolerância.

Nos três transcritos induzidos na cultivar Nipponbare foram avaliados a ocorrência dos elementos *cis* CACTFTPPCA1, QELEMENTZMZM13 e ARFAT.

Os *ERFs* AK108830 e AK1011054, os quais apresentaram altos níveis de transcritos somente às 12 horas de estresse, nas cultivares BR - IRGA 409 e Epagri 108, apresentaram o elemento *cis* SV40COREENHAN em comum. Isto

pode ser um indício que este elemento possivelmente regula a expressão destes dois *ERFs*.

4.5 Associação de elementos *Cis* com as correlações

Foi verificada a presença de elementos *cis* entre as variáveis que evidenciaram maiores coeficientes de correlação.

Entre as variáveis AK071519 e AK099221, as quais apresentaram o maior coeficiente de correlação positiva (0,98*), foi possível observar a presença de três elementos *cis* em comum: DRE2COREZMRAB1, RBCSCONSENSUS e TATABOX1. Para os *ERFs* AK099221 e AK109226, que também evidenciaram alta correlação ($r = 0,91^*$), verificou-se a presença de dois elementos, RBCSCONSENSUS e T/GBOXATPIN.

O mesmo pode ser analisado para AK071519 e AK109226 ($r = 0,96^*$), os quais apresentaram o elemento *cis* RBCSCONSENSUS, AK071519 e AK101949 ($r = 0,86^*$), com os elementos HEXMOTIFTAH3H, TATAPVTRNALE e ACGTACBOX e AK071519 e AK073133 ($r = 0,81^*$), com os elementos ACGTCBOX e TAAAGSTKST1 em comum entre suas sequências. Porém entre as variáveis que apresentaram correlação negativa, não houve presença de elementos *cis* comuns. O fato da presença de elementos *cis* comuns entre as variáveis que apresentaram correlação positiva, indica que possivelmente esses elementos *cis* estão envolvidos na regulação destes *ERFs*, o que pode explicar a correlação existente entre eles.

4.6 Análise de Componentes Principais (ACP)

Observou-se, a partir da matriz de correlação da ACP (Análise de Componentes Principais) (dados não mostrados), que ocorreram apenas seis altas correlações positivas entre AK071519 e AK099221 ($r=0,97$), AK109226 e AK071519 ($r=0,96$), AK073133 e AK108830 ($r=0,92$), AK109226 e AK099221 ($r=0,92$), AK101949 e AK099221 ($r=0,90$), AK241246 e AK099221 ($r=0,90$). Enquanto que os valores dos coeficientes de correlação para demais variáveis

foram considerados de médios a baixos. Assim, para explicar a distribuição dos grupos foi necessário um maior número de componentes (Tab. 6), em função da grande quantidade de médias/baixas correlações entre as variáveis dependentes, fator esse que é variável em função da população estudada (MANLY, 2004).

A Tab. 6 mostra os CPs gerados a partir dos dados de 17 sequências de *ERFs*. Esse novo conjunto de 16 variáveis ortogonais (CPs) foi gerado pela ACP, onde o primeiro componente principal (CP1) apresentou o maior autovalor, de 8,26, e representou 48,62% da variabilidade no conjunto de dados. Os CPs segundo e terceiro (CP2 e CP3) tiveram autovalores de 2,30 e 1,50, e foram responsáveis por 13,55 e 8,81% da variância nos dados, respectivamente. O restante, os 13 CPs gerados (CP4 a CP16) produziram progressivamente autovalores menores e não explicaram de forma significativa a variabilidade dos dados (29,02%). Portanto, de acordo com a regra de Jolliffe (2002), apenas os três primeiros CPs foram utilizados para estudos adicionais.

Tabela 6. Componentes principais (CP), autovalores (λ_i), percentagem de variação (% VCP) e da variação acumulada explicada pelos componentes principais (% VCP acumulada) considerando a expressão quantitativa das 17 sequências de *ERFs* referentes aos genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao excesso de Fe^{2+} (0; 6; 12; 18 e 24h). CGF/FAEM/UFPEL, 2012

Componentes Principais (CP)	(λ_i)	% VCP	% VCP (acumulada)
CP1	8,26	48,62	48,62
CP2	2,30	13,55	62,17
CP3	1,50	8,81	70,98
CP4	1,27	7,45	78,43
CP5	1,14	6,69	85,12
CP6	0,873	5,13	90,25
CP7	0,614	3,61	93,86
CP8	0,310	1,83	95,69
CP9	0,279	1,64	97,33
CP10	0,168	0,99	98,32
CP11	0,119	0,70	99,02

CP12	0,094	0,55	99,57
CP13	0,036	0,22	99,79
CP14	0,016	0,09	99,88
CP15	0,014	0,08	99,96
CP16	0,006	0,04	100

Os dois primeiros componentes principais explicaram uma grande proporção da variação total, ou seja, 62,17%, onde o CP1 e o CP2 foram responsáveis por 48,62 e 13,55%, respectivamente, o que possibilitou a plotagem dos escores (cargas) dos componentes referentes a cada genótipo (Fig. 20a). Verificou-se a formação de dois grupos distintos (marcados com círculos), mostrando a diferenciação entre os genótipos. Os genótipos Epagri 108 e Nipponbare constituíram um grupo, enquanto que BR-IRGA 409, sensível à toxidez por ferro, agrupou independentemente dos demais.

Analizando os autovetores correspondentes à componente principal 1, os quais são o resultado do carregamento das variáveis originais sobre esta componente e representam uma medida da relativa importância de cada variável, destacaram-se os genes AK071519, AK099221, AK101949 e AK241246, os quais apresentaram as maiores correlações positivas (diretamente proporcional) (Tab. 3). Já, na CP2, somente dois genes contribuíram para a diferenciação, o AK067313 e o AK072749, mas com os maiores pesos entre os três CPs (Tab. 6).

A primeira componente associada a CP3 explicaram 57,63% da variação existente entre as variáveis, em que a CP1 representou 48,62% e a CP3 somente 8,81% do total da variação (Fig. 20b). Nessa dispersão, os grupos formados na CP1-CP2, se sustentaram. Porém, os grupos encontraram-se mais próximos, mostrando que ocorreu diferenciação, mas de forma inferior a obtida na CP1-CP2. Considerando os autovetores relacionados a CP3, somente os genes AK105991, AK108830 e AK069833 obtiveram os maiores pesos que caracterizaram a diferenciação.

Tabela 7. Autovetores correspondentes ao três componentes principais (CP1, CP2 e CP3) para as 17 variáveis referentes as sequências de *ERFs*, considerando os genótipos de arroz irrigado (Epagri 108, BR - IRGA 409 e Nipponbare), avaliados em cinco tempos de exposição ao excesso de Fe^{2+} (0; 6; 12; 18 e 24h). CGF/FAEM/UFPel, 2012

Variáveis	PC1	PC2	PC3
AK241243	0,1544	0,2981	-0,3695
AK105991	0,0220	0,3374	0,4848
AK071519	0,3166	-0,1801	-0,0279
AK108830	0,2135	-0,0350	0,4010
AK067313	0,0889	0,5818	0,0834
AK099221	0,3301	-0,1666	-0,0189
AK102559	-0,2416	-0,1886	0,0924
AK101054	-0,0509	0,0340	0,0471
AK073133	0,2876	-0,1154	-0,1143
AK101949	0,3233	-0,1146	-0,0204
AK109360	0,2688	0,1507	-0,2484
AK069833	0,2691	0,0002	0,3939
AK104576	0,2849	0,0394	-0,2942
AK072749	0,1104	0,4925	-0,1404
AK109390	0,2082	0,1370	0,2855
AK241246	0,3059	-0,1558	0,1648
AK109226	0,2992	-0,1547	-0,0570
Autovalor	8,26	2,30	1,50
Variação (%)	48,62	13,55	8,81
Variação acumulada (%)	48,62	62,17	70,98

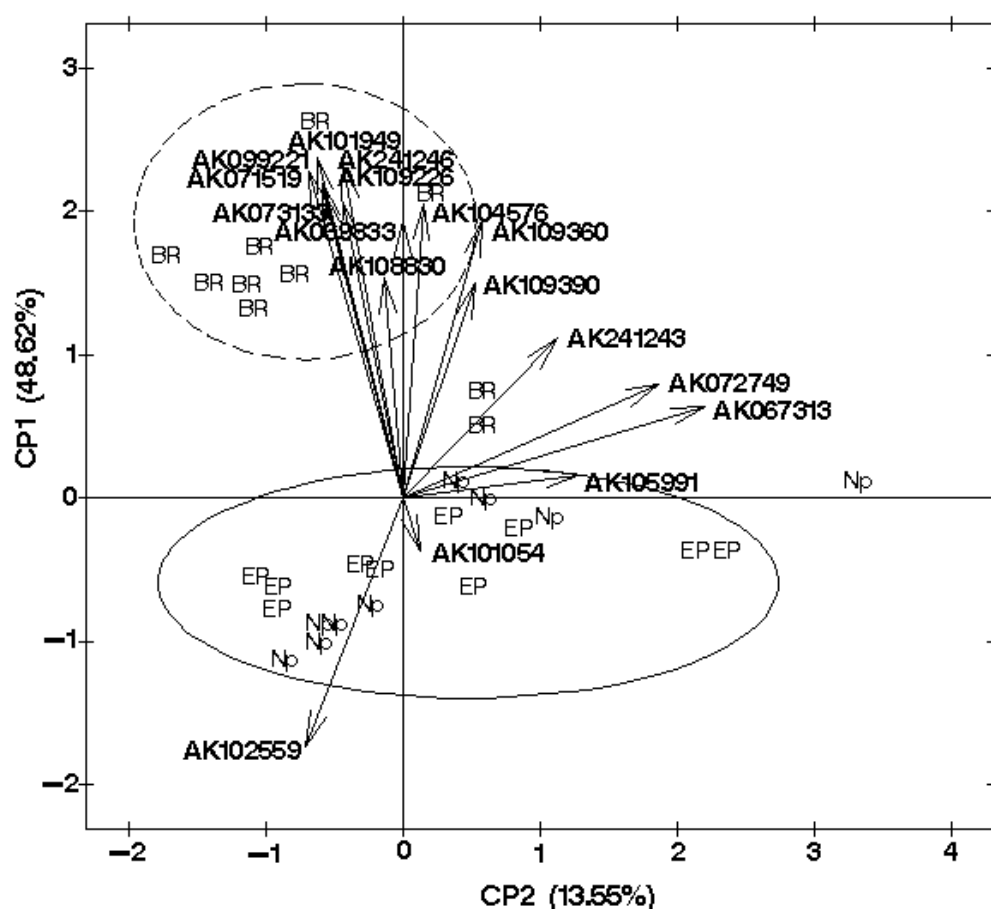


Figura 20a. Plotagem das cargas (scores) do CP1-CP2 referentes as 17 seqüências de *ERFs* e aos genótipos de arroz irrigado (Epagri 108 (EP), BR - IRGA 409 (BR) e Nipponbare (Np)). FAEM/UFPEL-CGF, 2012.

— — —: Grupo A: BR - IRGA 409 (BR).

————: Grupo B: Epagri 108 (EP) e Nipponbare (Np).

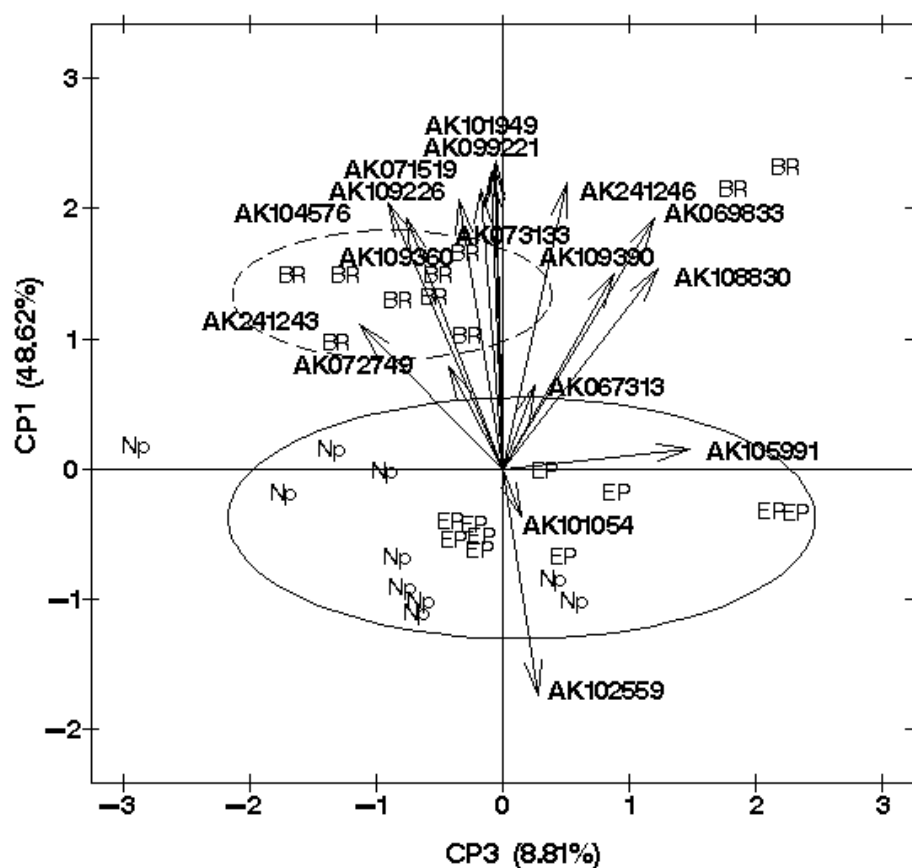


Figura 20b. Plotagem das cargas (scores) do CP1-CP3 referentes as 17 sequências de *ERFs* e aos genótipos de arroz irrigado (Epagri 108 (EP), BR - IRGA 409 (BR) e Nipponbare (Np). FAEM/UFPeI-CGF, 2012.

— — —: Grupo A: BR - IRGA 409 (BR).

— — —: Grupo B: Epagri 108 (EP) e Nipponbare (Np).

5 CONCLUSÕES

A maioria dos membros da família de *ERFs* estudados demonstram perfil diferencial nas cultivares Nipponbare, BR - IRGA 409 e Epagri 108, em condições de excesso de ferro. Alguns *ERFs* apresentam expressão específica, enquanto que outros apresentam expressão comum frente aos diferentes tempos e cultivares analisados, no estresse ambiental estudado. Dos 17 *ERFs* analisados, a regulação da expressão se dá de forma complexa, além disso, há uma relação entre a presença de determinado elemento *cis* com o perfil de expressão e que apresentam correlação positiva significativa.

6 Referências

AARTS, M.G.M.; FIERS, M. What drives plant stress genes? **Trends in Plant Science**, v.8, no3, p.99-102, 2003.

AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro**. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTE, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

ALLEN, M.D.; YAMASAKI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TATENO, M.; SUZUKI, M.A novel mode of DNA recognition by a beta sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.17, p.5485–5496, 1998.

AROSIO, P. e LEVI, S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n. 4, p. 457–463, 2002.

ASCH, F.; BECKER, M.; KPONGOR, D. S. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.168, n.6, p.764-773, 2005.

AUDEBERT, A.; SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, p.1877-1885, 2004.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 19. 1991, Balneário Camburiú. **Anais da Reunião da Cultura do Arroz**, Florianópolis: EMPASC, 1993. 156-159p.

BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**. v.201, p.137-147. 1998.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v.168, n.4, p.558-573. 2005.

BENCKISER, G., OTTOW, J. C. G., SANTIAGO, S., WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines.1982.

BENNETT, J. Status of breeding for tolerance of abiotic stresses and prospects for use of molecular techniques. TAC Secretariat, **Food and Agriculture Organization-FAO**, Rome. 2001.

BERK, A.J. Activation of RNA polymerase II transcription. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 330-335.1999.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K.K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 411-424. 2008.

BIENFAIT, H. F. Regulated redox process at the plasmalemma of plant root cells and their function on iron uptake. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Baltimore, n. 17, p. 73-83, 1985.

BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, v. 7, p.1099–1111, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de Sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 2009. 365p.

BRESOLIN, A.P.S. **Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**. 2010. 144f. Tese. (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Plant biology and pathology**, v.322, p.43-54, 1999.

BRIAT J.F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v.2 n.5. p.187–193, 1997.

BRIVANLOU, A.; DARNELL, J. Signal transduction and the control of gene expression. **Science**, v.295, p.813–818, 2002.

CAMARGO, C.E.O DE; OLIVEIRA O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia, Campinas** v.40, p.21-23,1981.

CANTRELL, R. Arroz: por quê é tão essencial para a segurança e estabilidade global. **Perspectivas Econômicas** - Departamento de Estado dos Estados Unidos, n.2, v.7, p.22-25, 2002.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. S.; SILVA, S.A. **Condução de populações no melhoramento genético de plantas**. Editora e Gráfica Universitária - UFPel, 2003.

CHANG, C; STADLER, R. Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. **Bioessays**, v.23, p.619-627, 2001.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 08 de novembro de 2012.

COSTA DE OLIVEIRA, A. Mapeamento Comparativo. In: M. S.C.K. (Org.). **MARCADORES MOLECULARES EM PLANTAS**. 1. ed. PORTO ALEGRE: UFRGS, 1998, v. 1, 141p.

COSTA DE OLIVEIRA; MAGALHÃES JR. Arroz. In: Origem e Evolução de Plantas Cultivadas. Brasília: Ed Embrapa Informação Tecnológica, 2008.p.909.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, p.11-163. 2011.

CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S.L.; BRIAT, J.F.; WALKER, E.L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**, v. 409, p.346-349, 2001.

DEPREZ, R.H.L. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p. 63-69, 2002.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. H. Rice: **Nutrient disorders and nutrient management**. The International Rice Research Institute, Manila, The Philippines, 2000. p.191.

DORSETT, D. Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 9, p. 505-514. 1999.

DUGARDEYN, W.; LEE, T.; HUANG, H.; HUANG, H.; PAN, R. PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. **BMC Genomics**, v.9, p.561, 2008.

DUGARDEYN, J.; VAN DER STRAETEN, D.; Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**, v. 175, p. 59–70, 2008.

EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J.P.; GUERINOT, M.L.. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceeding of the National Academy Science**, v.93. p.5624-5628. 1996.

EL BELTAGY, A.S.; HALL, M.A. Effect of water stress upon endogenous ethylene levels in *Vicia faba*. **New Phytologist**, v. 73, p. 47-59, 1974.

EL BELTAGY, A.S.; KHALIFA, M.M.; HALL, M.A. Salinity in relation to ethylene. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 6, p. 269-271, 1979.

FESSELE, S., MAIER, H., ZISCHEK, C., NELSON, P.J., WERNER, T. Regulatory context is a crucial part of gene function. **Trends in Genetics**, v. 18, p. 60-63. 2002.

FINATTO, T. **Transcriptomic analysis of genes and LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) in response to iron toxicity**, 2012. 190f. Tese. (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FUJIMOTO, S.Y.; OHTA, M.; USUI, A.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M.; Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression, **The Plant Cell**, v. 12, p. 393-404, 2000.

FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES J. The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. **The Plant Cell**, v.23, p.412-427, 2011.

GENDRE, D.; CZERNIC, P.; CONEJERO, G.; PIANELLI, K.; BRIAT, J.F.; LEBRUN, M.; MAR, S. *TcYSL3*, a member of the YSL gene family from the hyper accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. **The Plant Journal**, v.49, p.1-15. 2007.

GILMOUR, S.J.; SEBOLT, A.M.; SALAZAR, M.P.; EVERARD, J.D.; THOMASHOW, M.F. Overexpression of Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1854-1865. 2000.

GILMOUR, S.J.; FOWLER, S.G.; THOMASHOW, M.F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 767-781. 2004.

GOESCHL, J.D.; RAPPAPORT, L.; PRATT, H.K. Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. **Plant Physiology**, v.41, p. 877-884, 1966.

GOMES, A. da S.; SOUSA, R.O.; DIAS, A.D.; MACHADO, M.O.; PAULETTO, E.A. A problemática da toxicidade do Fe em arroz irrigado no RS. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz, 4., **Anais da Reunião Técnica Nacional de Pesquisa de Arroz**, Goiânia, CNPAF/EMBRAPA, 1990. 116p.

GRIST, D. H. **Rice**. 5.edição. London: Longman, 1978. 601p.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FERT-NEO, A.G.; FERT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**, v.26. n.4, p.477-497. 2003.

GUERINOT, M.L; YI, Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology**, v.104, p.815-820, 1994.

GUERINOT, M.L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1465 190-198. 2000.

HANSEN K.; BREEMEN N. Translocation of iron in sulfate acid soils: II Reduction and diffusion of dissolved ferrous iron. **Soil Science Society American Proceedings**, v.39 p.1148-1153. 1975.

HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, n. 216. p.541-551. 2003.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**. v.27 p. 297-300, 1999.

INTERNATIONAL BRACHYPODIUM INITIATIVE (IBI). Genome sequencing and analysis of the model grass Brachypodium distachyon. **Nature**, v.463, n.08747, p.763-768, 2010.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (IRGSP). The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.1, n.7052, p.793-800, 2005.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, K.; NAKAZONO, M.; KOBAYASHI, T.; WADA, Y. WATANABE, S.; MATSUHASHI, S.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHISAWA, N.K. Rice plants take up iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} . **Plant Journal**, v.45, p. 335-346. 2006.

IRRI - The International Rice Research Institute. Disponível em <http://irri.org/>. Acesso em 02 de novembro de 2012.

FACHINELLO, J.C.; KERSTEN, E. Fitorreguladores *in*: NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J.C. **Fruticultura** - Fundamentos e Práticas: Editora e Gráfica UFPEL. Pelotas - RS v.1000, 1996. 311p.

FAGERIA, N.K.; RABELO, N.A. Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, v. 10, p. 653 – 661.1987.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>> Acesso em 20 de março de 2010.

FAO - *Food and Agriculture Organization* of the United Nations. Disponível em <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>. Acesso em 30 de outubro 2012.

GAO, S.; ZHANG, H.; TIAN, Y.; LI, F.; ZHANG, Z.; LU, X.; CHEN X.; HUANG, R. Expression of TERF1 in rice regulates expression of stress-responsive genes and enhances tolerance to drought and high-salinity. **Plant Cell Reports**. v. 27, p.1787-1795. 2008.

GE, S.; SANG, T.; LU, B.R.; HONG, D.Y. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n. 25, p. 14400-14405. 1999.

JOLLIFFE, I.T., 2002. **Principal Component Analysis**, 2º edição. New York: Springer-Verlag. 487p.

KARABA, DIXIT, S.; GRECO, R.; AHARONI, A.; TRIJATMIKO, K.R.; MARSCH-MARTINEZ, N.; KRISHNAN, A.; NATARAJA, K.N.; UDAYAKUMAR M.; PEREIRA A. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.15270-15275. 2007.

KAWASE, M. Effect of flooding on ethylene concentration in horticultural plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 97, p.584, 1972.

KIM, Y.S.; CHOI, D.; LEE, M.M.; LEE, S.H.; KIM, W.T. Biotic and Abiotic Stress-Related Expression of 1-Aminocyclopropane-l-carboxylate Oxidase Gene Family in *Nicotiana glutinosa* L. **Plant Cell Physiology**, v.39, p. 565-573, 1998.

KIM, S.A.; GUERINOT, M.L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 581, p.2273–2280. 2007.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-152, 2012.

KORNBERG, R. D. The molecular basis os eukaryotic transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 12995-12961, 2007.

LANTIN, R. S.; NEUE, H. U. Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice. 17th Irrigated Rice Meeting. Brazil. 26–30 Sep.1989. **Lavoura-Arrozeira**. v.42, p.3–8.1989.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, v. 144, p. 218-231. 2007.

LEE, B. Filling the world's rice bowl. **International Rice Research Institute**. 1993.

LINDSAY, W.L.; SCHWAB, A.P. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.5, p. 821-840. 1982.

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibrium in soils**, New York: J. Wiley. 1979. p.449.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.10, p. 1391-1406. 1998.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T-Y.; SCHAALL, B, A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p. 9578-9583, 2006.

MAIA, L.C. **Desenvolvimento de ferramenta e análise in silico da ocorrência de microssatélites (simple sequence repeat) no genoma do arroz**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MAGALHÃES JR, A. M. de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A. S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Avaliação de linhagens de arroz irrigado à toxicidade por ferro do programa de melhoramento da Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27., 2007, Pelotas. **Anais do Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 5 Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 108-111p.

MAGALHÃES JR, A.M.de; FADUNDES, P.R.R.; GOMES, A.S.; FRANCO, D.F.; SEVERO, A avaliação de Linhagens de Arroz Irrigado quanto à Toxidez por Ferro. **Arroz Irrigado: Resultados de pesquisa do melhoramento genético para tolerância à estresses abióticos, na Embrapa Clima Temperado, 2007/2008**. Pelotas:Embrapa Clima Temperado, 2009, p.37-44.

MANLY, B.F.J. **Multivariate statistical methods: a primer**. London: Chapman and Hall, 1988. 159p.

MARINO, C.L. Melhoramento Genético de Plantas e os Transgênicos, **Genética**, p. 75-78, 2006.

MARSCHNER. H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, San Diego, USA.1995. 889p.

MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z.; GALE, M.D. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. **Current Biology**. v.5, n.7, p.737-739, 1995.

MORI, S. Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.250– 53,1999.

MORGAN, P.W.; DREW, M.C. Ethylene and plant responses to stress. **Physiologia Plantarum**, v.100, p. 620-630, 1997.

NAKAGAWA, N.; MORI,H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the genes by auxin and wounding. **Plant; Cell Physiology**, v.32, p. 1153-1163, 1991.

NAKAJIMA, N.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASCKI, H. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. **Plant; Cell Physiology**, v. 31, p. 1021-1029, 1990.

NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-Wide Analysis of the *ERF* Gene Family in Arabidopsis and Rice. **Plant Physiology**, v.140, p. 411-432. 2006.

NEGISHI, T.; NAKANISHI, H.; YAZAKI, J.; KISHIMOTO, N.; FUJII, F. et al. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe deficient barley roots. **The Plant Journal**, v.30, p.83–94, 2002.

OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H.; Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **The Plant Cell**, v.7, p.173–182, 1995.

OSBORNE, D.J. Abscission. **Critical Reviews in Plant Sciences** v.8, n.2. p.103-129, 1989

PEGORARO, C., MERTZ, L.M., HENNING, F.A., FARIAS, D.R., MAIA L. C.da, ROMBALDI C.V., OLIVEIRA A.C.de; Expression profiling under stress conditions of rice *ERF* gene family. **Dados Não Publicados**, 2012.

PENG, X.X.; YAMAUCHI, M. Ethylene production in rive bronzing leaves induced by ferrous iron. **Plant and Soil**. v. 149. p. 227-234, 1993.

PEREIRA, J. A. A cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 226p.

POEHLMANN, J.M.; SLEPER, D.A. Breeding wheat. In: **Breeding field crops**. Ames: Iowa State University Press, p. 259-277. 1995.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemical of submerged soils. **Advances in Agronomy**, v.24, p. 29-96, 1972.

QUINET, M.; VROMMAN, D.; CLIPPE, A.; BERTIN, P.; LEQUEUX, H.; DUFEY, I.; LUTTS, STANLEY; LEFRÈVRE, I. Combined transcriptomic and physiological approaches reveal strong differences between short- and long-term response of rice (*Oryza sativa*) to iron toxicity. **Plant, Cell and Environment**. v. 35, p. 1837-1859, 2012.

RAMANATHA RAO, V.; REID, R. **Collecting plant genetic diversity**: technical guidelines. Wallingford: CAB International, 1995. 659-675 p.

RASMUSSEN, R. Quantification on the lightcycler. IN MEUER, S.; WITTEWERT, C.; NAKAGAWARA, K. (eds), Rapid Cycle Real-time PCR, **Methods and Applications Springer Press**. Heidelberg, p. 21–34. 2001.

ROBINSON, N.J.; PROCTOR, C.M.; CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M.L. A ferric chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature** 397: 694-697. 1999.

ROMBAUTS, S.; FLORQUIN, K.; LESCOT, M.; MARCHAL, K.; ROUZE, P.; VAN DE PEER, Y. Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1162-1176. 2003.

ROMERA, F.J.; ALCANTARA, E.; Ethylene involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by Strategy I plants. **Functional Plant Biology**. v. 31, p. 315–328. 2004.

ROMERA, F.J.; ALCANTARA, E.; Ethylene production by Fe-deficient roots and its involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by Strategy I plants. **Annals of Botany**, v. 83, p. 51–55. 1999.

RÖMHMELD, V.; MARSCHNER, H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. **Adv. Plant Nutrition**. v.2, p.155± 204. 1986.

SAKUMA, Y., LIU Q, DUBOUZET, J.G., ABE, H., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKA, K. DNA-binding specificity of the *ERF/AP2* domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.290, p.998–1000, 2002.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**. v..27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; MULBAH, C.K.; DIATTA, K.; DELAUNE, R.D.; PATRICK, W.H.; SINGH, B.N.; JONES, M.P. The role of tolerant genotypes and plant nutrients in the management of iron toxicity in lowland rice. **Journal of Agricultural Science**. v.126, p. 143-149. 1996.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**. v. 18, p. 1292-1309. 2006.

SANTOS, L. S. ; COSTA DE OLIVEIRA, A. Rice iron metabolism: from source to solution. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10, p. 64-72, 2007.

SANTOS, R.S. **Regulação Transcricional e Epigenética de *ERFs* em Arroz Sob Estresse Abiótico**. 2012. 76f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics, version 9.1**. Cary: SAS Institute, 2002.

SCHAAF, G.; LUDEWIG, U.; ERENOGLU, B.E.; MORI, S.; KITAHARA, T.; VON WIREN, N. ZmYS1 functions as a proton-coupled Symporter for phytosiderophore- and nicotianaminechelated metals. **Journal Biological Chemistry**. v.279, p.9091–9096. 2004.

SCHMIDT, W. Mechanisms and regulation of reduction based iron uptake in plants. **New Phytology**. v. 141, p.1–26. 1999.

SCHMIDT, W.; SCHIKORA, A. Different Pathways Are Involved in Phosphate and Iron Stress-Induced Alterations of Root Epidermal Cell Development. **Plant Physiology**. V. 125, p.2078-2084. 2001.

SCHNELL, D.J.; KESSLER, F.; BLOBEL, G. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. **Science**. v. 266, p. 1007-1012. 1994.

- SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. Abiotic stress response in plants. **Physiological, biochemical and genetic perspectives**. 346p. 2011.
- SINGH, K.B.; FOLEY, R.C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.430-436, 2002.
- SHIMIZU, H.; SATO, K.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; OZAKI, R.; IMAI, R.; KUSANO, T. LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. **Plant Cell Physiol.** v.46, p.1623–1634. 2005.
- SMALLE, J., VAN DER STRAETEN, D., Ethylene and vegetative development, **Physiologia Plantarum**, v.100, p.593–605, 1997-1.
- SOUSA, R. O. de; CAMARGO, F. A. O.; VAHL, L. C. Solos alagados – Reações de Redox. In: MEURER, E.J. (3 ed.). **Fundamentos de química do solo**. Editora Evangraf, Porto Alegre, p.185-211. 2006.
- SOUSA, R. O. de.; GOMES, A. da S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A da S. e MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de (eds.). **A cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 305-334.
- SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2010. 164 p.
- STEPANOVA, A.N. ALONSO, J.M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 548-555. 2009.
- WANG, Y.H.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN V.L. Rapid Induction of Regulatory and Transporter Genes in Response to Phosphorus, Potassium, and Iron Deficiencies in Tomato Roots. Evidence for Cross Talk and Root/Rhizosphere-Mediated Signals. **Plant Physiology**, v.130, p.1361-1370, 2002.
- WARDA. **Annual Report 2000**. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.
- WISSUWA, M. Combining a modeling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. **Plant and Soil**. v.269, n.1/2, p.57-68. 2005.
- WU, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; WANG, X.C.; HUANG, R. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress

response enhances tolerance of Tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. **Plant Physiology**, v.148, p.1953-1963. 2008.

WU, J.; WANG, C.; ZHENG, L.; WANG, L.; CHEN, Y.; WHELAN, J.; SHOU, H. Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *Oryza sativa*. **Journal of Experimental Botany**. p. 667–674. 2011.

WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y.; ZHU, J.M.; WU, Y.R.; SENADHIRA, D.; PATERSON, A.H. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil**. v.203, p.217–226. 1998.

VAHL, L. C. **Toxidez de Ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. 1991. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VAUGHAN, D. A.; CHANG, T.T. Collecting the rice gene pool. In: GUARINO, L.; SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the *ERF/AP2* domain of *Arabidopsis DREBs*, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 290, p. 998-1009, 2002

XU, K.N.; MACKILL, D.J. A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. **Molecular Breeding**, v.2, p.219–224, 1996.

YAMAUCHI, M.; PENG, X.X. Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. **Plant and Soil**, v.173, p.21-28, 1995.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; MIZOI, J. Molecular Approaches to Improve Rice Abiotic Stress Tolerance, **Methods in Molecular Biology**, v. 956, p. 269-28 2013.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, v. 6, p. 251-264. 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional Analysis of an *Arabidopsis* Transcription Factor, DREB2A Involved in Drought-Responsive Gene Expression. **The Plant Cell**. v.18, p.1292-1309. 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. **TRENDS in Plant Science**, v.10, p. 88-94. 2005.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. The International Rice Research Institute, Philippines, 269p. 1981.

ZAREMBINSKI, T.I., THEOLOGIS, A. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Biology of the Cell**, v.4, p.363–373, 1993.

ZEIGER, E.; TAIZ, L.; **Fisiologia Vegetal** – 4 Ed. Porto Alegre. 2009. 710p.

ZHANG, Q.; LI, J.; XUE Y.; HAN Bin; DENG, W. X. Rice 2020: A Call For An International Coordinated Effort In Rice Functional Genomics. **Molecular Plant**, v.1, p.715-719, 2008.

7 VITAE

Mariana Madruga Krüger, nascida em 22/09/1988 em Piratini/RS, ingressou no curso de Ciências Biológicas pela Universidade Católica de Pelotas, (UCPel) em fevereiro de 2006, concluindo o curso em dezembro de 2009. Foi bolsista FAPEG na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no período de junho de 2009 a agosto de 2010. Em janeiro de 2010 ingressou na especialização em Gestão Ambiental e em agosto de 2010 iniciou estágio no Centro de Genômica e Fitomelhoramento, a qual cursou disciplina como aluna especial. Em março de 2011 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia área de concentração em Fitomelhoramento, sob orientação dos professores Antonio Costa de Oliveira e Luciano Carlos da Maia, concluindo o curso em dezembro de 2012.