

## PERFIL DE EXPRESSÃO DE ERFs SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR EXCESSO DE Fe NA CULTIVAR DE ARROZ BR-IRGA 409.

**FERNANDES, Bianca Silva<sup>1</sup>; SANTOS, Railson Schreinert dos<sup>2</sup>; PEGORARO, Camila<sup>3</sup>; KRÜGER, Mariana Madruga<sup>4</sup>; SANTOS, Fabiane Igansi de Castro dos<sup>5</sup>; SILVA, Raíssa Martins da<sup>6</sup>; MAIA, Luciano Carlos da<sup>7</sup>; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas – IB – UFPel; <sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia – CDTEC – UFPel;

<sup>3</sup>Doutoranda em Agronomia – CGF – FAEM – UFPel; <sup>4</sup>Mestranda em Agronomia – CGF – FAEM –

UFPel; <sup>5</sup>Colaboradora do Departamento de Fitotecnia – CGF – FAEM – UFPel; <sup>6</sup>Graduanda em

Agronomia – FAEM – UFPel; <sup>7</sup>Departamento de Fitotecnia – CGF – FAEM – UFPel.

[biancasfer@hotmail.com](mailto:biancasfer@hotmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos em todo o mundo principalmente nos países em desenvolvimento onde grande importância em nível social e econômico (GOMES e JUNIOR, 2004). A produção de arroz no Brasil é oriunda de dois sistemas de cultivo: de várzea (irrigado) e de terras altas (sequeiro). No RS se preconiza o sistema irrigado, pois representa a forma mais produtiva de arroz. Os solos de várzea apresentam deficiência natural de drenagem (hidromorfismo), consequência de relevos predominantemente planos. A ocorrência alternada de períodos de alagamento e drenagem favorece a acumulação de óxidos de ferro no solo. Este elemento está presente na solução do solo como  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  e complexos orgânicos, podendo ser absorvido pelas plantas nessas três formas (GOMES e JUNIOR, 2004).

Estresses bióticos e abióticos são fatores que afetam negativamente o crescimento e a produtividade das plantas cultivadas. Altas concentrações de um elemento no solo fazem com que esse seja absorvido em excesso, causando um estresse abiótico para a planta. A identificação de genes responsivos a diferentes estresses bióticos e abióticos é fundamental para a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas em diferentes condições de estresses.

ERFs são fatores de transcrição responsivos ao etileno (*Ethylene responsive factors*), são definidos pelo domínio AP2/ERF, que consiste de aproximadamente 60 aminoácidos e estão envolvidos na ligação de DNA (RIECHMANN et al., 2000). A caracterização do perfil transcricional de membros da família ERF, sob diferentes condições ambientais, pode ser utilizado na compreensão dos mecanismos de resposta a estresses nas plantas, podendo esses genes serem utilizados como marcadores moleculares na identificação de plantas e/ou genótipos tolerantes a estresses.

Os genes ERFs (AK106087 e AK067195) analisados neste estudo foram previamente identificados por Nakano et al. (2006), e analisados em plântulas de arroz sob diferentes condições de estresses biótico e abiótico por Pegoraro et al. (2012). Neste trabalho, os autores verificaram que os genes AK106987 e AK067195 foram responsivos aos estresses por *Magnaporthe grisea*, frio, seca e sal. Entretanto, a resposta desses fatores de transcrição frente ao estresse ocasionado pelo excesso de Fe ainda é desconhecida. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil de expressão de dois membros da família ERF sob diferentes tempos de exposição ao estresse ocasionado pelo excesso de Fe.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento CGF/FAEM/UFPeL. Sementes de arroz da cultivar *BR IRGA 409* foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril. Após as sementes foram acondicionadas em rolos de papel germinador, umedecido com água destilada e mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Plântulas com 15 dias foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de recipientes com capacidade para 4 litros contendo solução nutritiva de Camargo e Oliveira (1981) modificada. Os recipientes foram acondicionados em sala com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas durante 14 dias. Após este período, trocou-se a solução nutritiva, e procedeu-se a coleta das plântulas controle (0 hora). As demais plântulas foram transferidas para os recipientes contendo tratamento com Fe ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em pH  $4,0 \pm 0,1$ ). Após o início do tratamento foram coletadas a parte aérea das plântulas em 6, 12, 18 e 24 horas. As amostras foram congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da extração de RNA.

A extração de RNA total foi feita através do uso de *PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®)* seguida de tratamento com *DNAse I™ (Invitrogen®)* de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foi avaliada por espectrofotometria (260/280nm) e gel de agarose (2%p/v). Os cDNAs foram obtidos a partir de 2µg de RNA, utilizando o *SuperScript First-Strand System for RT-PCR kit (Invitrogen®)*.

As reações de qPCR foram realizadas em um equipamento modelo 7500 *Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)* utilizando o sistema de detecção *SYBR® Green (Applied Biosystems®, California, USA)*, a partir de: 2,0 µl de tampão 10x; 1,2 µl de  $\text{MgCl}_2$  50 mM; 0,4 µl de dNTPs 5 mM; 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM); 0,05 µl de Platinum Taq - DNA polimerase (5 U/µl); 2 µl de *SYBER green* (1x); 0,4 µl de ROX (50 x), 1 µl da primeira fita de cDNA (diluída 1:5, selecionada com base nos resultados das análises de validação) e água para completar o volume final de 20 µl.

As condições de amplificação foram as seguintes: 50°C por 2min, 95°C por 2 min, 40 ciclos de dois estágios (95°C por 3s, 60°C por 30s, seguido de curva de dissociação). O *Threshold Cycle* (CT) foi obtido e o nível de expressão relativa foi calculado com base na região exponencial da curva de amplificação da PCR (*Applied Biosystems®*). Para cada gene analisado um gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) foi usado como controle endógeno para quantificação do cDNA.

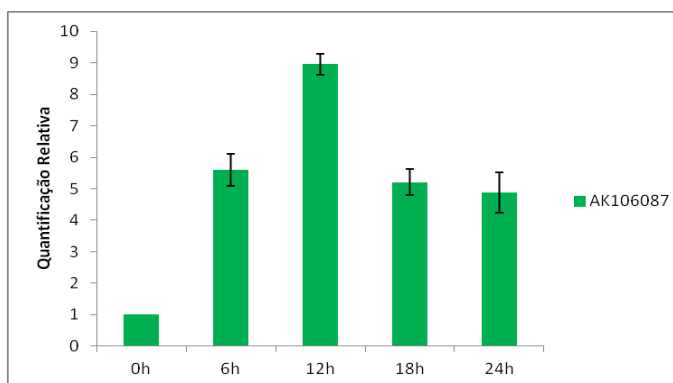
Os *primers* (Tabela 1) analisados foram construídos a partir de sequências obtidas no *Rice Annotation Project Data Base (RAP-DB)*, com auxílio do programa *Vector™ Advance NTI 11 (Invitrogen®)*. Os critérios para seleção de *primers* consistiram em um tamanho de *amplicon* entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60%, e temperatura de desnaturação variando entre 60 e 65°C, de acordo com as recomendações da *Applied Biosystems®*. Neste estudo utilizaram-se somente *primers* com curvas de dissociação com picos únicos e com eficiência de amplificação próxima a 100%. A quantificação relativa (QR) da expressão de cada gene foi feita pelo método de CT comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados para análise de expressão gênica por qPCR.

<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>
GAPDH_F	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT
GAPDH_R	CGTAACCCAGAATACCCTTGATTT
AK106057_F	GTGTGGAGGAGCACTGATCCCG
AK106057_R	CGCCACCACGCTTCTTCTTCTT
AK067195_F	GCTGTCTCGGGTGCGACTTCTT
AK067195_R	AGCAGCATAATCCGTGCGCCATT

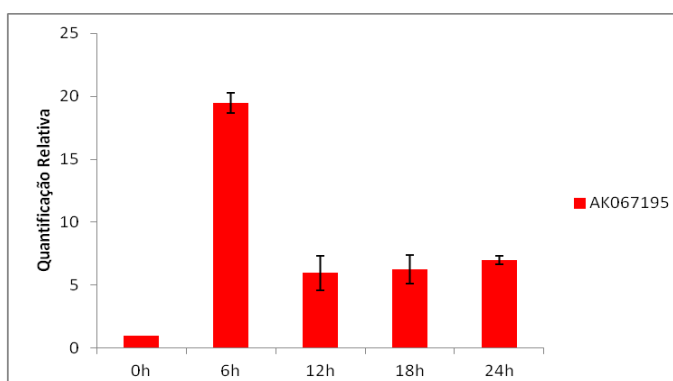
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os dois genes ERFs avaliados neste estudo são responsivos ao estresse ocasionado pelo excesso de Fe. O gene AK106987 apresentou um aumento linear no nível de expressão até 12 horas após o início do estresse, após esse período, houve um decréscimo na expressão, a qual se manteve constante até as 24 horas de exposição ao estresse (Figura 1).



**Figura 1:** Perfil de expressão relativa nos diferentes tempos de estresse por excesso Fe na cultivar BR-IRGA 409 para o gene AK106987.

O gene AK067195 apresentou um aumento drástico nos níveis de transcritos nas primeiras 6 horas de estresse. Após este período, houve uma queda brusca, que se manteve até as 24 horas de estresse (Figura 2).



**Figura 2:** Perfil de expressão relativa nos diferentes tempos de estresse por excesso Fe na cultivar BR-IRGA 409 para o gene AK067195.

O aumento no acúmulo de transcritos de ERFs nas primeiras horas de exposição ao estresse por Fe pode estar associado à indução da síntese de etileno, indicando que este hormônio está envolvido na fase inicial de resposta ao excesso de Fe. Em estudos prévios, Lucena et al. (2006) já haviam demonstrado a participação do etileno na regulação da transcrição dos genes que codificam para as proteínas *Iron 30 Regulated Transporter1*, *Ferric Reductase Oxidase* e *H<sup>+</sup>-ATPase*, proteínas relacionadas ao metabolismo do Fe nas plantas.

O perfil de expressão dos genes analisados indica que os ERFs AK106987 e AK067195 em arroz apresentam um papel muito importante na regulação da expressão gênica em resposta ao estresse por excesso de Fe. Neste sentido, acredita-se que estes fatores de transcrição atuam como sinalizadores de resposta primária ao estresse por Fe, desencadeando uma cascata de transdução de sinal, que resultará na ativação de genes responsivos ao estresse durante o processo de aclimatação.

#### 4 CONCLUSÃO

Os ERFs AK106987 e AK067195 são expressos como resposta primária ao estresse ocasionado pelo excesso de Fe.

#### 5 REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.

CAMARGO, C.E.O. DE OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v. 40, p. 21-23. 1981.

GOMES, A. da S.; JÚNIOR, A.M. de M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. **Methods**. v. 25, p. 402-408. 2001.

LUCENA, C.; WALTERS, B.M.; ROMERA, F.J.; GARCÍA, M.J.; MORALES, M.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H<sup>+</sup>-ATPase gene expression by affecting *FER* (or *FER*-like) gene activity. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, p. 4145-4154.

PEGORARO, C.; MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; FARIAS, D.R.; DA MAIA, L.C.; ROMBALDI, C.V.; COSTA DE OLIVEIRA, A. **Perfil de expressão de genes ERFs em diferentes condições de estresse**. (Dados não publicados).

RIECHMANN, J.L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O.J.; SAMAHA, R.R.; CREELMAN, R.; PILGRIM M.; BROUN, P.; ZHANG, J.Z.;GHANDEHA,RI D.; SHERMAN, B.K.; YU, G. Arabidopsis transcription factors: genome wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**. v. 290, p. 2105-2110. 2000.