

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**FERNANDA DA LUZ SOUTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS CONSERVADOS E PROSPECÇÃO DE  
MARCADORES EST-SSR EM GENES RESPONSÁVEIS PELA HOMEOSTASE DE  
METAIS PESADOS EM PLANTAS**

**São Gabriel**

**2015**

**FERNANDA DA LUZ SOUTO**

**IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS CONSERVADOS E PROSPECÇÃO DE  
MARCADORES EST-SSR EM GENES RESPONSÁVEIS PELA HOMEOSTASE DE  
METAIS PESADOS EM PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria

**São Gabriel**

**2015**

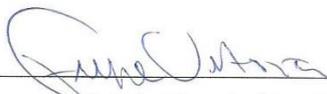
FERNANDA DA LUZ SOUTO

**IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS CONSERVADOS E PROSPECÇÃO DE  
MARCADORES EST-SSR EM GENES RESPONSÁVEIS PELA HOMEOSTASE DE  
METAIS PESADOS EM PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia da  
Universidade Federal do Pampa, como  
requisito parcial para obtenção do Título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 23/ 01/ 2015

Banca examinadora:



Prof. Drº. Filipe de Carvalho Victoria

Orientador  
UNIPAMPA



Prof. Drª. Margeli Pereira de Albuquerque

UNIPAMPA



Prof. Ms. Cristiane Barbosa D'Oliveira

UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais,  
por todo amor, ensinamentos,  
apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por conduzir meus caminhos nos momentos mais difíceis.

À minha família.

Aos meus pais, Luiz Augusto e Zelma, que apesar de todas as dificuldades me deram a melhor coisa que os pais podem dar aos seus filhos, educação.

Aos meus irmãos Patrique e Rayssa.

À minha Vó Edi.

À minha tia Hilda, sem ela certamente não estaria concluindo mais essa etapa em minha vida.

Aos meus dindos Paulo e Luci pelo apoio incondicional durante toda a minha vida.

Ao meu namorado Deivisson, pelo apoio e incentivo.

À minha amiga e colega Bruna, pela amizade, companheirismo, bem como pela colaboração e apoio na execução deste trabalho.

À minha amiga Karine, pela amizade, companheirismo, bem como pela colaboração e apoio na execução deste trabalho.

À minha amiga Daiane, pela amizade, companheirismo, bem como pela colaboração e apoio na execução deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa NEVA, pelo apoio durante a elaboração deste trabalho.

Ao professor Drº Filipe de Carvalho Victoria, pelos ensinamentos durante todo o processo de elaboração desse trabalho e orientação.

À todos os professores da Unipampa que participaram da minha formação por todo o conhecimento transmitido.

À todos meus amigos, alguns apesar de se encontrar mais distantes, mas sempre incentivando a conquista desse sonho.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“A vida nem sempre segue a  
nossa vontade,  
mas ela é perfeita naquilo  
que tem que ser.”

Chico Xavier

## RESUMO

Os metais pesados podem ser considerados tóxicos quando em concentrações elevadas dentro da célula. Com o decorrer da evolução as plantas desenvolveram mecanismos adaptativos para lidar com o excesso de metais pesados, alguns mecanismos de defesa podem ser chamados de motivos conservados, que tem a função de manter a homeostase correta desses metais na célula. Uma ferramenta que torna possível o estudo de motivos conservados, são os marcadores moleculares, estes se baseiam na variação natural da sequência de bases do DNA, e não são influenciados por diferentes condições ambientais nem fisiológicas do organismo, sendo utilizados em análises genéticas. O presente trabalho tem como objetivo prospectar marcadores moleculares através da identificação de motivos conservados em genes relacionados com o metabolismo de metais pesados em plantas, utilizando estes marcadores em *testes in vivo*. Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica, da Universidade Federal do Pampa, São Gabriel- RS, Brasil. As sequências utilizadas neste estudo foram selecionadas usando o número de acesso *GenBank* fornecido por Victoria et al. (2012), de diferentes espécies de plantas, sendo elas *Oryza sativa* L., *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Para a busca dos motivos conservados foi utilizado o programa online, Multiple Em For Motif Elicitation (MEME). É possível através de uma ferramenta do MEME, encontrar a função de cada motivo conservado, essa ferramenta é nomeada Motif Comparison Tool (TOMTOM). Foram analisadas setenta e seis sequências, separadamente por sua família gênica (FRO, IRT, NAS, RAMP, YSL e ZIP). Primeiramente as sequências foram submetidas às análises no MEME, identificando três motivos para cada família gênica, e foi utilizada a função TOMTOM, para analisar se os motivos encontrados estão reconhecidamente relacionados a genes responsáveis por homeostase de metais pesados em plantas, todos foram identificados como ligantes de metais do tipo *Zinc-coordinating*. A partir destes resultados foram prospectados treze pares de primers no programa SSRLOCATOR e estes marcadores foram testados *in vivo*.

Palavras- chave: Sequências. MEME. TOMTOM. *In silico*. *Zinc-coordinating*.

## ABSTRACT

Heavy metals can be considered as toxic in high concentrations within the cell. With the elapse of evolution plants have developed adaptive mechanisms for dealing with heavy excess metals, some defense mechanisms may be called conserved motifs, which has the function of maintaining homeostasis correct of those metals in the cell. A tool that makes possible the study of conserved motifs, are the molecular markers, these if are based in the natural variation of DNA base sequence, and are not influenced by different conditions environmental nor physiological of organism, being used in genetic analysis. This paper aims to prospect molecular markers through identifying conserved motifs in genes related to the heavy metal metabolism in plants, using these markers in vivo tests. The experiments were conducted in the laboratory of the nucleus of vegetation studies Antarctic, of the Federal University of Pampa, San Gabriel-RS, Brazil. The sequences used in this study were selected used the *GenBank* accession number provided by Victoria et al. (2012), of different plant species, they being *Oryza sativa* L., *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. For search of conserved motifs we used the online program, Multiple Em For Motif Elicitation (MEME). It is possible through a MEME tool, find the function of each conserved motif, that tool is named Motif Comparison Tool (TOMTOM). Were analyzed seventy-six sequences, separately by its genic family (FRO, IRT, NAS, RAMP, YSL and ZIP). Firstly the sequences were submitted to analysis in MEME, identifying three motives for each genic family, and was used the function TOMTOM, to analyze whether the motifs found are admittedly related responsible genes for homeostasis of heavy metals in plants, all were identified as metal ligands *Zinc-coordinating*. From these results were prospected thirteen pairs of primers in SSRLOCATOR program and these markers were tested *in vivo*.

Key words: Sequences. MEME. TOM TOM. *In silico*. *Zinc-coordinating*.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- (A) Plantação de <i>Oryza sativa</i> , (B) Panícula de <i>Oryza sativa</i> .....  | 17 |
| Figura 2- (A) Gametófitos de <i>Physcomitrella patens</i> , (B) Esporófito de <i>Physcomitrella patens</i> .....  | 18 |
| Figura 3- (A) Planta adulta de <i>Arabidopsis thaliana</i> , (B) Flor de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 19 |
| Figura 4- Motivo conservado.....  | 33 |
| Figura 5- Análise molecular (A) <i>Fragaria vesca</i> , (B) <i>Lolium multiflorum</i> , (C) <i>Oryza sativa</i> , (D) <i>Persea americana</i> , (E) <i>Physcomitrium acutifolium</i> , (F) <i>Polytrichum juniperinum</i> , (G) <i>Prunus pérsica</i> , (H) <i>Solanum lycopersicum</i> , (I) <i>Zea mays</i> ..... | 36 |
| Figura 6- Árvore filogenética das espécies utilizadas neste trabalho.....   | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Espécies de plantas utilizadas para extração de DNA.....                             | 31 |
| Tabela 2- Condições de termociclagem para PCR.....   | 32 |
| Tabela 3- Motivos conservados relacionados com o metabolismo de metais pesados em plantas..... | 34 |
| Tabela 4- Motivos encontrados para cada família gênica.....                                    | 34 |
| Tabela 5- Primers prospectados neste trabalho.....   | 35 |
| Tabela 6- Amplificações com os primers prospectados neste trabalho.....                        | 37 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

Fe- ferro

Zn- zinco

Ni- níquel

Mn- manganês

Co- cobalto

C- carbono

H- hidrogênio

O- oxigênio

N- nitrogênio

P- fósforo

S- enxofre

K- potássio

Ca- cálcio

Mg- magnésio

B- boro

Cl- cloro

Cu- cobre

Mo- molibdênio

Si- silício

SSR- sequências simples repetidas

SAM- seleção assistida por marcadores moleculares

PS- fitosideróforos

MA- mugineico

ZIP- *Zrt/ Irt- related Proteins*

FRO- *Ferric Reductase Oxidase*

YSL- *Yellow Stripe Like*

NAS- *Nicotianamina sintase*

NRAMP- *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*

DNA- ácido desoxirribonucléico

EST- *Expressed Sequence Tag*

cDNA- transcrição reversa

mRNA- RNA mensageiro

PCR- reação em cadeia da polimerase

MEME- *Multiple Em For MotifElicitation*

TOMTOM- *Motif Comparison Tool*

SSRLOCATOR- *Tool for simple sequence repeat*

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                | 17 |
| 2.1 Plantas como modelo de estudo.....                      | 17 |
| 2.1.1 <i>Oryza sativa</i> .....                             | 17 |
| 2.1.2 <i>Physcomitrella patens</i> .....                    | 17 |
| 2.1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                     | 18 |
| 2.2 Nutrição Mineral.....                                   | 20 |
| 2.2.1 Ferro como nutriente.....                             | 20 |
| 2.2.2 Zinco como nutriente.....                             | 20 |
| 2.3 Absorção de metais pesados pelas plantas.....           | 21 |
| 2.3.1 Absorção de ferro.....                                | 21 |
| 2.3.2 Absorção de zinco.....                                | 22 |
| 2.4 Famílias Gênicas.....                                   | 23 |
| 2.4.1 Genes ZIP.....  | 23 |
| 2.4.2 Genes FRO.....  | 23 |
| 2.4.3 Genes YSL.....  | 24 |
| 2.4.4 Genes NAS.....  | 24 |
| 2.4.5 Genes NRAMP.....                                      | 25 |
| 2.4.6 Ferritina.....  | 25 |
| 2.5 Marcadores Moleculares.....                             | 25 |
| 2.5.1 Microssatélites.....                                  | 26 |
| 2.5.2 Regiões EST e a transferência de marcadores.....      | 27 |
| 2.6 Sintenia.....   | 27 |
| 3 OBJETIVO DO TRABALHO.....                                 | 29 |
| 4 METODOLOGIA.....  | 30 |
| 4.1 Análises <i>in silico</i> .....                         | 30 |
| 4.1.1 Obtenção das sequências.....                          | 30 |
| 4.1.2 Identificação de motivos conservados.....             | 30 |
| 4.1.3 Busca de Microssatélites e prospecção de primers..... | 31 |
| 4.2 Análises <i>in vitro</i> .....                          | 31 |
| 4.2.1 Extração de DNA.....                                  | 31 |
| 4.2.2 Análise Molecular.....                                | 32 |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 4.2.3 Corrida Eletroforética..... | 32 |
| 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....     | 33 |
| 5.1 MEME e TOMTOM.....            | 33 |
| 5.2 SSRLOCATOR .....              | 34 |
| 5.3 Análise Molecular.....        | 35 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....       | 40 |
| ANEXO.....                        | 41 |
| REFERÊNCIAS.....                  | 44 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados constituem um dos poluentes mais tóxicos a vida, pois são reativos e bioacumuláveis, ficando retidos no ecossistema podendo causar alterações na flora e fauna. Podem ocorrer naturalmente, e são essenciais para o crescimento das plantas. No entanto, as atividades humanas têm introduzido altas cargas desses elementos no ambiente pela contaminação das águas e do solo causando estresse nas plantas, que estão sob influência de tais metais (SANTOS et al., 2004).

Diversos mecanismos evoluíram para controlar a concentração e o estado em diferentes elementos que se encontram dentro da célula, de forma a direcionar as reações metabólicas e impedir interações que causem dano ao organismo. Entre esses elementos essenciais encontramos metais como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni), manganês (Mn) e cobalto (Co) (CLEMENS, 2006). As propriedades físico-químicas desses elementos de transição permitem diversas reações metabólicas, como transferência de elétrons e a oxidação de moléculas. Essas mesmas propriedades fazem com que os metais sejam potencialmente tóxicos ao interagir sem controle e danificando elementos da célula. Por esse motivo, um organismo vivo precisa de diversos mecanismos para manter a homeostase correta de cada um desses elementos (DUPONT et al., 2010).

Com o avanço da bioinformática e utilização de programas que envolveram estatística e biologia molecular (PROSDOCIMI et al., 2002), é possível identificar se os genes são expressos ou reprimidos através da interação com proteínas reguladoras, estas proteínas ligam-se a montante às regiões reguladoras dos genes de modo a atrair ou bloquear a ação da RNA polimerase, as proteínas reguladoras ligam-se a uma pequena sequência de DNA – MOTIVO (*Transcription Factor Binding Site - TFBS*), que são regiões altamente conservadas através de um subconjunto de proteínas que compartilham a mesma função, tal conservação, é devido principalmente a mais elevada pressão de seleção (GIBAS et al., 2001).

A prospecção de genes está intimamente ligada à bioinformática, uma ferramenta imprescindível para a análise massiva de dados biológicos, que permite identificar genes de interesse a partir da conjugação de várias áreas da ciência e dados disponibilizados de projetos de sequenciamento de DNA e proteína (BINNECK, 2004). A análise das sequências do gene e o estudo de filogenia são

importantes para compreender a história evolutiva de um gene e, ajudar no desenvolvimento de iniciadores (primers) para futuros estudos do gene e de sintonia entre espécies modelo para monocotiledôneas (*Oryza sativa* L.), espécies basais *Physcomitrella patens* Hedw. Bruch & Schimp. e espécies modelo, como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

O processo de seleção de genótipos resistentes pelas técnicas convencionais é relativamente demorado e de execução laboriosa, além de não possuir muita garantia devido à dependência de condições ambientais adequadas. Técnicas biotecnológicas, como os marcadores moleculares são de grande utilidade, principalmente no processo de caracterização e seleção de genótipos resistentes. A seleção assistida por marcadores moleculares que consiste na incorporação de informações dos marcadores moleculares na seleção de genótipos (SAM), é rápida e segura, sendo na atualidade, de fundamental importância para o processo de melhoramento genético (DEMORE, 2008).

A utilidade do melhoramento genético é baseada em encontrar fortes ligações entre estes marcadores e os genes de interesse. Tais ligações permitem a inferência da presença do gene desejado através da identificação do marcador. Dessa forma, a seleção assistida por marcadores moleculares é uma poderosa ferramenta para a seleção indireta de caracteres que apresentam dificuldade de observação, podendo acelerar a seleção das novas gerações e facilitar os processos de melhoramento de plantas (TANKSLEY et al., 1989).

Neste contexto, este estudo tem como objetivo prospectar marcadores moleculares através da identificação de motivos conservados em genes relacionados com o metabolismo de metais pesados em plantas, utilizando estes marcadores em testes *in vivo*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Plantas como modelos de estudo

#### 2.1.1 *Oryza sativa* L.

O arroz (*Oryza sativa* L.) (Figura 1) pertence à divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, tribo Oryzeae, família Poaceae, subfamília Oryzoideae e ao gênero *Oryza* (WATANABE, 1997). O arroz destaca-se também por ser uma planta modelo para estudos moleculares da família Poaceae devido ao pequeno tamanho de seu genoma 430 Mbp (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991), facilidade na manipulação genética e molecular, similaridade genômica com outras monocotiledôneas, ampla disponibilidade de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), acesso a sequências genômicas e mapa molecular saturado, além disso, por sua importância econômica no Brasil e no mundo (DEVOS & GALE, 2000).

Figura 1- (A) Plantação de *Oryza sativa*, (B) Panícula de *Oryza sativa*.



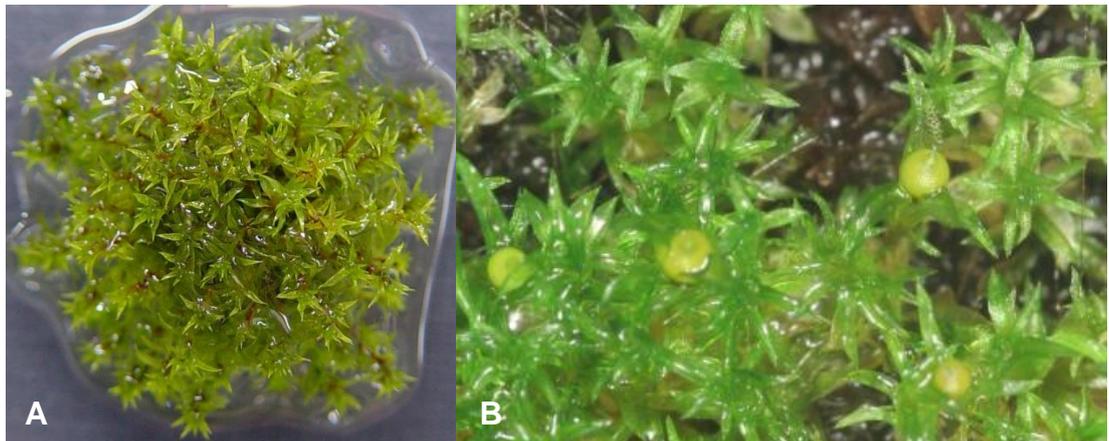
Fonte: (A) Fundacion Antana (B) Wikimedia Commons.

#### 2.1.2 *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.

O musgo *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. (Figura 2) é um importante organismo modelo de desenvolvimento. Como uma briófito, que representa uma planta terrestre, os primeiros representantes dos quais estavam

presentes, pelo menos, 350- 400 milhões de anos atrás (HUEBER, 1961). A fase do ciclo de vida predominante desses organismos é o gametófito haplóide. O genoma de *P. patens* foi sequenciado (RENSING et al., 2008), o organismo é transformável e pode integrar o DNA exógeno no seu genoma, por recombinação homóloga (SCHAEFER & ZRÝD, 1997). A capacidade de direcionar especificamente genes e substituí- los provou ser uma característica muito útil deste organismo. Recentemente, *P. patens* foi usado em um grande número de estudos examinando a evolução das plantas, fisiologia e metabolismo (COVE, 2005; COVE et al., 2006).

Figura 2- (A) Gametófito de *Physcomitrella patens*, (B) Esporófito de *Physcomitrella patens*.



Fonte: (A) Agricultural University of Athens, (B) Eureka Alert.

### 2.1.3 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

A *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Figura 3) é uma planta da família Brassicaceae e possui muitos ecótipos, dentre estes, Columbia, Landsberg e Wassilewskija se destacam na sua utilização em pesquisas científicas (MEWIS et al., 2005; CHEN et al., 2006). Esta espécie possui uma vasta distribuição pela Europa, Ásia e América do Norte (ALONSO-BLANCO & KOORNNEEF, 2000; HOFFMANN, 2002).

*Arabidopsis thaliana* é uma das espécies de plantas mais estudadas no meio científico atual. Apesar de sua proximidade com outras espécies como nabo, repolho, couve, brócolos e colza, ela não possui importância econômica direta. *A. thaliana* é considerada uma planta daninha de pequena importância agrícola. Apesar disto, esta espécie vem sendo, há mais de 40 anos, o foco de muitas pesquisas na área da genética, bioquímica e fisiologia (DELATORRE & ALVES, 2008).

Uma das vantagens de *A. thaliana* em relação as demais plantas diz respeito ao porte da planta que é muito pequeno. Este fato possibilita crescer milhares de plantas em espaços reduzidos como casas de vegetação ou mesmo câmaras de crescimento. Esta planta pode ser cultivada inclusive em placas de Petri o que facilita muito o trabalho e a condução de um grande número de plantas ao mesmo tempo. Além disso, *A. thaliana* é uma espécie de reprodução rápida, autógama, com ciclo de vida curto e com grande produção de sementes, em torno de 5.000 por planta (MEINKE et al., 1998).

Figura 3- (A) Planta adulta de *Arabidopsis thaliana*, (B) Flor de *Arabidopsis thaliana*.



Fonte: (A) Moore Herbarium, (B) Developmental Biology Interactive

## 2.2 Nutrição Mineral

A nutrição mineral é um dos fatores mais importantes envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas. Os nutrientes se caracterizam em macro e micronutrientes, classificados dessa forma de acordo com a exigência nutricional da planta para cada elemento. Além dos macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg), as plantas precisam também de pequenas quantidades de micronutrientes (B, Cl, Cu, Mn, Fe, Zn, Mo), e algumas também precisam de Si, Co Se. Em contraste com os macronutrientes, os micronutrientes são apenas necessários em quantidades muito pequenas, enquanto a disponibilidade em altas concentrações resulta em efeitos prejudiciais (VIEIRA, 1999).

### 2.2.1 Ferro como Nutriente

Entre os micronutrientes, o ferro é de grande importância devido a sua utilização em vários processos fundamentais. Este é um elemento essencial para todos os organismos vivos, incluindo as plantas, pois desempenha papel importante uma vez que é parte integrante de diversas enzimas que participam de processos metabólicos como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de clorofila, entre outros (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O ferro representa um dos mais versáteis metais na biologia, sendo conhecido como um metal de transição, já que é capaz de receber e doar elétrons, ou seja, caracteriza-se pela facilidade em mudar seu estado de oxidação, permitindo sua participação em numerosas reações envolvendo a transferência de elétrons. As suas funções são baseadas nessa reação redox reversível dos íons de ferro  $Fe^{+2}$  (ferroso) e  $Fe^{+3}$  (férico), na sua habilidade de formar complexos octaédricos com vários ligantes e por variar seu potencial redox em resposta a diferentes ligantes (HELL & STEPHAN, 2003).

### 2.2.2 Zinco como Nutriente

O zinco é um dos oito micronutrientes essenciais para as plantas. Ele é o metal de transição mais abundante nos organismos depois do ferro, e é o único metal

representado em todas as seis classes de enzimas (BROADLEY et al., 2007). Em solução, contrastando com  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$ , o zinco existe num estado de oxidação +2 e é redox-estável sob condições fisiológicas (BARAK & HELMKE, 1993). Desse modo, o zinco, em sistemas biológicos, só existe na forma  $\text{Zn}^{+2}$  e não participa de reações de oxirredução (MASCHNER, 1995). As funções metabólicas do zinco são baseadas na forte tendência a formar complexos tetraédricos com os ligantes nitrogênio (N), oxigênio (O) e, principalmente, o enxofre (S) (MARET, 2005).

O papel do zinco como componente integral de diversas enzimas torna esse elemento crucial para vários processos metabólicos na planta, tais como a fotossíntese, síntese proteica, manutenção da integridade da membrana, metabolismo de auxina e reprodução. Uma das mais importantes do zinco está relacionada com a regulação da expressão gênica: vários fatores de transcrição dependem da presença do zinco para formar o motivo dedo-de-zinco, reconhecer as sequências específicas de DNA e ativar a transcrição (ALBERTS et al., 1998; BROWN, 2006).

## **2.3 Absorção de metais pesados pelas plantas**

### **2.3.1 Absorção de Ferro**

O metabolismo do ferro é um mecanismo complexo sob o balanço homeostático, representando dois problemas principais para as plantas: deficiência como consequência de problemas de solubilidade e toxicidade devido ao excesso de solubilidade em condições anaeróbicas (SANTOS & COSTA de OLIVEIRA, 2007).

Em condições de suficiência de ferro, as plantas reduzem  $\text{Fe}^{+3}$  e transportam o  $\text{Fe}^{+2}$ , resultante através da membrana plasmática via transportador de baixa afinidade, ainda não caracterizado em nível molecular (CURIE & BRIAT, 2003). Em condições de deficiência de ferro, as plantas desenvolveram diferentes estratégias para aumentar a captação deste nutriente. Respondem a deficiência de ferro pela indução de respostas direcionadas a aquisição do elemento da rizosfera, estando divididos em plantas de estratégia I (redução do excesso de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ ) e estratégia II (deficiência do  $\text{Fe}^{+3}$ ) (RÖMHELD, 1987; MARSCHNER & RÖMHELD, 1994).

A estratégia I é utilizada por dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas. Estas plantas aumentam a absorção sob deficiência de ferro através de

três reações (HELL & STHAN, 2003), i) excreção de prótons através de uma H<sup>+</sup>-ATPase específica da membrana plasmática para acidificar o pH da solução do solo e aumentar a solubilidade do Fe<sup>+3</sup>; ii) redução do Fe<sup>+3</sup> pela enzima Fe<sup>+3</sup>quelatoredutase (FRO, *Ferric Reductase oxidase*) a uma forma mais solúvel Fe<sup>+2</sup>; iii) transporte do Fe<sup>+2</sup> para a raiz através de um transportador específico (IRT1, *Iron Regulated Transporter*) (RÖMHELD & MARSCHNER, 1986; MARSCHNER & RÖMHELD, 1994; EIDE et al., 1996; SANTOS & COSTA de OLIVEIRA, 2007).

Nas plantas de estratégia II, desenvolvidas em gramíneas monocotiledôneas incluindo arroz, milho e trigo, similarmente aos microrganismos, utilizam uma estratégia de quelação para aquisição do Fe do solo. Estas plantas liberam compostos de baixo peso molecular, conhecidos como fitosideróforos (PS), os quais são aminoácidos não proteicos sintetizados a partir da metionina, compostos por uma família de ácidos mugineicos (Mas) que inclui os ácidos mugineico (MA), 2'-deoximugineico (DMA), 3-epihidroximugineico (epi-HMA) e 3-epihidroxi 2'-deoximugineico (epi-HDMA) (CURIE & BRIAT, 2003). Estes compostos apresentam alta afinidade e propriedades minerais quelantes, assim se ligam eficientemente ao Fe<sup>+3</sup> na rizosfera, formando o complexo estável Fe<sup>+3</sup>-PS (TAKAGI et al., 1984; ROBERTS et al., 2004). Estes complexos são reconhecidos e transportados para o interior das células da raiz por transportadores específicos (YS1, YellowStripe1) (MORI, 1991), ou seja, o complexo é absorvido sem necessidade de redução extracelular, e usado como uma fonte de ferro na planta (HELL & STEPHAN, 2003; RÖMHELD & MARSCHNER, 1986).

### 2.3.2 Absorção de Zinco

Em condições de suficiência de Zn, acredita-se que a maioria do Zn seja obtida como cátion monovalente (ZnOH<sup>+</sup>) (MARSCHER, 1995). Em comparação com as respostas à deficiência de Fe, pouco se sabe sobre os detalhes moleculares da aquisição de Zn a partir do solo em condições de deficiência desse metal. A proteína AtIRT1 de *A. thaliana* é capaz de transportar Zn<sup>+2</sup>, e mutantes IRT1 têm níveis reduzidos de Zn na raiz quando sob deficiência de Fe (VERT et al., 2002). Contudo, a expressão de AtIRT1 não é induzida por deficiência de Zn e mutantes ITR1 não

têm o fenótipo selvagem recuperado por aplicação exógena de Zn em excesso, com isso se acredita que o Zn é capturado primariamente por outros transportadores ainda não caracterizados (WALKER & CONNOLLY, 2008).

## 2.4 Famílias Gênicas

Existem várias famílias gênicas envolvidas na homeostase de ferro em plantas. Estes genes têm sido estudados em várias espécies de plantas e importantes avanços foram feitos, buscando a elucidação dos mecanismos. Entre as principais famílias gênicas estão:

### 2.4.1 Genes ZIP (*Zrt/Irt-related Proteins*)

Os genes ZIP codificam para proteínas que atuam no transporte de Zn (*ZRT-zinc Regulated Transporter*) e  $Fe^{2+}$  (*IRT-Iron Regulated Transporter*). IRT1 é um transportador específico de  $Fe^{2+}$  (EIDE et al., 1996), sendo considerado o mais importante de raízes (CONNOLLY et al., 2002). Além disso, IRT1 é também responsável por absorver  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , e  $Co^{2+}$  (CURIE & BRIAT, 2003). Outro membro da família gênica ZIP é IRT2, um homólogo de IRT1, presente em células epidérmicas das raízes de *A. thaliana* responsável pelo transporte de  $Fe^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (CURIE & BRIAT, 2003).

### 2.4.2 Genes FRO (*Ferric Reductase Oxidase*)

O gene FRO codifica para a enzima  $Fe^{3+}$  quelato redutase presente nas células epidérmicas, é responsável pela redução do  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , etapa importante no processo de absorção desse micronutriente, em plantas de estratégia I (YI & GUERINOT, 1996).

Em *A. thaliana* são encontrados oito membros dessa família de genes. Essas proteínas estão amplamente expressas dentro do vegetal, sugerindo a participação das proteínas FRO na redução do Fe nos diferentes tecidos da planta. AtFRO2 é expresso predominantemente nas células epidérmicas de raízes sob deficiência de

ferro parece ser o principal responsável pela atividade da enzima neste órgão (ROBINSON et al., 1999; CONNOLLY et al., 2002). De acordo com o último autor, a super expressão de AtFRO2 confere à planta a capacidade de crescer em baixas concentrações de ferro. A expressão de AtFRO3 é induzida em folhas de plantas sob deficiência de ferro. AtFRO5, AtFRO6, AtFRO7 e AtFRO8 parecem atuar na parte aérea da planta para reduzir o íon férrico (WINTZ et al., 2003).

### **2.4.3 Genes YSL (*Yellow Stripe Like*)**

As gramíneas utilizam a estratégia II de absorção em situação de deficiência de ferro. Esta estratégia consiste na liberação de fitosideróforos (PS) no solo pelas raízes das plantas, onde são complexados com  $\text{Fe}^{3+}$ -PS via um transportador específico do tipo YSL1 (*Yellow Stripe-like transporter*), sem necessidade de redução extracelular (CURIE et al., 2001).

Plantas com estas proteínas podem aumentar a biossíntese e a secreção de PS em resposta à deficiência de ferro. Diferentes espécies de gramíneas produzem diferentes tipos de e quantidades de PS. A quantidade de PS liberada no solo correlaciona com a habilidade da planta em tolerar a deficiência de ferro (MORI et al., 1991).

### **2.4.4 Genes NAS (*Nicotianamina sintase*)**

A Nicotianamina (NA), um quelante de metais que é ubíqua em plantas superiores. Em gramíneas, fitosideróforos são liberados na rizosfera das raízes de plantas sob deficiência de ferro, com o objetivo de aumentar a absorção de ferro. Estes compostos são ácidos muginêicos e apresentam alta afinidade e propriedades minerais quelantes, assim se ligam eficientemente ao  $\text{Fe}^{3+}$  na rizosfera, formando o complexo estável  $\text{Fe}^{3+}$ -PS (TAGAKI et al., 1984; ROBERTS et al., 2004), que pode ser absorvidos por transportadores específicos (YSL1) (MORI et al., 1991), sem necessidade da redução extracelular. NA é precursora de fitosideróforos, e desta forma é um componente crucial para a aquisição de ferro.

A família gênica NAS está envolvida na síntese de nicotianamina (NA), precursora e essencial na síntese de ácidos muginêicos. A nicotianamina pode se

ligar à vários metais, dentre eles  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , mas não é secretada, sugerindo uma provável participação no transporte intra e extracelular de metais em espécies tanto de estratégia I como de estratégia II (KIM & GUERINOT, 2007).

#### **2.4.5 Genes NRAMP (*Natural Resistance- Associated Macrophage Protein*)**

O NRAMP constitui uma família de proteínas de membrana integral altamente conservada envolvida com o transporte de ferro em diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (CELLIER et al., 1995). Estes genes são amplamente distribuídos em todas as famílias de plantas, atuando principalmente no transporte de cátions bivalentes (CURIE & BRIAT, 2003). A primeira ocorrência de genes NRAMP foram identificados em mamíferos (NRAMP1), que codifica uma proteína de membrana do macrófago responsável pela concentração de cátion no fagossoma, regulando a regulação bacteriana (WILLIAMS et al., 2000).

#### **2.4.6 Ferritina**

As ferritinas são uma classe de proteínas armazenadoras de ferro altamente conservadas e distribuídas, sendo encontradas em plantas, animais, fungos e bactérias (BRIAT & LOBREAUX, 1997). Estas proteínas são capazes de armazenar mais de 4.500 átomos de ferro na cavidade central de sua estrutura (HARRISON & AROSIO, 1996; LIU & THEIL, 2005), de uma forma solúvel e biodisponível (BRIAT et al., 1999), sendo um importante mecanismo para evitar o estresse oxidativo (BRIAT & LOBREAUX, 1997). Em plantas, ferritina ocorre principalmente em plastídeos, mas há também evidências de que esteja presente em mitocôndrias (ZANCANI et al., 2004).

### **2.5 Marcadores Moleculares**

Os marcadores moleculares são definidos como sendo “marcadores genéticos baseados num conjunto de marcadores que podem detectar polimorfismo de DNA em nível de um loco específico e no nível completo do DNA” (VARSHNEY et al., 2005).

### 2.5.1 Marcadores Microsatélites

Microsatélites são sequências de DNA formadas pela disposição em série de nucleotídeos repetidos em arranjos formados entre dois e seis pares de bases (MORGANTE & OLIVIERI, 1993).

Os marcadores microsatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficos atualmente. Este polimorfismo é gerado pela perda ou ganho de sequências repetidas mais provavelmente através do ganho. Este fenômeno não é ainda completamente entendido, porém acredita-se que esta expansão ocorra durante a replicação. Os SSRs são inerentemente instáveis e os modelos que têm sido propostos para explicar a geração de microsatélites e instabilidade são o deslizamento da DNA polimerase (*slippage*). Através da atividade exonucleásica de *proofreading* 3'→5' da DNA polimerase, são formados *hairpins* fazendo com que a enzima replique a mesma região duas vezes e a recombinação desigual entre cromossomos homólogos, e estes são cada vez mais desvendados. As taxas de mutação variam de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-6</sup> (HOELZEL & HOELZEL, 1998). Apesar de suas altas taxas evolutivas, os microsatélites são conservativos em suas regiões flangeadoras e podem persistir por um longo período sem modificações (ZARDOYA et al., 1996).

Os marcadores SSR são úteis para uma variedade de aplicações na genética e melhoramento de plantas, devido sua reprodutibilidade, relativa abundância e uma boa cobertura do genoma. Tendo diversas aplicações, tais como: genômica funcional, mapeamento associado, análises de diversidade, mapeamento genômico, transferabilidade e mapeamento comparativo. De um modo geral, as *Expressed Sequence Tag* (EST) têm gerado projetos com grande quantidade de dados de sequências disponíveis publicamente para várias espécies de plantas; estes dados podem ser extraídos de *Simple Sequence Repeats* (SSRs). Estes SSRs são úteis como marcadores moleculares, pois desenvolvê-los tem um baixo custo financeiro, eles representam genes transcritos e funções putativas que podem ser frequentemente deduzidas por pesquisas de homologias. Claramente a mais significativa aplicação de EST-SSR é para mapeamento comparativo, com bons exemplos em gramíneas e espécies de leguminosas. Um banco de dados de EST-SSR com pares de primers que se amplificam em locus ortólogos entre espécies e que são uniformemente distribuídos nos genomas de arroz, *A. thaliana*, sendo muito

úteis para o melhoramento genético, especialmente diminuindo custos com espécies cultivadas. O desenvolvimento de marcadores com alelos específicos para genes de importância agronômica são fundamentais para o avanço da ciência e melhoramento de plantas (VARSHNEY et al., 2005).

### **2.5.2 Regiões EST e a transferência de marcadores**

Muitas vezes, ao invés de ser realizado o sequenciamento genômico de um organismo eucarioto, prefere-se realizar o sequenciamento só das regiões gênicas, utilizando informações oriundas de RNA mensageiro (mRNA). Dessa forma é realizada uma biblioteca de cDNA, representando o conjunto de mRNAs de uma célula, que são clonados em vetores plasmidiais. Os insertos de cDNA presentes em tais vetores são então sequenciados a partir de suas extremidades 5' ou 3' produzindo pequenas sequências que irão representar pedaços dos genes expressos no momento da extração do mRNA da célula em questão. Esses pedaços sequenciados representam etiquetas de genes expressos, ou ESTs (*Expressed Sequence Tags*) e uma análise dos genes expressos é uma abordagem bastante utilizada na tentativa de entender o funcionamento do metabolismo dos mais diversos organismos. Em um trabalho realizado transferindo marcadores EST-SSR entre cereais e uma gramínea, durante as duas últimas décadas, um largo número de ESTs foram gerados nos bancos de dados públicos. Essas sequências são um excelente recurso para o desenvolvimento de marcadores moleculares (PROSDOCIMI et al., 2002; SIM et al., 2009).

### **2.6 Sintenia**

A sintenia é caracterizada pela conservação na ordem e no conteúdo de genes, ou grupos gênicos, entre espécies relacionadas. Essa característica também é denominada colinearidade, e poderá ser altamente informativa para estudos comparativos de função, ação e regulação gênica entre diferentes genomas. Embora não seja uma condição estável, pois a sintenia pode ser perdida no decorrer da evolução, vários trabalhos evidenciam a importância das regiões cromossômicas

conservadas para estudios genéticos comparativos (BENNETZEN et al., 1998; GALE & DEVOS, 1998; DEVOS et al., 1999; FEUILLET & KELLER, 2002).

### **3 OBJETIVO DO ESTUDO**

Prospectar marcadores moleculares através da identificação de motivos conservados em genes relacionados com o metabolismo de metais pesados em plantas, utilizando estes marcadores em testes *in vivo*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Análises *in silico*

#### 4.1.1 Obtenção das sequências

As sequências utilizadas neste estudo foram selecionadas usando o número de acesso GenBank fornecido por Victoria et al. (2012), de diferentes espécies representativas de plantas, sendo elas *Oryza sativa* L., *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch&Schimp. e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

De acordo com o número de acesso GenBank, foi feito o download das sequências no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), estas foram salvas em formato FASTA e separadas de acordo com sua família gênica, totalizando setenta e seis sequências, sendo vinte sequências da família gênica DRAFT, três sequências da família gênica FRO, três sequências da família gênica IRT, vinte e seis sequências da família gênica YSL, cinco sequências da família gênica ZIP, cinco sequências da família gênica NAS e quatorze sequências da família gênica RAMP.

#### 4.1.2 Identificação de Motivos Conservados

Para a busca de motivos conservados foi utilizado um programa *online* nomeado por *Multiple Em For Motif Elicitation* (MEME), para que a análise seja feita é necessário informar um e-mail e selecionar o arquivo com as sequências desejadas, será feita uma análise para cada família gênica separadamente.

Através de uma ferramenta do MEME, foi possível encontrar a função de cada motivo conservado, essa ferramenta é nomeada *Motif Comparison Tool* (TOMTOM). Para fazer a análise no TOMTOM, alguns parâmetros devem ser levados em consideração, como a escolha do banco de dados que os motivos obtidos serão comparados, o banco de dados utilizado foi JASPAR core (2014) plantas).

### 4.1.3 Busca de Microssatélites e Prospecção de primers

Foi utilizado o programa SSRLOCATOR para a busca dos microssatélites e, posteriormente foi feito a prospecção dos primers.

## 4.2 Análises *in vitro*

### 4.2.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído por meio do kit de extração de DNA da Norgen seguindo o protocolo do fabricante. Utilizou-se 50 mg de tecido oriundo de amostras foliares de cada uma das espécies coletadas *in situ* na cidade de São Gabriel, RS. O DNA foi purificado e conservado à -20°C.

Tabela 1: Espécies de plantas utilizadas para extração de DNA.

| <b>Espécies</b>                         |
|---|
| <i>Fragaria vesca</i> L.                |
| <i>Lolium multiflorum</i> Lam.          |
| <i>Oryza sativa</i> L.                  |
| <i>Persea americana</i> Mill.           |
| <i>Physcomitrium acutifolium</i> Broth. |
| <i>Polytrichum juniperinum</i> HEDW.    |
| <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch       |
| <i>Solanum lycopersicum</i> L.          |
| <i>Zea mays</i> Kuntze                  |

Fonte: Autor, 2014.

#### 4.2.2 Análise Molecular

A análise molecular realizou-se através de reações em cadeia da polimerase (PCR). A reação conteve volume final 13  $\mu$ l, utilizando 6 $\mu$ l de GOTAQ contendo oligonucleotídeos iniciadores, *Taq* DNA Polimerase, dNTPmix, MgCl, tampão de enzima. Além de 4 $\mu$ l de DNA, 1,25 $\mu$ l de cada primer e 1,75 $\mu$ l de água MiliQ®.

Tabela 2: Condições de termociclagem.

| Condições PCR     | Temperatura (C°) | Tempo (s) |
|-------------------|------------------|-----------|
| Desnaturação      | 95               | 120       |
| Desnaturação      | 95               | 60        |
| Hibridização      | 55               | 30        |
| Elongamento       | 72               | 120       |
| GOTO 2 repetições |                  | 34 ciclos |
| Elongamento       | 72               | 300       |
| Hold              | 4                |           |

Fonte: Autor, 2014.

#### 4.2.3 Corrida eletroforética

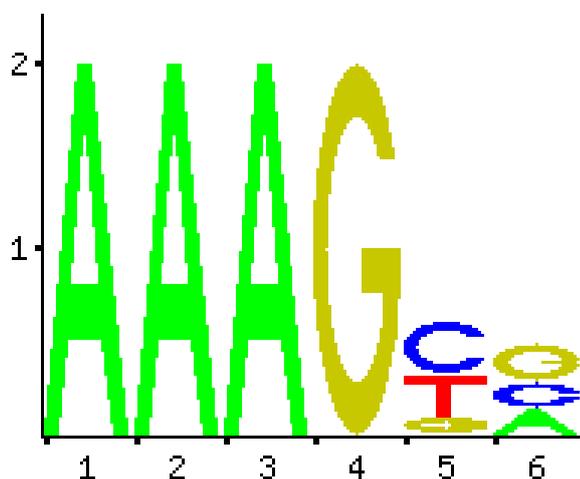
A avaliação foi realizada utilizando géis de agarose 3% a partir do produto da PCR. A solução foi vertida em suporte de acrílico horizontal. Após a polimerização do gel, adicionou-se tampão TBE 1X na cuba eletroforética e aplicou-se 4 $\mu$ L do produto de PCR com 2  $\mu$ L do corante GelRed®. Foi utilizado 4 $\mu$ l do marcador de peso molecular (ladder) 50 pb (concentração: 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l) e o marcador de peso molecular (ladder) 1kb (concentração: 500  $\mu$ g/ml) para identificação do tamanho dos produtos de PCR amplificados. Para a corrida eletroforética se utilizou uma voltagem de 150 Volts, na qual os fragmentos de DNA eletronegativos migram por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo da cuba eletroforética. Após aproximadamente 60 minutos de corrida eletroforética o resultado foi visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MEME e TOMTOM

O MEME é um modelo estatístico, bastante utilizado na identificação de regiões conservadas, em sequências de DNA e também de proteínas. TOMTOM consiste em um banco de dados de motivos conservados. A figura 4 mostra um motivo conservado do tipo *Zinc- coordinating*.

Figura 4- Motivo conservado.



Fonte: Autor, 2014.

Foram encontrados trinta e quatro motivos conservados relacionados com o metabolismo de metais pesados em plantas, todos do tipo *zinc- coordinating* (Tabela 3).

Metaloproteínas de zinco são uma das classes de proteínas mais abundantes e estruturalmente diversas, na natureza. Nestas proteínas, o Zn (II), possui um papel multifuncional que estabiliza a dobra de pequenos dedos de zinco, catalisa reações de enzimas essenciais de todas as seis classes ou auxilia na formação de oligômeros biológicos (LAITAOJA et al., 2013).

A partir destes resultados a próxima etapa, foi a prospecção dos primers no programa SSRLOCATOR.

Tabela 3: Motivos conservados relacionados com o metabolismo de metais pesados em plantas.

| <b>Família Gênica</b> | <b>N° de motivos conservados</b> | <b>Classe</b>             |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------|
| FRO                   | 9                                | <i>Zinc- coordinating</i> |
| IRT                   | 4                                | <i>Zinc- coordinating</i> |
| NAS                   | 5                                | <i>Zinc- coordinating</i> |
| RAMP                  | 6                                | <i>Zinc- coordinating</i> |
| YSL                   | 1                                | <i>Zinc- coordinating</i> |
| ZIP                   | 9                                | <i>Zinc- coordinating</i> |

Fonte: Autor, 2014.

## 5.2 SSRLOCATOR

A tabela 4 mostra os motivos que foram encontrados para cada uma das famílias gênicas.

Tabela 4- Motivos encontrados para cada família gênica.

| <b>Motivos</b> |            |            |             |            |            |
|----------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| <b>FRO</b>     | <b>IRT</b> | <b>NAS</b> | <b>RAMP</b> | <b>YSL</b> | <b>ZIP</b> |
| CCGCGT         | CTC        | TAAATT     | AGGCGG      | CGCCGG     | GCCACG     |
| GGC            | CACGGA     | GTTTTT     | CTT         | GCC        | GGT        |
| GCCGTC         | CCATCC     | GCC        | CAG         | CTTCCT     |            |
| CTGGCT         | TCT        | AACAAG     | TCGCCG      | CGTCGG     |            |
| CCCTGG         | GTGACT     | CACAAA     | CGG         | CGG        |            |
| GTGCTG         | TCACGC     | CTGAAT     | CCGCCA      | CGA        |            |
| GCGCCG         | TCT        | ACAAAA     | TGCTTT      | TGACGC     |            |
| TCCATG         | TTCACC     | TAAATT     | TGATCT      | TCGCCG     |            |
|                |            | GTTTTT     | ATGAAG      | CAT        |            |
|                |            | GCC        | GTGCCG      | GAAAC      |            |

Fonte: Autor, 2014.

Foram prospectados treze pares de primers EST-SSR. Os primers prospectados foram sintetizados e testados *in vivo* (Tabela 5).

Tabela 5- Primers prospectados neste trabalho.

| Nome              | Frente                 | Reverso               |
|-------------------|------------------------|-----------------------|
| 1- OS_NAS_GCC_1   | TGATCAACTCCGTCATC      | ATAATATAGTGCGTCTTTTCG |
| 2- OS_IRT_TCT_1   | G TTCAGGTCCCTCGAGATA   | GGCTGTTGTCCCTGTA      |
| 3- OS_NRAMP_CGA_  | GTCTCGATCTCGGACTT      | GAACAGCCACAGCTTC      |
| 4- ITS5           | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG | GCTGCGTTCTTCATCGATGC  |
| 5- OS_NAS_GCC_2   | TGATCAACTCCGTCATC      | ATAATATAGTGCGTCTTTTCG |
| 6- OS_IRT_TCT_2   | GTGCACTCAGTGGTGAT      | GTACACCCTGGTCAGC      |
| 7- ITS1           | TCCGTAGGTGAACCTGCGG    | TCCTCCGCTTATTGATATGC  |
| 8- OS_NAS3_GGA_   | GATCGAGAGAGAGAGATATGA  | GATCTTCTCAACCAACTTCT  |
| 9- OS_NRAMP_CTT_  | TTATACAATCATTATCGGCT   | GTTTCCTTACCCCATATCT   |
| 10- FM66          | TAGGATTTCAAGATCCTGC    | CCACAAATTTCACTACATTGA |
| 11- OS_NAS3_GA_   | ATCTCGTTGGTAATTAAGT    | AAGCAGTAACACTCAATAGC  |
| 12- OS_NRAMP_CAG_ | GTTCCCTAGACATCAAAATGA  | TTGTTTTACCTATCTTGTT   |
| 13- ITS2          | GCATCGATGAAGAACGCAGC   | GCTGCGTTCTTCATCGATGC  |

Fonte: Autor, 2014.

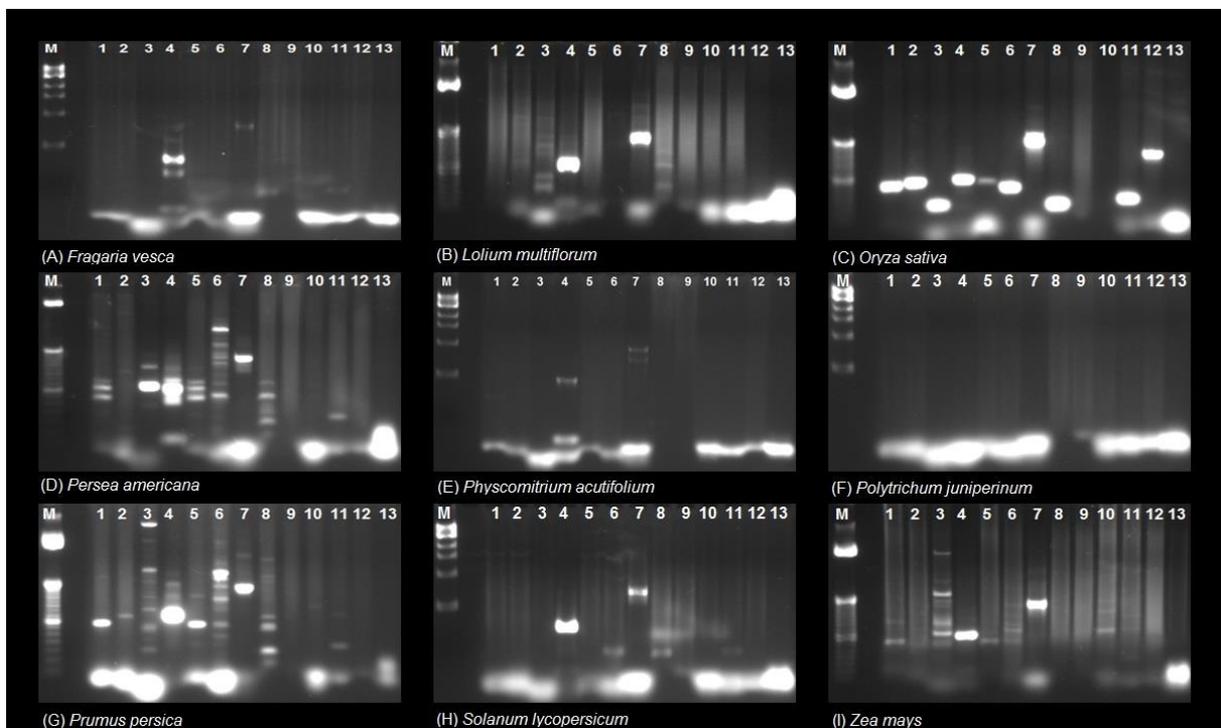
### 5.3 Análise molecular

É de interesse saber se estes motivos conservados estão amplamente distribuídos entre as espécies de plantas.

Foram testados treze pares de primers EST-SSR, em nove espécies de plantas. A figura 5 A, representa a espécie *Fragaria vesca*, mostra a amplificação de 7,7 % dos primers. Na figura 5 B, que representa a espécie *Lolium multiflorum*, mostra a amplificação de 15,4 % dos primers. Na figura 5 C, que representa a espécie *Oryza sativa*, mostra a amplificação de 69,24 % dos primers. Na figura 5 D, que representa a espécie *Persea americana*, mostra a amplificação 30,76% dos primers. Na figura 5 E, que representa a espécie *Physcomitrium acutifolium*, mostra a amplificação de 15,4 % dos primers. Na figura 5 F, que representa a espécie *Polytrichum juniperinum*, não houve amplificação. Na figura 5 G, que representa a espécie *Prunus persica*, mostra a amplificação de 38,46% dos primers. Na figura 5

H, que representa a espécie *Solanum lycopersicum*, mostra a amplificação de 15,4 % dos primers. E por fim na figura 5 I, que representa a espécie *Zea mays*, mostra a amplificação de 15,4 % dos primers. Estes resultados demonstram a ocorrência dos motivos testados e sua possibilidade de transferência entre espécies órfãs e espécies modelo, sendo que para os testes de transferência desses marcadores, foram utilizadas espécies de plantas coletadas *in situ* para a extração de DNA, contudo isso não se sabe a real situação de cada planta, se estavam ou não sob tal estresse, se não estiverem sofrendo estresse por meio de metais pesados é provável que estas regiões já façam parte do metabolismo normal destas plantas.

Figura 5- Eletroforese em gel de agarose 3%. (A) *Fragaria vesca*; (B) *Lolium multiflorum*; (C) *Oryza sativa*; (D) *Persea americana*; (E) *Physcomitrium acutifolium*; (F) *Polytrichum juniperinum*; (G) *Prumus persica*; (H) *Solanum lycopersicum*; (I) *Zea mays*. Foi utilizado marcador de 50 pb em, *Lolium multiflorum*, *Oryza sativa*, *Persea americana*, *Prumus persica* e *Zea mays*. E o marcador de 1kb em *Fragaria vesca*, *Physcomitrium acutifolium*, *Polytrichum juniperinum* e *Solanum lycopersicum*.



Fonte: Autor, 2014.

A tabela 6 mostra os número de amplificações por meio dos primers testados, os primers que amplificaram foram marcados com um X. O primer 1 amplificou em duas espécies de plantas, porcentagem de amplificação de 22,22 %. O primer 2 amplificou em uma espécie de planta, porcentagem de amplificação de 11,11 %. O primer 3 amplificou em duas espécies de planta, porcentagem de amplificação de 22,22 %. O primer 4 amplificou em oito espécies de planta, porcentagem de amplificação de 88,88 %. O primer 5 amplificou em uma espécie de planta, porcentagem de amplificação de 11,11 %. O primer 6 amplificou em três espécies de planta, porcentagem de amplificação de 33,33 %. O primer 7 amplificou em sete espécies de planta, porcentagem de amplificação de 77,77 %. O primer 8 amplificou em uma espécie de planta, porcentagem de amplificação de 11,11 %. O primer 9 não amplificou em nenhuma das espécies testadas. O primer 10 não amplificou em nenhuma das espécies testadas. O primer 11 amplificou em uma espécie de planta, porcentagem de amplificação de 11,11 %. O primer 12 amplificou em uma espécie de planta, porcentagem de amplificação de 11,11 %. O primer 13 não amplificou em nenhuma das espécies testadas. Os primers que tiveram a maior porcentagem de amplificação entre as espécies testadas, foram os primers 4 e 7.

Tabela 6- Amplificações com os primers prospectados neste trabalho.

| <b>Espécie</b>         | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>F. vesca</i>        |          |          |          | X        |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| <i>L. multiflorum</i>  |          |          |          | X        |          |          | X        |          |          |           |           |           |           |
| <i>O. sativa</i>       | X        | X        | X        | X        |          | X        | X        | X        |          |           | X         | X         |           |
| <i>P. americana</i>    |          |          | X        | X        |          | X        | X        |          |          |           |           |           |           |
| <i>P. acutifolium</i>  |          |          |          | X        |          |          | X        |          |          |           |           |           |           |
| <i>P. juniperinum</i>  |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |
| <i>P. persica</i>      | X        |          |          | X        | X        | X        | X        |          |          |           |           |           |           |
| <i>S. lycopersicum</i> |          |          |          | X        |          |          | X        |          |          |           |           |           |           |
| <i>Z. mays</i>         |          |          |          | X        |          |          | X        |          |          |           |           |           |           |

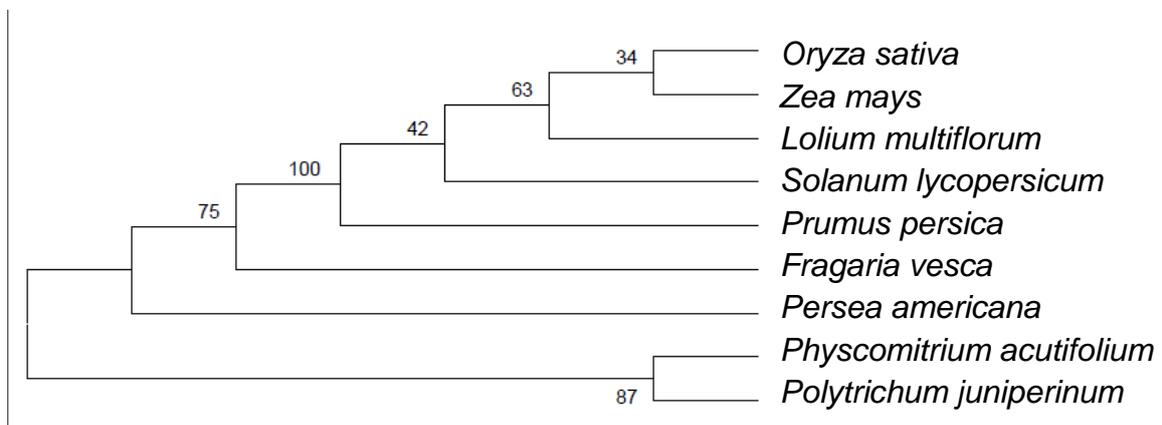
Fonte: Autor, 2014.

As espécies que mais se distanciaram filogeneticamente das demais foram *P. acutifolium* e *P. juniperinum* (Figura 6).

*F. vesca* representante da Classe Magnoliopsida, Família Rosaceae. *L. multiflorum* representante da Classe Liliopsida, Família Poaceae. *O. sativa* representante da Classe Liliopsida, Família Poaceae. *P. americana* representante da Classe Magnoliopsida, Família Lauraceae. *P. acutifolium* representante da Classe Bryopsida, Família Funariaceae. *P. juniperinum* representante da Classe Polytrichopsida, Família Polytrichaceae. *P. persica* representante da Classe Magnoliopsida, Família Rosaceae. *S. lycopersicum* representante da Classe Magnoliopsida, Família Solanaceae. *Z. mays* representante da Classe Liliopsida, Família Poaceae.

Assim, pode-se inferir que apesar da possibilidade de transferência diminuir com o aumento da distância filogenética, o genoma pode possuir alta taxa de conservação de sequências repetidas entre classes distintas (VARSHNEY et al., 2005).

Figura 6- Árvore filogenética das espécies utilizadas neste trabalho.



Fonte: Autor, 2015.

Calcula-se que em humanos, um microssatélite seja encontrado a cada 6 Kb, principalmente nos braços cromossômicos (BECKMANN; WEBER, 1992). Segundo Morgante e Olivieri (1993), em plantas foram pesquisadas 34 espécies e suas sequências para repetições de dinucleotídeos e trinucleotídeos, sendo encontrada uma frequência de um microssatélite a cada 50 Kb. Nesse mesmo contexto,

segundo Maughan et al., (1995), foi observado um microsatélite, aproximadamente, a cada 64 Kb em monocotiledôneas e um a cada 21 Kb em dicotiledôneas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas desenvolveram, no decorrer da evolução, inúmeros mecanismos de respostas específicas a estresses variados. Estes organismos conseguem alterar o seu plano de desenvolvimento para contornar situações desfavoráveis, como fatores abióticos impróprios. Além disso, podem contar com um arsenal de defesas constitutivas que já fazem parte do seu metabolismo normal.

O auxílio da bioinformática tanto na busca e qualidade bem como na interpretação dos resultados gerados de microssatélites, facilita o desenvolvimento de primers desenhados, influenciando diretamente na eficácia do marcador e no tempo para sua construção.

A partir dos resultados obtidos é possível inferir que os motivos se mantêm conservados em algumas regiões nas espécies de plantas testadas. A transferência de marcadores EST- SSR foi realizada com sucesso, apesar da possibilidade da transferência diminuir com o aumento da distância filogenética, o genoma destas espécies pode possuir alta taxa de conservação em algumas regiões. O desenvolvimento de marcadores moleculares tem oferecido perspectivas para o melhoramento visando a resistência a estresses variados.

**ANEXO A- Sequências de DNA utilizadas neste trabalho para as análises  
*in silico*.**

**Cópias homólogas de famílias gênicas para ferro captado.**

| <b>Sequência</b>         | <b>Espécie</b>               | <b>CDS Size</b> | <b>Sequência acesso</b> |
|--------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------|
| <b>OsFRO2</b>            | <i>Oryza Sativa</i>          | 1587            | AB126085                |
| <b>OsFRO1</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2277            | AB126084                |
| <b>PhyFRO1</b>           | <i>Physcomitrella patens</i> | 2286            | XM_001759823            |
| <b>PHY82658</b>          | <i>Physcomitrella patens</i> | 1662            | XM_001768649            |
| <b>PHY173734</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 2349            | XM_001786041            |
| <b>PHY165498</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 2283            | XM_001767084            |
| <b>PHY163308</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | <b>2406</b>     | XM_001762353            |
| <b>PHY115851</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 2001            | XM_001754526            |
| <b>OsIRT1</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | <b>1105</b>     | AB070226                |
| <b>OsIRT2</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 1113            | AB126086                |
| <b>PHYPADRAFT_139457</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | 1128            | XM_001772897            |
| <b>PHYPADRAFT_110147</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | <b>993</b>      | XM_001771879            |
| <b>PHYPADRAFT_104780</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | <b>1104</b>     | XM_001754540            |
| <b>PHYPADRAFT_68566</b>  | <i>Physcomitrella patens</i> | <b>1056</b>     | XM_001755753            |
| <b>AtIRT2</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 774             | AT4G19680               |
| <b>AtZIP12</b>           | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1068            | AT5G62160               |
| <b>AtZIP10</b>           | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1095            | AT1G31260               |
| <b>AtZIP9</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1035            | AT4G33020               |
| <b>AtZIP7</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1098            | AT2G04032               |
| <b>AtZIP6</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1025            | AT2G30080               |
| <b>OsNAS1</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 999             | AB046401                |
| <b>OsNAS2</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 978             | AB046401                |
| <b>OsNAS3</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 1032            | AB023819                |
| <b>PHYPADRAFT_150995</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | 957             | XM_001782185            |
| <b>PHYPADRAFT_215944</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | 1449            | XM_001770047            |
| <b>AtNAS2</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 963             | AT5G56080               |
| <b>AtNAS3</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 963             | AT1G09240               |
| <b>OSNRAMP1</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1554            | DQ431468                |
| <b>OSNRAMP2</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1395            | L81152                  |
| <b>OSNRAMP3</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1653            | U60767                  |
| <b>OSNRAMP4</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1638            | NM_001052329            |
| <b>OSNRAMP5</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1617            | NM_001065847            |
| <b>OSNRAMP6</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1527            | NM_001049674            |

|                          |                              |      |                |
|--------------------------|------------------------------|------|----------------|
| <b>OSNRAMP7</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1626 | NM_001073667   |
| <b>OSNRAMP8</b>          | <i>Oryza sativa</i>          | 1608 | NM_001057173   |
| <b>ATNRAMP1</b>          | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1599 | AF165125       |
| <b>ATNRAMP2</b>          | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1593 | NM_103618      |
| <b>ATNRAMP3</b>          | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1530 | NM_127879      |
| <b>ATNRAMP4</b>          | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1539 | NM_126133      |
| <b>ATNRAMP5</b>          | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1593 | NM_117995      |
| <b>ATNRAMP6</b>          | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1584 | NM_101464      |
| <b>PHY158431</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 1605 | XM_001751394   |
| <b>PHY111375</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 1785 | XM_001751703   |
| <b>PHY137658</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 1602 | XM_001771546   |
| <b>PHY179667</b>         | <i>Physcomitrella patens</i> | 1542 | XM_001759309.1 |
| <b>AtYSL1</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2022 | AT4G24120      |
| <b>AtYSL2</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 1995 | AT5G24380      |
| <b>AtYSL3</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2028 | AT5G53550      |
| <b>AtYSL4</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2013 | AT5G41000      |
| <b>AtYSL5</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2145 | AT3G17650      |
| <b>AtYSL6</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2031 | AT3G27020      |
| <b>AtYSL7</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2067 | AT1G65730      |
| <b>AtYSL8</b>            | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2175 | AT1G48370      |
| <b>OsYSL1</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2127 | NM_001049074   |
| <b>OsYSL2</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2025 | AB164646       |
| <b>OsYSL3</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 1923 | AB190913       |
| <b>OsYSL4</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2061 | AB190914       |
| <b>OsYSL5</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2172 | AB190915       |
| <b>OsYSL6</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2037 | AB190916       |
| <b>OsYSL7</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2052 | AB190917       |
| <b>OsYSL8</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 2085 | AB190918       |
| <b>OsYSL9</b>            | <i>Oryza sativa</i>          | 1974 | AB190919       |
| <b>OsYSL10</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2061 | AB190920       |
| <b>OsYSL11</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2139 | AB190921       |
| <b>OsYSL13</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2175 | AB164644       |
| <b>OsYsl12</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2151 | AB190922       |
| <b>OsYSL14</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2184 | AB164645       |
| <b>OsYSL15</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2019 | AB190923       |
| <b>OsYSL16</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2028 | AB190924       |
| <b>OsYSL17</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 1911 | AB190925       |
| <b>OsYSL18</b>           | <i>Oryza sativa</i>          | 2040 | AB190926       |
| <b>PHYPADRAFT_122023</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | 1986 | XM_001759493   |

|                          |                              |      |              |
|--------------------------|------------------------------|------|--------------|
| <b>PHYPADRAFT_111567</b> | <i>Physcomitrella patens</i> | 2004 | XM_001751891 |
| <b>PHYDRAFT_183406</b>   | <i>Physcomitrella patens</i> | 1143 | XM_001763955 |
| <b>PHYDRAFT_137950</b>   | <i>Physcomitrella patens</i> | 1185 | XM_001771773 |
| <b>PHYDRAFT_119828</b>   | <i>Physcomitrella patens</i> |      | XM_001757949 |

Fonte: VICTORIA et al.,2012.

## REFERÊNCIAS

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS. Disponível em: <http://www.aua.gr>. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

ALBERTS, I. L.; NADASSY, K. & WODAK, S. J. **Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures**. *Protein Science*, 7: 1700- 1716, 1998.

ALONSO-BLANCO, C. & KOORNNEEF, M. **Natural lyoccurring variation in *Arabidopsis*: anunder exploitedre source for plant genetics**. *Trends Plant Science* 1, 5: 22–29, 2000.

ARUMUGANATHAN K.; EARLE, E. D. **Nuclear DNA content of some important plant species**. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v. 9, n. 3, p. 208-218, 1991.

BARAK, P. & HELMKE, P.A. **The chemistry of zinc**. In: Robson, A.D., ed. **Zinc in soil and plants**. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer AcademicPublishers, p.1-13, 1993.

BECKMANN, J. S.; WEBER, J. L. **Survey of human and rat microsatellites**. *Genomics*, v. 12, p. 627-631, 1992.

BENNETZEN, J. F.; SAN MIGUEL, P.; CHEN, M.; TIKHONOV, A.; **Grass genomes**. *Proceedings of the National Academy of Science*. v. 95, pp. 1975- 1978, 1998.

BINNECK, E. **As ômicas: integrando a bioinformática**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, n° 32, 2004.

BORÉM, A. & VIEIRA, M.L.C. **Glossário de biotecnologia**. Universidade Federalde Viçosa, Viçosa, 183p, 2005.

BRIAT, J. F.; LOBREAUX, S. **Iron transport and storage in plants**. *Trends in Plant Science*. 2: 187- 193, 1997.

BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; HAMMOND, J.P.; ZELKO, I. & LUX, A. **Zinc in plants**. *New Phytologist*, 173: 677- 702, 2007.

BROWN, T. **A. Genomes**. 3 rd edition. Garland Science, Machester, 2006.

CELLIER, M.; PRIVÉ, G.; BELOUCHI, A.; KWAN, T; RODRIQUES, V.; CHIA, W.; GROS P. **Nramp defines a family of membrane proteins**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:10089-10093, 1995.

CHEN, M.J. *et al.* **Dela yed flowering, na Arabidopsis gene that acts in the autonomous flowering promotion pathwa yandis required for normal development**. *Journal of Integrative Plant Biology*1, 48:27-34, 2006.

CLEMENS, S. **Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants**. *Biochimie* 88, 1707- 1719, 2006.

CONNOLLY, E. L.; FETT, J. P.; GUERINOT, M. L. **Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation**. *Plant Cell*. 14: 1347- 1357, 2002.

COVE D. J. **The moss *Physcomitrella patens***. *Annu Rev Genet* 39:339–358, 2005.

COVE, DJ.; BEZANILLA, M.; HARRIES, P.; QUATRANO, RS. **Mosses as model systems for the study of metabolism and development**. *Annu Rev Plant Biol* 57:497–520. 409, 346-349, 2006.

CURIE, C. & BRIAT, J. F. **Iron transport and signaling in plants**. *Annu. Ver. Plant Biol*. 54: 183- 206. 2003.

CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S. L.; BRIAT, J. F.; and WALKER, E. L. **Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake**. *Nature*. 409, 346-349, 2001. *Desenvolvimento, Brasília*, v. 5, n. 29, p. 12-25, dez./jan. 2001.

DELATORRE, Carla Andréa; SILVA, Adriano Alves da. ***Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel**. Rev. de Ciências Agrárias, Lisboa, v. 31, n. 2, dez. 2008 .

DEMORE, P.S. Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/m/3322.pdf> . Acesso em 24 de janeiro de 2015.

DEVELOPMENTAL BIOLOGY INTERACTIVE. Disponível em: <http://www.devbio.biology.gatech.edu>. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

DEVOS, K. M.; BELAËS, J.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T. **Arabidopsis- rice: will colinearity allow gene prediction across the eudicot- monocot divide**. Genome research. v. 9, pp. 825- 829, 1999.

DEVOS, K. M.; GALE, M .D. **Genome relationships: the grass model in current research**. **Plant Cell, Rockville**, v. 12, n. 5, p. 637-646, May 2000.

DUPONT, CL.; BUTCHER, A.; VALAS, RE.; BOURNE, PE. & CAETANO-ANOLLÉS, G. **History of biological metal utilization in ferred through phylogenomic analysis of protein structures**. ProcNatlAcadSci USA 107, 10567-10572, 2010

EDWARDS, D.; STAJICH, J.; HASEN, D. **Bioinformatics: Tools and Applications**. New York: Springer, 2009.

EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J. P.; GUERINOT, M. L. **A novel iron- regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast**. PNAS. 93: 5624- 5628. 1996.

EUREK ALERT. Disponível em: <http://www.eurekalert.org>. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

FEUILLET, C.; KELLER, B. **Comparative Genomics in Grass Family: Molecular Characterization of Grass Genome Structure and Evolution**. Annals of Botany. v. 89, pp. 3-10, 2002.

FUNDACION ANTANA. Disponível em: <http://www.fundacion-antama.org>. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

GALE, M. D.; DEVOS K. M. **Comparative genetics in the grasses.** Proceedings of the National Academy of Science. v. 95, pp. 1971- 1974, 1998.

GIBAS, Cynthia; JAMBECK, Per. **Developing Bioinformatics Computer Skills.** Lorrie Lejeune, 2001.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. **The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation.** Biochim Biophys Acta. Jul 31; 1275(3): 161- 203, 1996

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

HOELZEL, R.; HOELZEL, A. R. **Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach.** Paperback, p. 468, 1998.

HOFFMANN, M.H. **Biogeography of *Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh. (Brassicaceae).** *Journal Biogeography* 4, 29, 125–34, 2002.

HUEBER, FM. ***Hepaticites devonicus* : a new fossil liverwort from the Devonian of New York.** *Ann Miss Bot Gard* 48:125–132, 1961.

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

LAITAOJA, MIKKO; VALJAKKA, JARKKO; JÄNIS, JANNE. **Zinc coordination spheres in protein structures.** *Inorganic chemistry*, v. 52, n. 19, p. 10983-10991, 2013.

LIU, X.; THEIL, E. C. **Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry.** *Acc Chem Res* 38: 167- 175, 2005.

MARET, W. **Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 19:7- 12, 2005.

MARSCHNER H, RÖHMELD V. **Strategies of plants for acquisition of iron.** Plant Soil 165: 375- 88. 1994.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2nd edn. Academic Press, London, 1995.

MAUGHAN, P. J.; SAGHAI MAROOF, M. A.; BUSS, G. R. **Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean.** Genome v. 38, p. 715–723, 1995.

MEINKE, D.W; CHERRY, M.J; DEAN, C; ROUNSLEY, S.D; KOORNNEEF, M. ***Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis.*** *Science* 5389, 282, 662-682, 1998.

MEWIS, I. *et al.* **Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects.** *Plant Physiology* 138, 2, 1149-1162, 2005.

MOORE HERBARIUM. Disponível em: <http://www.herbarium.biol.sc.edu>. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

MORGANTE M, OLIVIERI, A.M. **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** The Plant Journal. 3(1):175-182, 1993.

MORI, S.; NISHIZAWA, N. K.; HAYASHI, H.; CHINO, M.; YOSHIMURA, E.; ISHIHARA, J. **Why are Young Rice plants highly susceptible to iron deficiency.** Plant Soil. 130, 143-156. 1991.

PROSDOCIMI, FRANCISCO *et al.* **Bioinformática: manual do usuário.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 29, pp. 12-25, 2002.

RENSING, SA.; LANG, D.; ZIMMER, AD.; TERRY, A.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.; NISHIYAMA, T.; PERROUD, P-F.; LINDQUIST, EA.; KAMISUGI, Y.; TANAHASHI, T.; SAKAKIBARA, K.; FUJITA, T.; OISHI, K.; SHIN-I, T.; KUROKI, Y.; TOYODA, A.; SUZUKI, Y.; S-I, HASHIMOTO.; YAMAGUCHI, K.; SUGANO, S.; KOHARA, Y.; FUJIYAMA, A.; ANTEROLA, A.; AOKI, S.; ASHTON, N.; BARBAZUK, WB.; BARKER, E.; BENNETZEN, JL.; BLANKENSHIP, R.; CHO, SH.; DUTCHER, SK.; ESTELLE, M.; FAWCETT, JÁ.; GUNDLACH, H.; HANADA, K.; HEYL, A.; HICKS, KA.; HUGHES, J.; LOHR, M.; MAYER, K.; MELKOZERNOV, A.; MURATA, T.; NELSON, DR.; PILS, B.; PRIGGE, M.; REISS, B.; RENNER, T.; ROMBAUTS, S.; RUSHTON, PJ.; SANDERFOOT, A.; SCHWEEN, G.; SHIU, S-H.; STUEBER, K.; THEODOULOU, FL.; TU, H.; VAN DE PEER, Y.; VERRIER, PJ; WATERS, E.; WOOD, A.; YANG, L.; COVE, D.; CUMING, AC.; HASEBE, M.; LUCAS, S.; MISHLER, BD.; RESKI, R.; GRIGORIEV, IV.; QUATRANO, RS.; BOORE, JL. **The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants.** Science 319:64–69, 2008.

ROBERTS, L. A.; PIERSON, A. J.; PANAVIENE, Z.; WALKER, E. L. **Yellow strip 1: Expanded roles for the maize iron- phytosiderophore transporter.** Plant Physiol 135: 112-120. 2004.

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.

RÖMHELD, V. **Different strategies for iron acquisition in higher plants.** Physiologia plantarum 70, 321- 234, 1987.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. **Evidence for a specific system for iron phytosiderophores in roots of grasses.** Plant Physiology 80, 175-180. 1986.

SANTOS, I.R.; SCHAEFER, C.E.; SILVA-FILHO, E.V.; ALBUQUERQUE, M.; ALBUQUERQUE-FILHO, M.R. **Contaminantes antrópicos em ecossistemas antárticos: estado-de-arte.** In: SCHAEFER, C.E.; FRANCELINO, M.R.; SIMAS, F.B.; ALBUQUERQUE- FILHO, M.R. (eds.) **ecossistemas costeiros e**

**monitoramento ambiental da antártica marítima: baía do almirantado, ilha rei george.** Viçosa: NEPUT, pp. 95–106, 2004.

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

SCHAEFER, DG.; ZRÝD, J-P. **Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*.** Plant J 11:1195–1206, 1997.

SILVA, NEYVAN RENATO RODRIGUES. **A bioinformática como ferramenta de formação de recursos humanos no ifrn.** HOLOS-ISSN 1807-1600, v. 6, p. 113-123, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia.** 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAGI, S.; NOMOTO, K. AND TAKEMOTO, T. **Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plant.** J. Plant Nutr. 7, 469-477. 1984.

TANKSLEY, S.D; JOVEM, N.D; PATERSON, A.H; BONIERBALE, M.W. **RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science.** Biotechnology, v.7, pp. 257-264, 1989.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER. G. A. **Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation.** Nature v. 322, p. 652-656, 1986.

VERT G.; GROTZ N.; DÉDALDÉCHAMP F.; GAYMARD F.; GUERINOT M. L.; BRIAT J. F.; CURIE C. **IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth.** Plant Cell 14: 1223- 1233, 2002.

VICTORIA, F. D. C.; BERVALD, C. M. P.; DA MAIA, L. C.; DE SOUSA, R. O.; PANAUD, O.; & DE OLIVEIRA, A. C. **Phylogenetic relations and selective**

**pressureon gene families related to iron homeostasis in land plants.** *Genome*, 55(12), 883-900, 2012.

VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa arroz e feijão, p. 633, 1999.

WALKER E. L.; CONNOLLY E.L. **Time to pump iron: iron- deficiency- signaling mechanisms of higher plants.** *Curr Opin Plant Biol* 11: 530- 535, 2008

WATANABE, Y. **Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryza*.** *In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. Science of the rice plantgenetics.* Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. P. 29-39.

WIKIMEDIA COMMONS. Disponível em: <http://www.commons.wikimedia.org>. Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

WILLIAMS, LE.; PITTMAN, JK.; HALL, JL. **Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants.** *Biochim Biophys Acta*. 1465:104-126, 2000.

WINTZ, H.; FOX, T.; WU, Y.Y.; FENG, V.; CHEN, W.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; VULPE, C. **Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis.** *J Biol Chem* 278: 47644- 53, 2003.

YI, Y.; GUERINOT, M.L. **Genetic evidence that induction of root Fe (III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency.** *Plant J*. 10; 835- 844. 1996.

ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BIROCCIO, A.; FEDERICI, G.; URBANI, A.; MURGIA, I.; SOAVE, C. et al. **Evidence for the presence of ferritina in plant mitochondria.** *Eur J Biochem* 271:3657- 3664, 2004.

ZARDOYA, R.; AROUHEIF, E.; MEYER, A. **Evolution and orthology of hedgehog genes**, Elsevier Science, v.12 n.12, p. 496-497, 1996.