

## CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FERRITINA EM PLÂNTULAS DE ARROZ EM CONDIÇÕES DE TOXIDEZ POR FERRO

Hillebrand, L.<sup>(1)</sup>; Lopes, S.I.C.<sup>(2)</sup>; Carmona, F.S.<sup>(2)</sup>; Moraes, M.G.<sup>(1)</sup>,<sup>(3)</sup> Dep. de Fitosanidade, Fac. de Agronomia, UFRGS, Caixa Postal 776 - CEP 90001-970. Porto Alegre - RS - Brasil. <sup>(2)</sup> IRGA/EEA, Caixa Postal 29, CEP 94930-030, Cachoeirinha, RS.

A toxidez por ferro em arroz é uma doença abiótica causada pelo excesso de ferro solúvel na água. O ferro é o micronutriente catiônico mais abundante no solo onde é encontrado preponderantemente na forma de óxidos de ferro ( $Fe^{2+}$ ) (SANTOS FILHO, 1988). Nas condições de baixas concentrações de oxigênio dos solos irrigados por inundação, encontradas na cultura do arroz, o  $Fe^{2+}$  é convertido para a forma altamente solúvel e reduzida ( $Fe^{3+}$ ), a qual pode ser facilmente absorvida pelas plantas (SANTOS FILHO, 1988). A toxidez por ferro no arroz é observada através da presença de sintomas nas folhas e nas raízes das plantas. Nas folhas mais velhas podem ocorrer tanto pequenas manchas de cor avermelhada ou ainda áreas maiores de coloração amarela ou laranja (LANTIN & NEUE, 1989). As raízes tornam-se menos numerosas e espessas além de adquirirem uma coloração parda escura. Estes distúrbios causam um retardamento no crescimento das plantas nos primeiros estádios de desenvolvimento da cultura. Nas etapas mais avançadas, ocorrerá uma redução no rendimento devido à alta esterilidade. A toxidez por ferro causa perdas importantes para a cultura do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, notadamente na região da Fronteira Oeste. Estimativas de perdas devido a este distúrbio variam de 12% (cultivares mais tolerantes) a 88% (cultivares mais sensíveis) (PONNAMPERUMA & LANTIN, 1985).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos na toxidez por ferro em arroz ainda são pouco conhecidos, sendo que até o momento duas teorias distintas tentam explicar o fenômeno. Uma possibilidade, é a ocorrência de uma desordem fisiológica indireta causada por um estresse nutricional múltiplo. Neste caso, a oxidação que ocorre nas raízes preveniria a entrada  $Fe^{2+}$  devido a formação de um precipitado de  $Fe^{3+}$  na superfície das raízes (capa de  $Fe^{3+}$ ) que inibe a absorção de outros nutrientes essenciais (SANTOS FILHO, 1988). Alternativamente, é possível que a toxidez seja devido a uma saturação dos mecanismos que mantêm as concentrações de ferro abaixo de níveis críticos nas etapas de absorção, transporte ou acumulação de ferro nos tecidos afetados (TANAKA et al., 1966). Neste caso, é postulada a participação de compostos que se liguem ao metal tais como as ferritinas e as metalotioninas. O nível de expressão das metalotioninas aumenta com um incremento da concentração de metais, o que sugere o envolvimento desta no mecanismo de tolerância (THEIL, 1987; HSIBH et al., 1996). Metalotioninas possuem grande capacidade de ligarem-se ao zinco e ao cobre, porém, ainda não foram investigadas quanto a capacidade de ligarem-se ao ferro. Entretanto, em estudos anteriores foi verificado que os mRNAs que codificam para metalotioninas se acumulam nas raízes primárias de plântulas de arroz que crescem na presença de níveis elevados de ferro (MORAES & ROSSO, 1998). Ferritinas são proteínas multiméricas que podem conter até 4.500 átomos de ferro em suas 24 sub-unidades (FOBIS-LOISY et al., 1995). O papel de ferritina na acumulação de ferro foi demonstrado em plantas de fumo geneticamente modificadas para expressarem ferritinas em grandes quantidades (VAN WUYTSWINKEL, 1999). Estas plantas comportam-se como se estivessem crescendo sob deficiência de ferro pois ativam o sistema de absorção e transporte do metal, o que resulta em uma maior concentração de ferro nas folhas.

Embora em número reduzido, algumas cultivares de arroz de porte moderno com alto potencial produtivo podem ser indicadas para áreas com graves problemas de toxidez por ferro. A existência destas cultivares indica o potencial do uso do melhoramento genético para a seleção de linhagens tolerantes. Entretanto, as variações do ambiente influenciam a manifestação dos sintomas de toxidez, os quais são os parâmetros usados na avaliação do grau

de tolerância. Isto acarreta em um grande obstáculo para selecionar cultivares tolerantes ao ferro nos programas de melhoramento genético de arroz. O presente trabalho tem como objetivos desenvolver um método simples e rápido de seleção de cultivares tolerantes ao ferro e caracterizar o efeito do aumento da concentração de ferro no padrão da expressão gênica de ferritinas. O conhecimento dos mecanismos de tolerância irá proporcionar a obtenção de plantas tolerantes através do processo de seleção de linhagens assistida por marcadores moleculares e pelo uso de plantas transgênicas.

Cultivares de arroz com distintos níveis de tolerância ao ferro sob condições de campo foram selecionadas para este estudo. Cinquenta sementes foram colocadas em placas para germinação e incubadas em uma câmara de crescimento (26 °C) no escuro. Cada tratamento recebeu uma solução de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  contendo as seguintes concentrações de ferro elementar: 0 (controle), 100, 500 e 1000 ppm. Após sete dias, o comprimento da raiz primária foi medido e o tecido das raízes e das folhas foi coletado separadamente e armazenado em nitrogênio líquido. O RNA total de raízes e folhas de plantas foi extraído segundo o método descrito por BUGOS et al. (1995). O fragmentos dos genes de ferritina foram isolados através da amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme as condições previamente descritas (MORAES & ROSSO, 1998). A expressão gênica foi analisada através da técnica de transcrição reversa acoplada à PCR (RT-PCR) (MURPHY & TAI, 1995).

Todas as cultivares testadas apresentaram a formação de uma camada típica de ferro oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) nas raízes. Os resultados (Figura 1) mostram uma diminuição do comprimento da raiz primária devido ao aumento da concentração de ferro na solução. Uma diminuição significativa do comprimento das raízes primárias de todas as cultivares foi verificada nas plântulas que receberam 1000 ppm de  $\text{Fe}^{2+}$ , indicando a saturação dos mecanismos de tolerância. Já com 500 ppm de  $\text{Fe}^{2+}$ , as cultivares diferiram quanto ao comprimento das raízes em função da concentração de ferro mostrando um nível de tolerância similar ao observado em experimentos de campo (IRGA, 1996). O comprimento da raiz primária da cultivar BR-IRGA 409 foi reduzido significativamente (69,3%) pelo tratamento de 500 ppm de  $\text{Fe}^{2+}$  em relação ao controle. As cultivares IRGA 417, BR-IRGA 414 e BR-IRGA 410 apresentaram reduções intermediárias de 52,6, 52,2 e 47,7%, respectivamente. Já as cultivares EPAGRI 108 e EPAGRI 107 apresentaram reduções ainda mais baixas, com 34,2 e 32,4%, respectivamente. Este experimento foi conduzido três vezes com resultados similares.

O padrão de expressão gênica das ferritinas foi avaliado nas folhas e raízes das cultivares EPAGRI 108 (tolerante) e BR-IRGA 409 (suscetível). O nível de expressão de mRNAs de ferritinas nas folhas e raízes das duas cultivares diminuiu em decorrência da alta concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  (500 ppm). A diminuição foi maior, e ocorreu em concentrações de ferro menores, nas folhas e raízes da cultivar tolerante EPAGRI 108. Este resultado sugere que EPAGRI 108 e BR-IRGA 409 diferem na capacidade de indução da ferritina. É possível que uma menor quantidade de ferritina possibilite que menos ferro seja acumulado na planta, diminuindo desse modo o influxo do metal nas etapas precedentes de absorção e transporte (VAN WUYTSWINKEL, 1999). Os nossos dados experimentais ainda são preliminares, porém eles estão de acordo com a hipótese que uma menor expressão de ferritina em EPAGRI 108 seja a causa da maior tolerância desta cultivar à toxidez por ferro. Além disso, foi verificada a presença de diversos membros de mRNAs de ferritinas, o que confirma a existência de uma família de genes de ferritina em arroz. A expressão diferencial de determinados membros da família de genes de ferritina observadas neste trabalho pode ser um indicativo de que somente alguns membros possuem um papel importante no mecanismo de tolerância. O papel dos membros da família da ferritina do arroz no mecanismo de tolerância ao ferro está sendo investigado.

O presente trabalho permite concluir que as cultivares de arroz diferem quanto à tolerância ao ferro no estágio de plântula e que a expressão de ferritinas é inibida ao nível de acumulação de mRNAs pela presença de níveis elevados de ferro.

BUGOS, R.C.; CHIANG, V.I.; ZHANG, X.-H.; CAMPBELL, B.R.; PODILA, G.K.; CAMPBELL, W.H. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *Biotechniques*, 19:734-737, 1995.

FOBIS-LOISY, I.; LORIDON, K.; LOBRÉAUX, S.; LEBRUM, M.; BRIAT, J.-F. Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *Eur. J. Biochem.* 231: 609-619, 1995.

HSIEH, H. M.; LIU, W.K.; CHANG, A.; HUANG, P.C. RNA expression, patterns of type to metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol. Biol.*, 32: 525-529, 1996.

IRGA, Estação Experimental do Arroz (Cachoeirinha, RS). Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Ed. Cachoeirinha, rev. 1996. 88p.

LANTIN, R.R.; NEUE, H.U. Toxicidez por ferro: desordem nutricional no arroz irrigado. *Lav. Arroz.* 42:3-8, 1989.

MORAES, M.G.; ROSSO, A.F. Differential expression of metallothionein genes in rice (*Oryza sativa*) in response to toxic levels of iron. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia, 27, Caxambu, 1998. *Anais...* p.35.

MURPHY, A.; TAIZ, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol.* 109:945-954, 1995.

PONNAMPERUMA, R.N.; LANTIN, R.S. Diagnosis and amelioration of nutritional disorders of rice. In: International Rice Research Conference, 1, Los Baños, 1985.

SANTOS FILHO, B.G. Ferro na planta. In: Reunião sobre ferro em solos inundados, 1, 1988, Goiânia, *Anais...Goiânia: CNPAF*, 1988, p. 72-93.

TANAKA, A.; LOE, R.; NAVASERO, S.A. Some mechanisms involved in the development of iron toxicity in the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition.* 12: 158-164, 1966.

THEIL, E.C. Ferritin: structure, gene regulation and cellular functioning in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 289-315, 1987.

VAN WUYTSWINKEL, O.; VANSUYT, G.; GRIGNON, N.; FOURCROY, P.; BRIAT, J.F. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J.*, 17: 93-7, 1999.

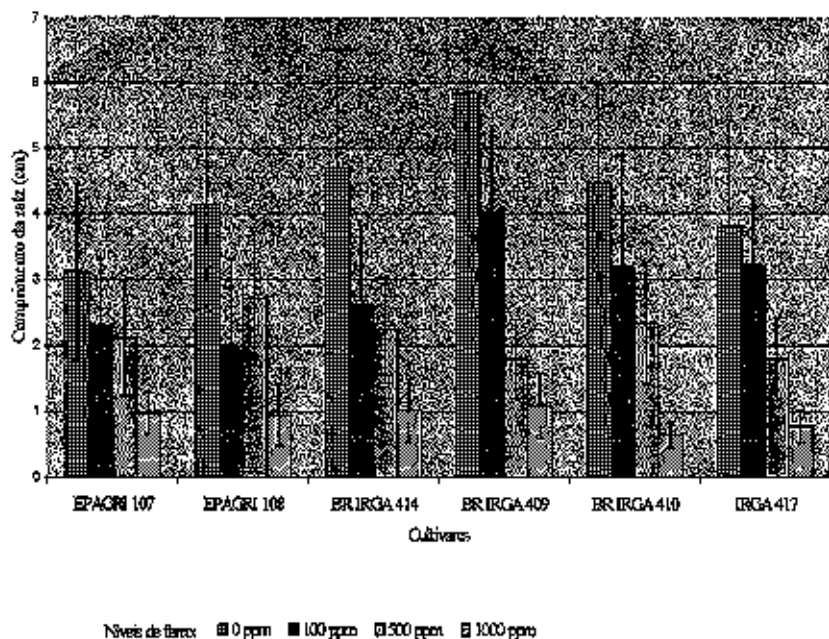


Figura 1- Efeito do  $Fe^{2+}$  no crescimento da raiz primária de plântulas em seis cultivares de arroz irrigado.