

PROSPECÇÃO DE MARCADORES DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓICO PARA AVEIA (*Avena sativa* L.) E TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

SANTOS, Railson Schreinert dos¹; PEGORARO, Camila²; KRÜGER, Mariana Madruga²; MAIA, Luciano Carlos da²; ROMBALDI, Cesar Valmor³; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio⁴

¹ Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) – Universidade Federal de Pelotas (UFPel) –
rschsan@yahoo.com.br;

² Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento (LGF) – UFPel;

³ Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – UFPel;

⁴ LGF – UFPel – acostol@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Ainda que as tecnologias de sequenciamento tenham evoluído rapidamente, a busca de informações sobre diferentes organismos através do uso desta técnica ainda é bastante cara e relativamente lenta, já que, após a obtenção das sequências é necessário um grande número de etapas para avaliação e validação das funções biológicas de cada segmento de DNA.

Estudos de genômica comparativa geralmente têm como foco genes sintênicos. A sintenia tem sido usualmente referida como a conservação de blocos de ordem entre grupos de cromossomos que estão sendo comparados (MYERS, 2008). Estes estudos comparativos possibilitam a aplicação de informações obtidas sobre algumas espécies, especialmente as chamadas “modelo”, à outras. Tais organismos modelo são, geralmente, espécies com maior potencial para estudos, devido às suas características como: genoma compacto, ciclo de vida curto, fácil manipulação experimental, técnicas de modificação genética bem calibradas e requerimentos para cultivo/criação não muito complexos.

Com protocolos de transformação genética relativamente eficientes, mapas genéticos e físicos de alta densidade e alto grau de sintenia com outros cereais, o arroz (*Oryza sativa* L.), o qual tem um pequeno genoma de aproximadamente 390Mb, é, atualmente, considerado o organismo modelo para gramíneas (plantas da família Poaceae) e os estudos sobre o seu genoma têm sido muito usados para outras gramíneas cultivadas, como é o caso da aveia (*Avena sativa* L.) e do trigo (*Triticum aestivum* L.).

Para atender a demanda de informação em diferentes estudos, a análise de sintenia entre genomas de diferentes espécies, bem como a possibilidade de utilização de iniciadores (*primers*) desenhados para espécies aparentadas, também chamada transferibilidade de *primers*, tem sido amplamente utilizada atualmente.

Estresses ambientais afetam negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, as quais, durante sua evolução, desenvolveram mecanismos para responder à estes estímulos através da indução ou repressão de genes. Estes estresses podem ameaçar a agricultura e a segurança alimentar, assim o emprego de novas técnicas para entender e manipular a resposta dos vegetais diante desses estresses têm sido constantemente reportado na literatura (PAREEK *et al.*, 2010).

Redes regulatórias complexas estão envolvidas nas mudanças induzidas por estresse e, em muitos casos, esses processos são dirigidos por fitohormônios como o etileno (YANG *et al.* 2011).

Além disso, estudos recentes demonstram uma redução da ligação do precursor da subunidade menor da Rubisco (pRSS) ao envelope do cloroplasto devido à uma repressão da transcrição dos translocons (complexos TIC e TOC) em ervilha (*Pisum sativum* L.) estressada (DUTTA *et al.*, 2009). A família de proteínas carregadoras mitocondriais também apresentam regulação sensível ao estresse, sugerindo que este altera a necessidade de transporte de metabólitos através das membranas mitocondriais (AKEN *et al.*, 2009).

Estresses também podem causar perda na função protéica. As *Heat-Shock-Proteins*¹ (HSPs) são importantes na manutenção das conformações funcionais das proteínas, bem como prevenir sua agregação, assistir seu renovelamento, estabilizar as membranas, entre outros processos que mantêm a homeostase celular são muito importantes para a sobrevivência celular (WANG *et al.*, 2004).

O estresse por encharcamento constitui forte limitação abiótica à produtividade agrícola e também é um importante direcionador da evolução adaptativa. Enzimas da rota fermentativa, como *Alcohol Dehydrogenase* (ADH) e *Pyruvate Decarboxylase* (PDC) têm importância na tolerância à hipoxia.

O objetivo do presente trabalho foi a prospecção de marcadores relacionados ao estresse abiótico para trigo e aveia, baseado na transferência de marcadores validados em arroz e testados através de Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) semi-quantitativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e Extração de DNA: Sementes de arroz (cultivar *Nipponbare*), trigo (cultivar *CD150*) e aveia (cultivar *Albassul*) foram devidamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio e então cuidadosamente colocadas em papel germinador umedecido. Logo após os rolos de papel germinador foram colocados em câmaras BOD (25°C; 16 horas de fotoperíodo; durante 15 dias). Após este período, regiões saudáveis da parte aérea das plântulas, foram selecionadas e maceradas com nitrogênio líquido, procedendo-se a extração de DNA de acordo com o protocolo do produto comercial *DNeasy Plant Mini Kit*[®] (Qiagen[®]).

Desenho dos Primers e Reação de PCR: Para avaliar a transferibilidade de *primers* de arroz para aveia e trigo, consultou-se o *Rice Annotation Project Data Base* (RAP-DB) para obtenção de sequência de genes relacionados a: resposta à etileno (Sub1C), proteínas de transporte das membranas mitocondrial e plastidial (TIC 62; TOM7), da via fermentativa (ADH; PDC) ou diretamente relacionados à hipoxia (*Alternative Oxidase* - AOX), modificações pós-traducionais (*Heat-Shock Factors* - HSFA3; *Heat-Shock Proteins* - HSP90, HSP 70) bem como um controle endógeno (*Ubiquitin* - Ubi).

Os *primers* ([Tabela 1](#) ~~Tabela 1~~), foram desenhados obedecendo regras propostas pela *Applied Biosystems*[®], para síntese de iniciadores próprios para reações em PCR quantitativa (*qPCR*), o que possibilitaria uma futura

¹ Fatores de transcrição responsáveis pela ativação de genes codificadores de HSPs são chamados *Heat Shock Factors* (HSFs), tendo-se avaliado o HSFA3 neste trabalho.

análise/validação destes para estudos de expressão gênica. Para realização do desenho destes *primers* utilizou-se o programa *Vector™ Advance NTI 11 (Invitrogen®)*.

Tabela 1 Sequência dos *primers* desenhados.

Nº Gel	Nome	Primer Sequence
Controles Endógenos		
1	Ubi	F: TACTTGCCGAAAGTGCTGATCGAAA
	AK103230*	R: CACTTCCA TCCTGTAGGTGGCACAA
Ethylene Response Factors²		
2	Sub1C	F: GCGACATGCGCTTCTGGAGCTA
	AK072749*	R: TTAGGCGAGTCGCATGTCAAGGTT
Proteínas de Transporte da Membrana Mitocondrial ou Plastidial		
3	TIC 62	F: ATCGTGTCGGCCA TTGGCAA
	AK065110*	R: TGCAGCCTGCACGAGGTTGTT
4	TOM7	F: GAAGCCGAAGCCCAAGGTCAA
	AK122071*	R: TGGTCCACGTGGTCCACTCCTT
Via Fermentativa ou Diretamente Relacionado à Hipoxia		
5	ADH	F: CTTGCACCTTCTGCGGCCTAA
	AK069330*	R: TCGACGGTGGCGATATTTGGTCTA
6	PDC	F: ACCCCCACTTCATCGGCACCTA
	AK119500	R: CATTGAAGATTGGCCCTGCGAA
7	AOX	F: AGAACGAGCGCATGCACCTGAT
	AK064040*	R: AGAAGACGCCCTGGACGGTGAT
Heat Shock Factor		
8	HSFA3	F: AGCCTGGCTCTTCTGGTGAA
	AK101934*	R: CAGCCTGGTCACCTCCTGAA
Heat Shock Proteins		
9	HSP90	F: TTTGGGCGAAGGTGACACTGCTA
	AK102478*	R: TGGCAA TGGTCCCAAGGTTCTTAAT
10	HSP 70	F: GCCAAGCGTCAAGCAGTGACCAA
	AK103835*	R: GGTCA TCAAAGCGCCGCCCTAT

*Número de identificação no *RAP-DB*

A PCR semiquantitativa, para verificação da presença dos genes nos diferentes genomas, bem como o reconhecimento dos genes pelos *primers* foi feita com a utilização do produto comercial *GoTaq® Green Master Mix (Promega®)*, sendo a amplificação realizada de acordo com as seguintes temperaturas e tempos: Desnaturação inicial (94°C, durante 10 minutos); 40 ciclos (Desnaturação 94°C, durante 30 segundos; Anelamento 60°C, durante 45 segundos; Extensão 72°C, durante 1 minuto e 30 segundos); Extensão final (72°C, durante 7 minutos). Após a amplificação as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1%) a 95V por 20 minutos. Um gradiente de DNA (*DNA low mass ladder - Invitrogen®*) foi corrido em conjunto com os geis, ocupando a primeira pista de cada, possibilitando a quantificação aproximada do tamanho de cada *amplicon*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado da amplificação dos fragmentos flanqueados pelos *primers*, feita através PCR semi-quantitativa é apresentado na [Figura 1](#) ~~Figura 1~~.

² Fatores de transcrição responsivos ao etileno.

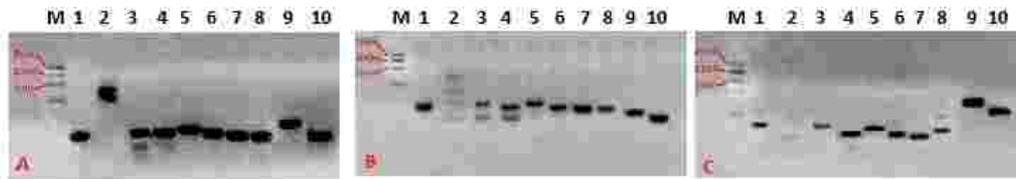


Figura 1 Amplificação dos *primers*: Gel A: Genoma do arroz; Gel B: Genoma do aveia; Gel C: Genoma do trigo.*Números correspondentes aos nomes dos *primers*, exibidos na Tabela 1. **As pistas foram corridas separadamente e remontadas em editor de imagem.

Analisando-se o gel verifica-se a obtenção de bandas para quase todos os genes, exceto para o Sub1C em trigo, o qual, muito provavelmente, é um gene que tenha se originado após a divergência entre estas espécies. O controle endógeno apresentou uma banda extra (inespecífica) em trigo. Observou-se ampliações inespecíficas ainda para os genes TIC62, TOM7 e ADH em aveia, bem como uma para o HSFA3, em trigo. A grande maioria dos *primers* apresentam amplificação específica e a possibilidade de seu uso para outras finalidades, como quantificação da expressão gênica (*qPCR*), ainda por ser avaliada, é interessante.

4. CONCLUSÕES³

Os resultados obtidos na avaliação dos *primers*, demonstram que estes são eficientes para amplificar os genomas da aveia e do trigo

Os resultados apresentados aqui justificam o investimento em estudos mais aprofundados, como um sequenciamento futuro destes *amplicons*, verificando se estes são de fato os genes correspondentes aos *primers* utilizados.

A possível utilização destes *primers* em estudos futuros sobre a biologia de gramíneas é algo interessante para ser verificado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEN, O.V.; ZHANG, B.; CARRIE, C.; UGGALLA, V.; PAYNTER, E.; GIRAUD, E.; WHELAN, J. Defining the Mitochondrial Stress Response in *Arabidopsis thaliana* **Molecular Plant** v.2; n.6; p. 1310-1324, 2009.

DUTTA, S.; MOHANTY, S.; TRIPATHY B.C. Role of Temperature Stress on Chloroplast Biogenesis and Protein Import in Pea **Plant Physiology**, Waterbury, v. 150, p. 1050-1061, 2009.

MYERS, P. Synteny: Inferring ancestral genomes. **Nature Education**, London, v. 1, n.1, 2008.

PAREEK, A.; SOPORY, S.K.; BOHNERT, H.J.; **Abiotic Stress Adaptation in Plants**. Dordrecht : Springer, 2010.

YANG, C.; HSU, F.; LI, J.; WANG, N.; SHIH, M. The AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia. **Plant Physiology**, Waterbury, p. 1-40, 2011.

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

TANG, H.; BOWERS, J.E.; WANG, X.; MING, R.; ALAM, M.; PATERSON, A.H. Synteny and Collinearity in Plant Genomes **Science**, Washington, v. 320, n. 5875, p. 486-488, 2008.

³ **Agradecimentos:** À Capes, CNPq e Fapergs pelo suporte financeiro na realização do trabalho.