

EXPRESSÃO GÊNICA DE ERFs SOB CONDIÇÕES DE TOXICIDADE DE Fe NA CULTIVAR DE ARROZ BR IRGA 409

SILVA, Raíssa Martins¹; KRÜGER, Mariana Madruga²; PEGORARO, Camila³; SANTOS, Railson Schreinert dos⁴; FERNANDES, Bianca Silva⁵; SANTOS, Fabiane Igansi de Castro dos⁶; MAIA, Luciano Carlos da⁷; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio⁷.

¹Graduanda em Agronomia – FAEM – UFPel; ²Mestranda em Agronomia – CGF – FAEM – UFPel;

³Doutoranda em Agronomia – CGF – FAEM – UFPel; ⁴Doutorando em Biotecnologia – CDETC – UFPel; ⁵Graduanda em Ciências Biológicas – IB – UFPel; ⁶Colaboradora do Departamento de Fitotecnia – CGF – FAEM – UFPel; ⁷Departamento de Fitotecnia – CGF – FAEM – UFPel.

raissamartinss@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa L.*) é um dos mais importantes grãos, sob aspectos econômicos, sociais e culturais do mundo. No Brasil, esse cereal apresenta uma vasta importância econômica, principalmente na Região Sul. O crescente aumento da população mundial implica em uma maior demanda produtiva e de alta qualidade do arroz, mas a produção desta cultura enfrenta ação de diversos fatores bióticos e abióticos, entre estes a toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos que limitam a produção de arroz irrigado a nível mundial.

No Rio Grande do Sul há predominância de solos hidromórficos, que apresentam deficiência natural na drenagem e também pelo material de origem ser rico em ferro (Fe^{2+} , Fe^{3+} e complexos orgânicos), frequentemente se observa um aumento de ferro disponível na solução do solo, sendo possível alcançar níveis tóxicos nessa condição, ocorrendo perdas consideráveis na produção que podem representar até 100% de redução no rendimento, dependendo do nível da toxidez e da tolerância dos cultivares de arroz (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004)

Para suprir essa necessidade de produção, é preciso novas tecnologias que favoreçam o estudo e a obtenção de cultivares tolerantes e/ou resistentes. Para isso, técnicas como a verificação de genes responsivos ao estresse podem ser usadas. Em condições de estresses bióticos e abióticos, ocorre a indução da produção de etileno. Genes ERFs (*Ethylene responsive factors*) são fatores de transcrição responsivos ao etileno, responsáveis pela ativação de genes de resposta a estresses.

Os genes ERFs (AK107119 e AK062882) 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 AK107119 e AK062882 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 trabalho foi realizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

Plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) do genótipo BR IRGA 409 foram utilizadas neste estudo. Inicialmente, as sementes foram tratadas por 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 4L 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 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$). 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°C até o momento da extração de RNA.

A extração de RNA total foi realizada 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 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*.

Primers	Sequência
GAPDH_F	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT
GAPDH_R	CGTAACCCAGAATACCCTTGATTT
AK107119_F	CCTCCTCCGTCTCCGTCTCCTT
AK107119_R	CGTGTTTGGGCTTGGAGCTCTT
AK062882_F	GCCAGCAGCGAGAGAACACAAA
AK062882_R	TACTCCTGGTTGCCTCCCATGG

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que os genes ERFs avaliados neste estudo são responsivos ao estresse ocasionado pela toxicidade de Fe em arroz. O gene AK107119 apresentou um aumento linear no nível de expressão até 12 horas após o início do estresse, após esse período, houve um decréscimo na expressão, seguida por um aumento nas 24 horas de exposição ao estresse (Figura 1).

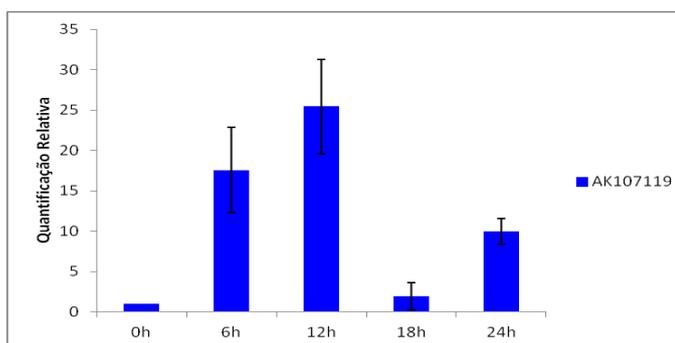


Figura 1: Perfil de expressão relativa nos diferentes tempos por excesso de Fe na cultivar BR-IRGA 409 para o gene AK107119.

O gene AK062882 apresentou comportamento similar ao gene AK10719, onde verificou-se um aumento drástico nos níveis de transcritos nas primeiras 12 horas de estresse. Após este período, houve uma queda brusca, seguida de um aumento no final do período do estresse testado (Figura 2).

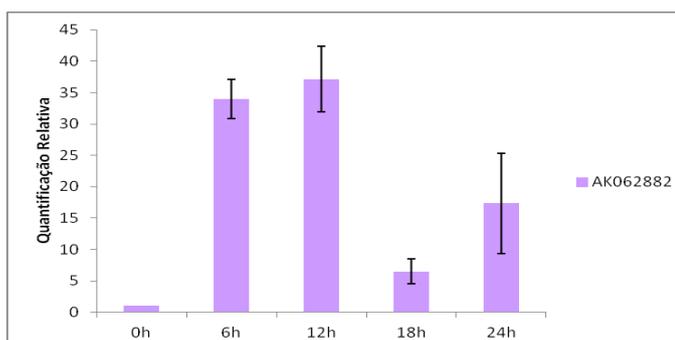


Figura 2: Perfil de expressão relativa nos diferentes tempos por excesso de Fe na cultivar BR-IRGA 409 para o gene AK062882.

Neste trabalho, a toxicidade por Fe em arroz induziu a expressão precoce de genes ERFs, sugerindo que a ativação desses fatores de transcrição coordenam uma rede de sinalização de genes associados a resposta a estresse e a mecanismos de defesa.

4 CONCLUSÃO

Os ERFs AK107119 e AK062882 são expressos precocemente ao estresse por toxidez de Fe.

5 REFERÊNCIAS

AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa, **J. Agron. Crop Sci.** v.195, n.1, p.66-76, 2009.

BENCKISER, G., OTTOW, J. C. G., SANTIAGO, S., WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Baños, The Philippines. 1982.

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.

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).

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutr.** v..27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p. 34–35. 1996.