Caracterização funcional do transportador de metais OsNRAMP7 de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)

Virgínia de Castilhos, Joseane B. de Carvalho, Janette P. Fett
Laboratório de Fisiologia Vegetal – Centro de Biotecnologia e Departamento de Botânica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

INTRODUÇÃO

O arroz, por ser a base alimentar de grande parte da população mundial, tem muita relevância econômica e social. Por isso, muitos esforços são feitos para enriquecer nutricionalmente o grão de arroz com minerais como o ferro e o zinco, responsáveis pelas principais deficiências minerais na população humana. O aumento das concentrações desses minerais no grão de arroz será possível quando houver entendimento dos mecanismos de aquisição e mobilização desses metais na planta. Assim, surge o interesse em identificar os genes e as moléculas envolvidas na homeostase de metais, como o gene *OsNramp7* e a proteína homônima que ele codifica. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa encontrou oito membros da família NRAMP no genoma do arroz. Os genes NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) pertencem a uma super família de transportadores de metais presentes em bactérias, leveduras, plantas e animais. As proteínas codificadas por esses genes atuam no transporte e homeostase de metais como manganês e ferro, e outros metais divalentes tais como níquel, zinco, cobre, e cádmio. Também detectamos correlação negativa entre a expressão do gene *OsNRAMP7* na folha bandeira durante o estágio de enchimento de grãos e as concentrações finais de Fe e Zn nos grãos de arroz. A importância de OsNRAMP7 na alocação de metais para os grãos também pode ser sugerida pela co-localização deste gene com dois QTLs no cromossomo 12, identificados por outro grupo, que explicam parte da variação na concentração de Fe e Zn nos grãos de arroz. Este estudo teve como objetivo estudar a possível atividade de transporte de metais da proteína codificada pelo gene *OsNRAMP7*.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Clone completo de cDNA do gene *OsNRAMP7* foi obtido do National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Japão, e amplificado por PCR para clonagem no vetor de entrada pENTR-D Topo (Life Technologies);
- Clones de pENTR com stop códon (S) ou sem stop códon (NS) foram obtidos para recombinar em vetores de expressão em levedura, pYTV e pAG426-EGFP, respectivamente.
- Células de leveduras mutantes foram transformadas com vetor vazio e vetor contendo *OsNRAMP7* e leveduras selvagens foram transformadas somente com vetor vazio. As células transformadas foram crescidas em meio SC glucose – URA. Os ensaios do teste de gota foram realizados em meio SC galactose contendo metais (Fe, Mn) ou agentes quelantes de metais (BPDS para quelar Fe e EGTA para quelar Mn);
- Linhagem de levedura mutante deficiente no transporte de Fe para vacúolo (Δccc1) e Tipo Selvagem (DY150) sob excesso de Fe foram testadas nas concentrações de 0 (controle), 2,5, 5,0 e 10 mM de sulfato ferroso. Linhagem de levedura mutante deficiente no transporte de Fe pela mebrana plasmática (DY1453, Fet3Fe4) e Tipo selvagem (DY1457) foram testadas nas concentrações de 0, 80, 200 µM de BPDS. Linhagem de levedura mutante deficiente no transporte de Mn pela membrana plasmática (Δsmf1) e Tipo selvagem (DY1457) foram testadas nas concentrações de 0, 2,5, 5,0, 10, 25, 50 e 250 µM de EGTA ;
- Fenótipo de uma linhagem de Arabidopsis que super-expressa *OsNRAMP7* (IFOX, RIKEN BioResource Center) submetida a deficiência e excesso de Fe e comparada a linhagem selvagem Columbia (Col-0). Os tratamentos foram: 50 µM (controle), 250 e 500 µM (excesso de Fe) de sulfato férrico (FeIII)-EDTA, ou meio simulando a deficiência de Ferro (153 µM e 300 µM Ferrozina). As plântulas foram avaliadas aos 3 dias, 7 dias e 14 dias após transferência para os tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação por PCR e clonagem em pENTR-D-TOPO

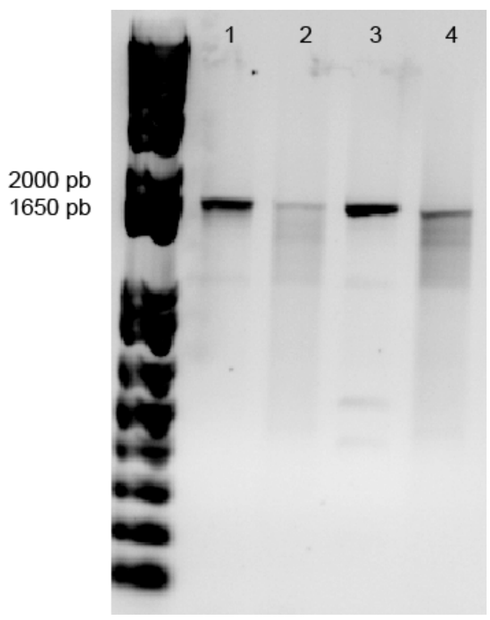

Figura 1. Amplificação do gene OsNRAMP7 por PCR para clonagem em vetor de entrada (pENTR-D-TOPO) Tamanho do fragmento de 1626 pb; 1 e 2: cDNA full Length (NIAS) de OsNRAMP7 contendo o stop códon nas diluições 1:10 e 1:100; 3 e 4: cDNA full length (NIAS) de OsNRAMP7 sem stop códon (NS) nas diluições 1:10 e 1:100.

Confirmação das construções com OsNRAMP7 por clivagem com enzimas de restrição

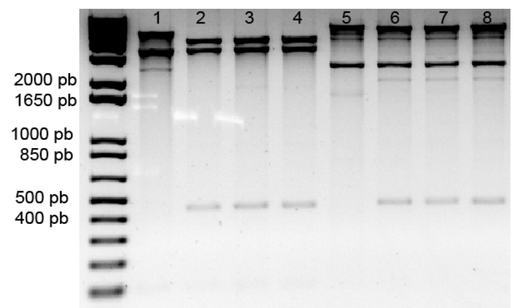

Figura 2. Clivagem com EcoRV (cliva os vetores) e HindIII (cliva OsNRAMP7) para confirmação das construções em dois vetores de expressão de levedura, pYTV e pAG426-EGFP. 1. pYTV vazio; 2, 3 e 4. pYTV contendo OsNRAMP7 (S); 5. pAG426-EGFP vazio; 6, 7, e 8. pAG426-EGFP contendo OsNRAMP7 (NS).

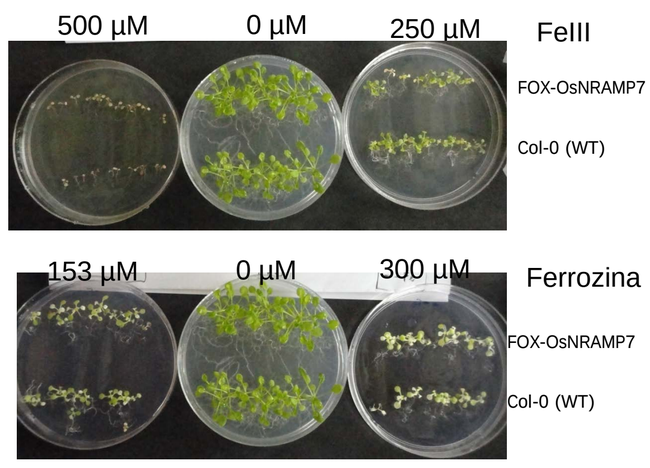

Figura 4. Linhagens de Arabidopsis FOX-OsNRAMP7 e WT submetidas aos estresses por deficiência e excesso de Fe.

Teste de complementação de fenótipo em leveduras

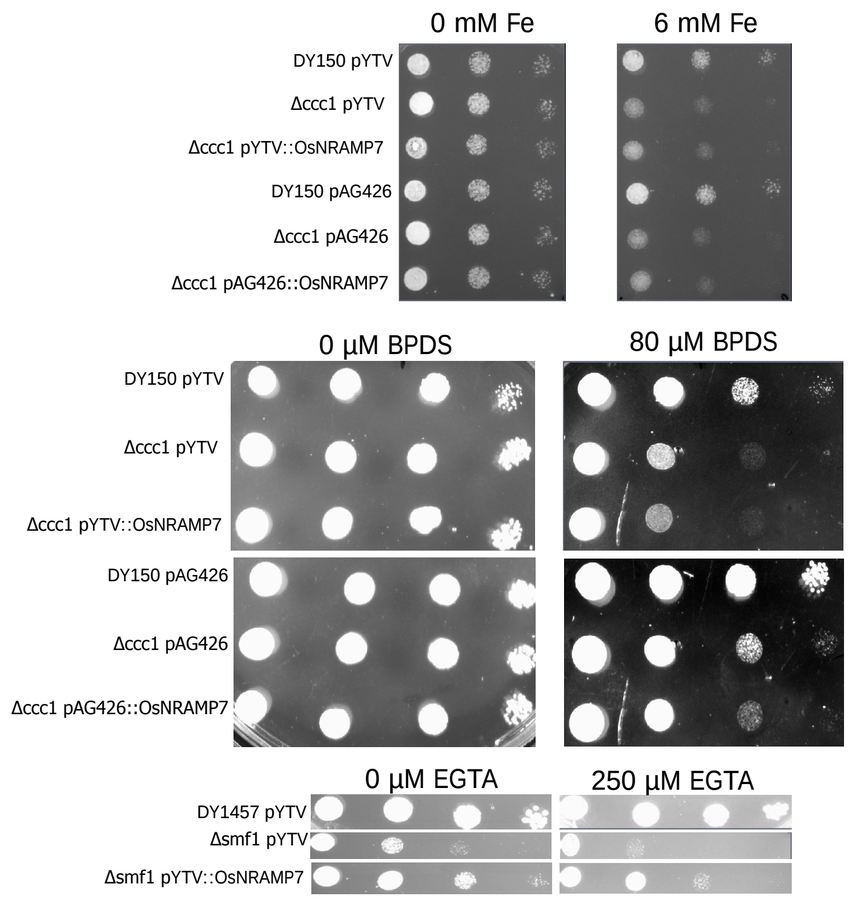

Figura 3. Ensaio de complementação de leveduras mutantes deficientes na captação de Fe e Mn com OsNRAMP7.

- Clones de *OsNRAMP7* contendo ou não stop códon foram obtidos e recombinados com sucesso para os dois vetores de expressão em levedura (pYTV e pAG426);
- OsNRAMP7 não complementou o fenótipo da linhagem Fet3Fet4 e nem de Δccc1 com os dois vetores em uso, porém houve complementação do fenótipo da linhagem Δsmf1, que é deficiente no transporte de Mn (Membrana Plasmática);
- Plantas da linhagem FOX superexpressando *OsNRAMP7* não diferiram das plantas de Col-0. Porém, mostraram sintomas relacionados à sensibilidade tanto a deficiência quanto ao excesso de Fe, comparadas com as plântulas da linhagem selvagem. As plântulas em deficiência de Fe apresentavam sintomas de clorose e redução de crescimento e as plântulas com excesso de Fe apresentaram crescimento reduzido e escurecimento dos tecidos quando comparadas a plântulas crescidas na condição controle.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

OsNRAMP7 é um provável transportador de Mn, porém mais estudos devem ser realizados com outras cepas mutantes de levedura, deficientes no transporte de Mn para o vacúolo, e com outros metais.
Ensaios com mutantes com inserção de T-DNA em genes de arroz, e com a linhagem FOX de Arabidopsis sob deficiência e excesso de outros metais (especialmente Mn) serão realizados para comprovar esses resultados.

APOIO: Fapergs, CAPES, CNPq