

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES NRAMP EM ARROZ: REGULAÇÃO POR METAIS DIVALENTES.

Marta Gomes Spohr ⁽¹⁾, Ricardo José Stein ⁽¹⁾, Liana Appel Bouffleur ⁽²⁾, Johnny Ferraz Dias ⁽²⁾ & Janette Palma Fett ⁽¹⁾. ¹ Laboratório de Fisiologia Vegetal – Centro de Biotecnologia ² Laboratório de Implantação Iônica – Instituto de Física - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43423b sala 205, Porto Alegre – RS. marta_spohr@terra.com.br

Palavras-chave: metais, NRAMP, arroz

Os metais divalentes são essenciais para o desenvolvimento e crescimento das plantas. Dentre eles, o ferro é constituinte de citocromos e ferro-proteínas não-heme envolvidas na fotossíntese, o zinco constituinte de enzimas como álcool desidrogenase, e anidrase carbônica. Já o manganês é requerido para a atividade de algumas enzimas como desidrogenases, quinases, além de ser constituinte da molécula de clorofila. A deficiência de um nutriente essencial leva a um distúrbio nutricional, manifestado por sintomas característicos (Taiz & Zeiger, 2004). Esse suprimento inadequado do nutriente pode levar a alterações no padrão de expressão de genes e, em especial, de transportadores de metais (Wintz et al, 2003). Os transportadores de metais *NRAMP* (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) foram caracterizados em mamíferos, podendo transportar elementos como de Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Pb^{2+} (Gunshin et al, 1997). Em arroz (*Oryza sativa*) já foram identificados 8 genes desta família (Belouchi et al, 1995; Gross et al, 2003), sendo que apenas três deles foram caracterizados, *OsNRAMP1*, *OsNRAMP2* e *OsNRAMP3* (Belouchi et al, 1997). Este estudo visa a caracterização do padrão de expressão dos oito representantes de *NRAMP* em arroz em condições de deficiência de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} em folhas, buscando também determinar a condição nutricional das plantas em relação a estes elementos.

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) da cultivar Nipponbare foram germinadas em placas de Petry por dois dias (24hs em escuridão total e 24hs com fotoperíodo de 16hs) em BOD, com temperatura de 28°C. Logo, as sementes que já emitiam a radícula foram transferidas para um recipiente com 500 ml de solução nutritiva e com uma tela para o suporte das plântulas. O meio de cultivo utilizado para adaptação à hidroponia foi como descrito por Yoshida et al (1981) com modificação para 0,12 mM de $FeCl_3$, em pH 5,0. As plantas cresceram por sete dias nesta solução, que foi renovada na metade do período. Após, as plantas foram colocadas em tratamentos de deficiência de Fe, Zn e Mn, com soluções iguais às da adaptação, porém, sem a presença dos respectivos elementos. Durante o tratamento, as soluções foram trocadas a cada três dias. Antes da coleta das plantas, estas foram enxaguadas com água destilada, na tentativa de eliminar a contaminação pela solução que pudesse alterar as análises futuras. No nono dia de

tratamento, as plantas foram coletadas. Plantas para análises químicas foram secas em estufa a 60°C, pulverizadas em nitrogênio líquido e pastilhas de 1cm de diâmetro foram confeccionadas sob pressão de 3,5 ton. Os elementos Fe, Zn e Mn foram quantificados pela técnica de PIXE. Plantas para análises moleculares foram congeladas e mantidas a -80 °C. O RNA total de folhas foi extraído com Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, e 2 µg de RNA foram utilizadas para a síntese de cDNA, realizada através do sistema MML-V (Invitrogen). O RT-PCR semi-quantitativo foi realizado na fase linear de amplificação com o uso de primers específicos para a análise dos transcritos dos genes *OsNRAMP1* a 8 e, como controle, foi verificada a expressão constitutiva do gene ubiquitina.

A exposição aos tratamentos levou a distintos padrões de distribuição e acúmulo dos metais analisados (Fig. 1). Foi observada queda na concentração de Fe em folhas de plantas tratadas com deficiência deste metal quando comparada com os tratamentos controle, deficiência de Zn e deficiência de Mn. A concentração de Zn diminuiu no tratamento de deficiência de Zn. A concentração de Mn, nas folhas do tratamento com a deficiência deste metal, foi reduzida em 4,8 vezes quando comparada com o controle. Assim, a exposição aos tratamentos pelo período de nove dias foi capaz de diminuir os níveis dos respectivos metais em folhas das plantas de arroz. Interessantemente, plantas expostas ao tratamento de deficiência de Zn apresentaram menores níveis (cerca de 3,5 vezes menor do que no controle) de Mn. Este resultado pode indicar uma possível relação entre os mecanismos de absorção destes dois metais.

Dentre os 8 membros da família gênica NRAMP, dois genes não apresentaram expressão (*OsNRAMP4* e 5), cinco não apresentaram alterações em seu padrão de expressão e somente o gene *OsNRAMP8* teve sua expressão diferencialmente regulada pela exposição aos diferentes tratamentos (Fig. 2). A exposição aos tratamentos de deficiência de Fe e Zn levou à indução de sua expressão, embora as variações nas concentrações de metais tenham sido distintas nos dois tratamentos (redução apenas do elemento em deficiência, em cada um dos tratamentos). A regulação da expressão de genes da família gênica NRAMP já foi descrita em *Arabidopsis*, tendo seu envolvimento relacionado com à captura de metais divalentes em condições de deficiência dos mesmos (Wintz et al, 2003)

Mais estudos envolvendo a expressão dos genes NRAMP em outros órgãos são necessários para a compreensão das funções dos genes NRAMP em relação à homeostase de metais divalentes em plantas de arroz. Raízes das plantas utilizadas neste experimento estão sendo analisadas.

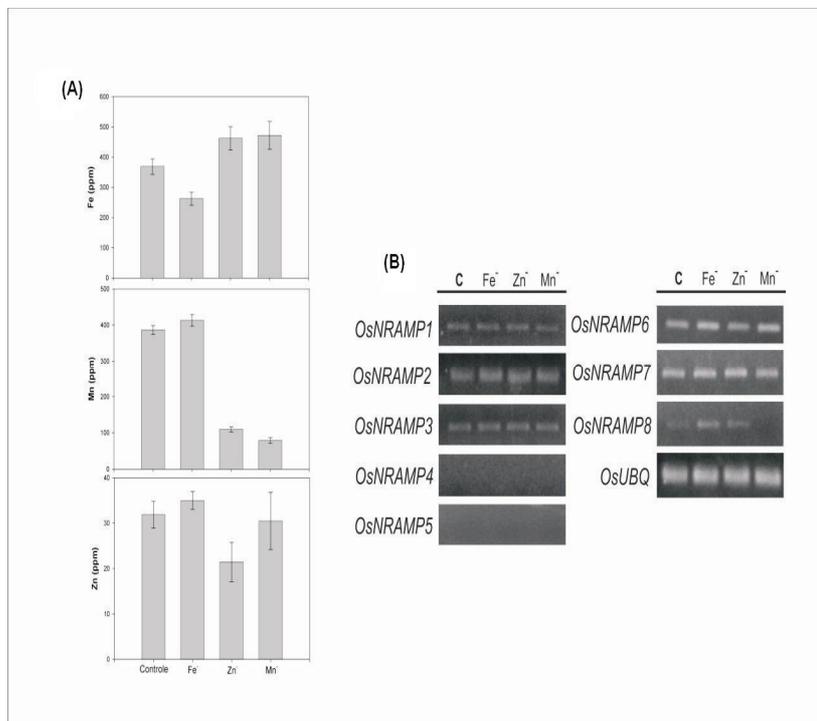


Figura 1. (A) Concentração e distribuição dos metais Fe, Mn e Zn em plantas de arroz após dez dias de exposição aos tratamentos. Os valores representam as médias \pm erro padrão. **(B)** Expressão gênica dos genes NRAMP em folhas de plantas de arroz após nove dias de exposição aos tratamentos controle, deficiência de Fe, Zn e Mn.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BELOUCHI A, CELLIER M, KWAN T, SAINI HS, LEROUX G & GROS P. The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. **Plant Molecular Biology** 29: 1181-1196, 1995.
- BELOUCHI A, KWAN T & GROS P. Cloning and characterization of the *OsNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. **Plant Molecular Biology** 33:1085-1092, 1997.
- GROSS J, STEIN RJ, FETT-NETO AG & FETT JP. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology** 4:477-497, 2003.
- GUNSHIN H, MACKENZIE B, BERGER UV, GUNSHIN Y, ROMERO MF, BORN WF, NUSSBERGER S, GOLLAN JL & HEDIGER MA. Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature** 388:482-488, 1997.
- TAIZ L & ZEIGER E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artes Médicas, 3 ed, 2004.
- WINTZ H, FOX T, WU Y, FENG V, CHEN W, CHANG H, ZHU T & VULPE C. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. **Journal of Biological Chemistry** 278: 47644-47653, 2003
- Agradecimentos: CNPq, CAPES, HarvestPlus e IRGA.