

AVALIAÇÃO DO ACÚMULO DE TRANSCRITOS DO GENE ERF AK067195 EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR ANOXIA E HIPOXIA NA CULTIVAR DE ARROZ BONANÇA

SANTOS, Fabiane Igansi de Castro dos¹, PEGORARO, Camila², KRÜGER, Mariana Madruga³, SANTOS, Railson Schreinert dos⁴, MARINI, Naciele², MARTINS, Raíssa⁵, FERNANDES, Bianca Silva¹, COSTA DE OLIVEIRA, Antônio⁶.

¹Bióloga, Colaboradora do Centro de Genômica e Fitomelhoramento – UFPEL/FAEM; ²Doutorando(a) em Agronomia – UFPEL/FAEM; ³Mestranda em Agronomia – FAEM/UFPEL; ⁴Doutorando em Biotecnologia – CETEC/UFPEL; ⁵Graduanda em Agronomia – FAEM/UFPEL; ⁶Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPEL. santosfic@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A cultura do arroz possui importância social e econômica para o Brasil, principalmente para o Rio Grande do Sul, entretanto, muitas vezes as safras da cultura no estado são prejudicadas por danos causados por estresses abióticos, como baixas temperaturas e excesso de sal existente no solo e na água provenientes de irrigação. Dessa forma são necessários estudos que possibilitem a obtenção de genótipos tolerantes às condições de cultivo potencialmente prejudiciais. O trabalho de identificação de genes responsivos ao estresse abiótico surge como uma alternativa para elucidar as bases genéticas do caráter tolerância a baixas taxas de O₂.

Estresses abióticos como anoxia/hipoxia induzem uma série de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas. Compreender as respostas das plantas frente a estresses que perturbam o equilíbrio homeostático a nível celular e molecular faz-se fundamental para evitar perdas ocasionadas por estresses ambientais (SHANKER e VENKATESWARLU, 2011). A identificação de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância a deficiência de O₂ em arroz podem ser transferidos para outras espécies cultivadas sensíveis a hipoxia/anoxia, visando o desenvolvimento de genótipos tolerantes a essa condição adversa.

O etileno atua como sinalizador em resposta hipoxia e anoxia (CRAMER et al., 2011). Os fatores de transcrição responsivos ao etileno (*Ethylene responsive factors*) pertencentes à superfamília AP2/ERF, a qual contém também as famílias AP2 e RAV (RIECHMANN et al., 2000), estão presentes somente em plantas e apresentam função *trans-acting*, atuando na última etapa da transdução de sinal (OHME-TAKAGI e SHINSHI, 1995). Grande parte dos ERFs se liga especificamente ao motivo *GCC-Box* com domínio GCCGCC para modular a expressão de uma grande variedade de genes responsivos ao etileno, indicando que uma cascata de sinalização é envolvida na sinalização desse hormônio (OHME-TAKAGI e SHINSHI, 1995).

O gene ERF (AK067195) analisado neste estudo foi previamente identificado por Nakano et al. (2006) e analisado em plântulas de arroz sob condições de deficiência de O₂ por Pegoraro et al. (2012). Os autores verificaram que na cultivar Nipponbare (tolerante a baixas taxas de O₂) o gene AK067195 não foi alterado. Neste sentido, visando identificar a resposta deste gene em cultivar

sensível a baixas taxas de O₂, avaliou-se o acúmulo de transcritos deste gene em condições de estresse por anoxia e hipoxia na cultivar BONANÇA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de arroz da cultivar BONANÇA 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).

Decorrido 15 dias, procedeu-se a coleta de plântulas correspondente ao tratamento controle (tempo zero). As demais foram submetidas a estresse por anoxia e hipoxia. Para o estresse por hipoxia, as plântulas foram acondicionadas em recipientes de vidro repletos de água, e para o estresse por anoxia, as plântulas foram acondicionadas em recipientes de vidro com ausência de oxigênio através da injeção de nitrogênio gasoso (N₂). As plântulas permaneceram em ambos os estresses durante 24 e 48 horas. Decorrido este período, a parte aérea da plântula foi removida e congelada a -80°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 MgCl₂ 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, 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* (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), analisados foram construídos a partir de sequências obtidas no *Rice Annotation Project Data Base (RAP-DB)*, com auxílio do programa *Vector™ Advance NTI 11 (Invirogen®)*. Os critérios para seleção de *primers* consistiram em um tamanho de *amplicon* entre 50 e 150 pares de base (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*.

Primers	Sequência
GAPDH_F	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT
GAPDH_R	CGTAACCCAGAATACCCTTGATTT
AK067195_F	GCTGTCTCGGGTGCGACTTCTT
AK067195_R	AGCAGCATAATCCGTCGCCATT

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que o ERF AK067195 é responsivo por deficiência total ou parcial de O₂. Sob condições de anoxia verificou-se um aumento na expressão após 24 horas de estresse, e um decréscimo após 72 horas. Este gene apresentou comportamento similar em condições de hipoxia, porém em diferentes proporções, onde observou-se um aumento após 24 horas em hipoxia, seguido de um decréscimo nas 72 horas (Figura 1).

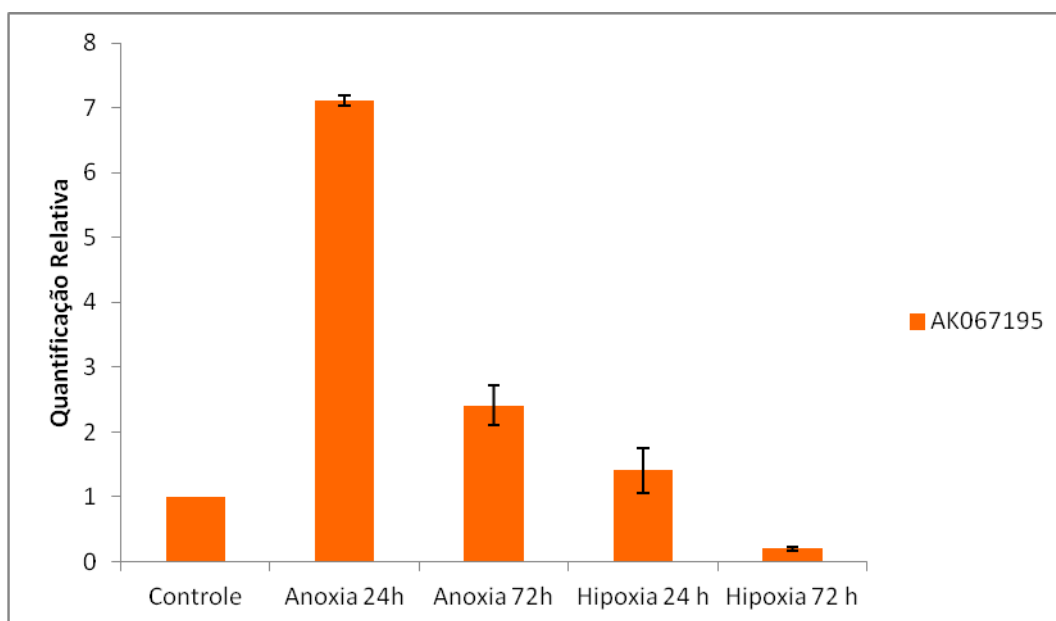


Figura 1: Perfil de expressão relativa nos diferentes tempos de estresse por anoxia e hipoxia na cultivar BONANZA.

A indução de genes ERFs sob baixas taxas de O₂ pode ser explicada pelo aumento nos níveis de produção de etileno nestas condições. Em arroz, o etileno acumulado nos tecidos submersos desencadeia uma série de respostas relacionadas à aclimação ao estresse, incluindo alongação dos entrenós, formação de raízes adventícias, desenvolvimento de aerênquimas e consumo de carboidratos. Essas modificações morfológicas são responsáveis pela sobrevivência das plantas de arroz sob condições de alagamento (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2008). Dessa forma, acredita-se que a indução do AK067195 seja necessária para ativar uma cascata de sinalização visando a adaptação da cultivar BONANZA sob condições de baixos níveis de O₂.

4 CONCLUSÃO

O gene AK067195 é responsivo ao estresse por deficiência de O₂ para a cultivar de arroz Bonanza.

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.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**. 11:163. 2011.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 105, p. 16814-16819, 2008.

OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **Plant Cell**. v. 7, p. 173-182. 1995.

OHNO, S. Evolution by gene duplication. Springer. New York, United States, 1970.

OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. 2007.

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

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.;GHANDEHARI D.; SHERMAN, B.K.; YU, G. Arabidopsis transcription factors: genome wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**. v. 290, p. 2105-2110. 2000.

SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. Abiotic stress response in plants. **Physiological, biochemical and genetic perspectives**. 346p. 2011.

