



Evento	Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2014
Local	Porto Alegre
Título	Caracterização funcional do transportador de metais OsNRAMP7 de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)
Autor	VIRGÍNIA DE CASTILHOS
Orientador	JANETTE PALMA FETT

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. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa encontrou oito membros da família NRAMP no genoma do arroz. 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. Expressão heteróloga em linhagens de leveduras mutantes, com deficiência no transporte (na membrana plasmática ou no tonoplasto) de metais (Fe, Zn, Mn, Cd, Co, Cu, Ni, e As) está sendo utilizada para avaliar a afinidade por potenciais substratos e o papel de OsNRAMP7 na sensibilidade ou resistência a diferentes metais. Além disso, o fenótipo de uma linhagem de Arabidopsis que super-expressa OsNRAMP7 (linhagem FOX, RIKEN BioResource Center) submetida a tratamentos de deficiência e excesso desses metais está sendo avaliado e comparado ao da linhagem selvagem Columbia (Col-0). Estes experimentos visam avaliar a sensibilidade ou resistência aos metais conferida à linhagem de Arabidopsis pela super-expressão deste gene de arroz. Linhagens de leveduras mutantes para transporte de Fe para vacúolo ($\Delta ccc1$) e Tipo Selvagem (DY150) estão sendo testadas. 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) e recombinado com vetores de expressão em levedura (pYTV e pAG426-EGFP). Ensaio de complementação do fenótipo das leveduras mutantes para o transporte de Fe para vacúolo foram realizados. As células transformadas foram crescidas em meio SC – URA contendo excesso de Fe (sulfato de Fe-III 0, 3 e 5 mM). As colônias foram visualizadas após incubação das placas até 6 dias a 30 °C. O gene OsNRAMP7 complementou fracamente o fenótipo da linhagem $\Delta ccc1$, o que sugere pouca eficiência de OsNRAMP7 no transporte de Fe para o vacúolo. Testes para complementação de linhagem de levedura deficiente no transporte de Fe na membrana plasmática em deficiência de Fe estão sendo realizados, além de ensaios com linhagens de levedura deficientes para transporte de outros metais. Linhagem de Arabidopsis super-expressando OsNRAMP7 e Columbia (Col-0) foram germinadas em meio MS contendo sacarose. Após 5 dias, as plântulas foram transferidas para meio contendo 50 μ M de Fe-EDTA (controle), 250 e 500 μ M (excesso de Fe), ou para meio simulando a deficiência de Ferro (com Ferrozina 153 μ M e 300 μ M). As plântulas foram avaliadas aos 3 dias, 7 dias e 14 dias após transferência para os tratamentos. Não houve diferenças de crescimento nas plântulas que super-expressam OsNRAMP7. Todas as plântulas 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. Experimentos com outros metais utilizando a linhagem FOX serão realizados para avaliar a sensibilidade e tolerância a Mn, Zn, Cd, Ni, Cu, Co e As.

Apoio: CNPq, CAPES e FAPERGS.