

EXPRESSÃO DO GENE *HSP17.9ACI* EM PLÂNTULAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR ANOXIA

KRÜGER, Mariana Madruga¹, PEGORARO, Camila¹, MERTZ, Liliane Marcia², ROMBALDI, Cesar Valmor², COSTA DE OLIVEIRA, Antonio¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, UFPel/FAEM, Centro de Genômica e Fitomelhoramento, C.P. 354, CEP 96010-900, Pelotas-RS, Brasil. E-mail: mariana-kruger@hotmail.com.

² Universidade Federal de Pelotas, UFPel/FAEM, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, C.P. 354, CEP 96010-900, Pelotas-RS, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os estresses abióticos mais estudados, e que estão em consonância com as alterações ambientais, estão, à exposição à radiação UV, as temperaturas extremas, as variações hídricas e salinas, e as reduções de taxas de oxigênio.

As plantas em condições naturais ou experimentais podem ser submetidas à disponibilidade de oxigênio variando desde os teores normais (normoxia) passando pela deficiência (hipoxia) ou até mesmo pela ausência (anoxia) (SOUZA e SODEK, 2002). Normalmente baixas concentrações de oxigênio estão associadas com a ocorrência de solos compactados ou encharcados. A deficiência de oxigênio em plantas altera o metabolismo celular, afetando o crescimento e o desenvolvimento vegetal e conseqüentemente, a produtividade e a qualidade do produto. Também diminui a produção de ATP com diversas conseqüências para o metabolismo celular primário, com reflexos nas vias do metabolismo secundário (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2004).

Dentre as proteínas que parecem estar associadas à tolerância às baixas taxas de oxigênio, estão as HSPs (*Heat shock proteins*). Proteínas HSPs são componentes fundamentais que contribuem para homeostase celular, em condições ideais ou adversas de crescimento. São responsáveis pela correta aquisição da conformação de proteínas, pela prevenção da agregação protéica, pelo controle de modificações pós-traducionais, translocação e degradação de proteínas em uma ampla variedade de processos celulares. Também apresentam função na estabilização das proteínas e membranas, podendo desempenhar um papel fundamental na proteção das plantas, grãos, sementes e frutos frente a diversos tipos de estresses, por restabelecer a conformação de proteínas e, como conseqüência, a homeostase celular (WANG et al., 2004).

A utilização do arroz (*Oryza sativa*) como modelo para estudos de mecanismos de tolerância ao estresse ocasionado pela restrição de oxigênio, constitui-se em uma excelente opção, tendo em vista que se dispõe de constituições genéticas com variabilidade de comportamento frente a esse evento, como é o caso do cultivo em solos encharcados, sob alagamento. Além disso, as sementes de arroz são capazes de germinar inclusive na ausência de oxigênio (anoxia), apresentando apenas um alongamento do coleóptilo em relação ao crescimento em condições aeróbias, o que torna esse tecido particularmente interessante em estudos de mecanismo de tolerância à anoxia (LASANTHI-KUDAHETTIGE, 2007).

Diante do exposto o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de expressão do gene *sHSP17.9ACI* em plântulas de arroz submetidas ao estresse por anoxia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de arroz da cultivar Nipponbare foram desinfestadas com água sanitária diluída (15 minutos de incubação em hipoclorito de sódio 1,7%) e posteriormente enxaguadas por dez vezes com água esterilizada. Em seguida, realizou-se a semeadura em papel filtro estéril. Sete dias após a instalação do experimento as plântulas foram acondicionadas em frasco com injeção de nitrogênio gasoso para indução de anoxia. As amostras permaneceram incubadas em ambiente de anoxia, em temperatura de 28°C no escuro, por períodos de 0, 24, 48 e 72 horas. Após a coleta, as amostras permaneceram armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA.

A extração do RNA total foi realizada através da utilização do reagente Trizol (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante. Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com DNase e tiveram sua pureza e integridade mensuradas através de análises de absorvância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose.

Para a síntese do cDNA foram utilizadas três repetições biológicas, cada repetição consistiu de RNA total extraído de raízes de arroz provenientes de quinze plântulas. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa, a partir de no mínimo 2µg de RNA total em um volume final de 20µL, utilizando-se a enzima *SuperScript II*[®] (Invitrogen). Foram desenhados *primers* para o gene correspondente a proteína HSP17.9.ACI com auxílio do programa *Primer Express*[®] (Applied Biosystems), observando os parâmetros de temperatura de anelamento, tamanho do *primer*, porcentagem de GC, tamanho do fragmento amplificado, ausência de dimerização e a inexistência de sítios secundários de anelamento.

Para cada gene, foi efetuada a quantificação relativa através da PCR em tempo real (RT-qPCR). Foi utilizado o kit *SYBR*[®] *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em termociclador ABI PRISM[®] 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Como normalizador utilizou-se actina. Foram obtidas curvas de eficiência de amplificação dos *primers* correspondente ao gene estudado e ao gene normalizador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a Figura 1, é possível observar um aumento no nível de transcritos do gene *HSP17.9.ACI* após as plântulas de arroz terem sido submetidas ao tratamento com anoxia. Maior acúmulo de transcritos foi observado 72 horas após o estresse, onde houve incremento de aproximadamente 60 vezes.

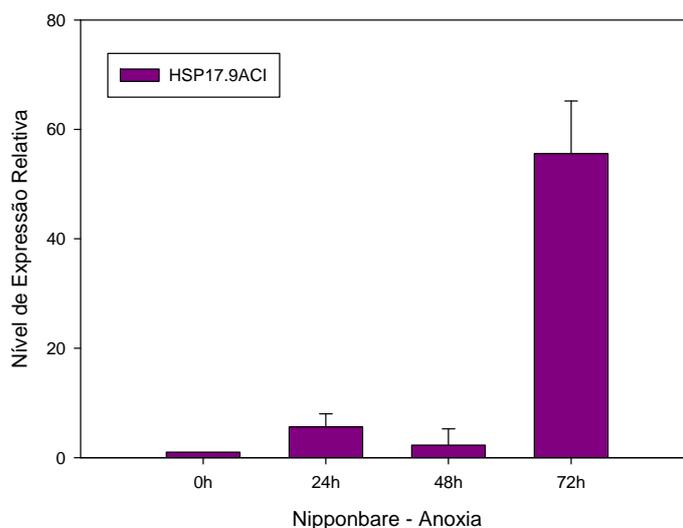


Figura 1. Nível de expressão relativa avaliado através de PCR em tempo real, em raízes de plântulas de arroz da cultivar Nipponbare submetida ao estresse por anoxia - (0, 24, 48 e 72 horas após o estresse).

Estudos anteriores conduzidos com arroz, avaliando o perfil de expressão em resposta a anoxia, afirmam que proteínas HSPs estão envolvidas em mecanismos de resposta a estresses bióticos e abióticos. As HSPs são classificadas em famílias de acordo com o seu peso molecular, compreendendo as HSP100, HSP90, HSP70/DnaK, HSP60/GroE e as proteínas de baixo peso molecular (sHSP ou *small* HSP) que variam de 16-42 kDa (SARKAR, 2009). Dentre as cinco famílias de HSPs, as *small* HSPs são as predominantes em plantas, sintetizadas em resposta ao calor e a outros tipos estresses. HSPs podem ajudar no re-novelamento de proteínas em condições de estresse para restabelecer a homeostase celular e cooperar com outras proteínas e componentes celulares em muitos processos celulares normais (WANG et al., 2004).

No caso desse estudo, o gene correspondente a proteína *small* HSP17.9.ACI mostrou possuir relação com o mecanismo de tolerância ao estresse por anoxia.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo observou-se aumento nos níveis de transcritos da proteína sHSP17.9.ACI em resposta ao estresse por anoxia, sugerindo a participação da mesma no mecanismo de tolerância a esse estresse.

5 REFERÊNCIAS

FUKAO, T; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hipoxia – is survival a balancing act **Trends in plant science**, v.9, p.449-456, 2004.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. **Plant Physiology**, v.144, p.218-231, 2007.

SOUZA, C.A.F., SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.83-94, 2002.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v.9, n.5, p. 244-252, 2004.