

ACÚMULO DE TRANSCRITOS DE GENES DOS COMPLEXOS TIM/TOM E TIC/TOC EM PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS À ESTRESSE POR ANOXIA

**KRÜGER, Mariana Madruga¹; SANTOS, Railson Schreinert dos²;
PEGORARO, Camila¹; MERTZ, Liliane Márcia¹; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio³**

¹Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Departamento de Fitotecnia/Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento - mariana-kruger@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec)

³Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Departamento de Fitotecnia/Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento – acostol@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A anoxia é um dos principais estresses abióticos que pode afetar o crescimento e desenvolvimento de plantas. Ela ocorre quando a concentração de oxigênio do ambiente é menor que 2% (Skutnik and Rychter, 2009), essa condição ocorre em situações de completa submersão, o que causa um estresse complexo devido a uma redução de 10.000 vezes na difusão de oxigênio e dióxido de carbono, assim como a restrição da disponibilidade de luz (Fukao and Bailey-Serres, 2008). Além disso, a deficiência de oxigênio reduz a eficiência da produção de ATP celular, o qual tem importância em diversas reações do metabolismo celular (Fukao et al., 2004). Essa condição tem efeito dramático no crescimento e produtividade de plantas cultivadas, pois a maioria das espécies de importância econômica é intolerante ao alagamento (Perata and Voesenek, 2007).

A mitocôndria é o centro de regulação da produção de energia celular e do balanço redox, e integra numerosas rotas metabólicas que são importantes na resposta a adaptação condições ambientais extremas (Sweetlove et al., 2007).

Os cloroplastos também têm papel importante na homeostase celular, incluindo reciclagem de carbono, biossíntese de pigmentos, vitaminas, aminoácidos aromáticos e hormônios. Entretanto o núcleo tem controle majoritário sobre essas organelas, utilizando um processo de sinalização retrograda e anteretrograda.

A importação de proteínas para a mitocôndria e cloroplastos envolve complexos de proteínas formados por sub-unidades localizadas nas membranas das organelas. Na mitocôndria, esses complexos são chamados Tim/Tom, enquanto que nos cloroplastos são chamados TIC /TOC.

As membranas internas e externas da mitocôndria contêm um maquinário com múltiplas subunidades para importar proteínas codificadas pelo núcleo,

denominadas translocon da membrana externa da mitocôndria (TOM – em inglês) e translocon da membrana interna da mitocôndria (TIM) (Neupert, 1997). Recentemente, muitas proteínas TIM e TOM foram identificadas como sendo envolvidas no reconhecimento e translocação de pré-proteínas.

A importação de proteínas pelo cloroplasto é mediada por um complexo de translocons, o qual é composto pela proteína translocon da membrana externa do cloroplasto (TOC), pela proteína translocon da membrana interna do cloroplasto (TIC) e por chaperonas estromais (Soll and Schleiff, 2004).

Danos nas membranas de cloroplastos e mitocôndrias impedem a entrada de proteínas codificadas pelo genoma nuclear, as quais tem funções vitais nessas organelas, assim podendo levar à morte da planta. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o acúmulo de transcritos dos genes codificadores para proteínas atuantes nos complexos TIM/TOM e TIC/TOC envolvidos na importação de proteínas para a mitocôndria e cloroplastos em plantulas de arroz submetidas à estresse por anoxia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) do genótipo IPSL2070 foram usadas neste estudo. Sementes foram tratadas por 15 min em hipoclorito de sódio a 0,5%, acidificado para pH 5,5, seguido de dez lavagens com água estéril e germinadas em papel filtro estéril a 25°C. Plântulas com 15 dias foram submetidas a estresse por anoxia durante 0h, 24hs, 48hs e 72hs, usando recipientes de vidro de 0,5 L com 100% de sua atmosfera preenchida por N₂. Os frascos foram mantidos no escuro. Cada repetição biológica consistia de 15 plântulas. Após cada período, folhas de arroz foram coletadas e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA total.

As análises de qRT-PCR foram realizadas com o objetivo de quantificar quatro importantes translocons em arroz: *Tom7-Os01g0626300*: F_GAAGCCGAAGCCCAAGGTCAA e R_TGGTCCACGTGGTCCACTCCTT, *TIM17/22-Os02g0717300*: F_GGGCTCATCCGGACGCTCAA e R_ACGAGCTGCTCGACGCCGAT, *TOC24-Os01g0969000*: F_GGCCGCCGGCAATAATAAGG e R_GCACGTCCTCCTCCTCCAGCTT e

Tic62-Os10g0100300: F_ ATCGTGTCGGCCATTGGCAA e
R_ TGCAGCCTGCACGAGGTTGTT.

Sequências foram obtidas no *RAP-DB (The Annotation Project Data Bank)* (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Os *primers* foram desenhados usando o programa *Vector™ (Invitrogen™)*. A seleção dos *primers* foi feita de acordo com os parâmetros estabelecidos pela *Applied Biosystems™*. O RNA total foi extraído de 0,1g de tecido foliar a partir de um *pool* de 15 plântulas usando *Trizol™ Reagent (Invitrogen™)*, seguido de tratamento com *DNAse I™ Amplification Grade (Invitrogen™)*. A qualidade e quantidade do RNA foram medidas por eletroforese e espectrometria. cDNAs foram obtidos a partir de 2 µg de RNA usando *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen™)*. qPCR foi realizado usando *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems™)*. O *Threshold cycle (CT)* foi obtido e o nível de expressão relativa foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Pfaffl (2001). O gene *Actina (F_CAGCCACACTGTCCCCATCTA e R_ AGCAAGGTGCGAGACGAAGGA)* foi utilizado como controle endógeno para fins de quantificação relativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

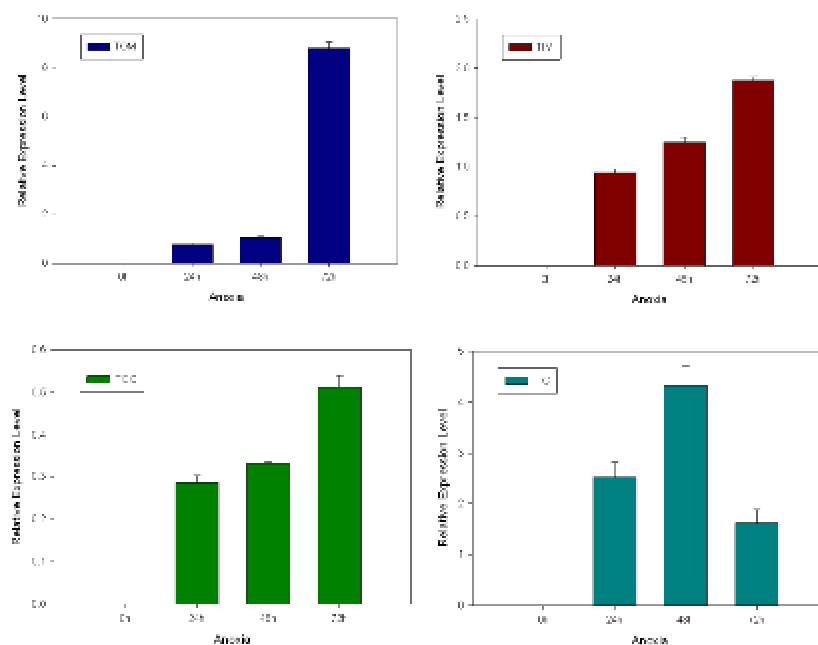


Figura 1: Perfil de expressão transcricional dos genes TOM, TIM, TOC e TIC em arroz submetidos a condição de anoxia durante 0h, 24hs, 48hs e 72hs.

O acúmulo de transcritos dos genes dos complexos TIM/TOM estudados (Figura 1) foi significativamente aumentado em função da exposição das plântulas

ao estresse por anoxia. Esse comportamento também foi observado no gene *Toc24-Os01g0969000*, embora em menor proporção. O gene *Tic62-Os10g0100300* atingiu o maior nível de expressão em plântulas submetidas à 48hs de anoxia. Esses resultados sugerem que há uma alta demanda pela importação de proteínas por parte dessas organelas quando a plântula é submetida à estresse por anoxia, essa maior demanda provavelmente promove a ativação transcricional dos genes dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC estudados.

4. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi observado que os genes envolvidos nos complexos TIM/TOM e TIC/TOC estudados são ativados em arroz submetido à estresse por anoxia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUKAO, T., and BAILEY-SERRES J. Plant responses to hypoxia is survival a balancing act? **Trends Plant Sci.** USA, v.9 n.9 p.449-456, 2004.

FUKAO, T., AND BAILEY-SERRES, J., Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by *SLR1* and *SLRL1* restriction of gibberellin responses in rice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA, v.105, p.16814-16819, 2008.

KESSLER, F., AND SCHNELL, D.J. The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. **Traffic.** USA, , v.7 n3 p. 248-257, 2006.

NEUPERT, W. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends Plant Sci.**v. 66 n 2 p.863-917,1997.

PERATA, P., AND VOESENEK, L.A.C.J. Submergence tolerance in rice requires *Sub1A*, an ethylene-response-factor-like gene. **Trends Plant Sci.** v.12 p. 43-46, 2007.

SKUTNIK, M., AND A.M. RYCHTER. Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. **J. Plant Physiol.** v.166 n9 p.926-937, 2009.

SWEETLOVE, L.J., A. FAIT, A. NUNES-NESE, T. WILLIAMS, AND A.R. FERNIE. 2007. The Mitochondrion: An Integration Point of Cellular Metabolism and Signalling. **Cr Rev Plant Sci.** v. 26 n1 p.17-43, 2007.