

CONTEÚDO DE PROLINA E EXPRESSÃO DE GENES DO SEU METABOLISMO EM PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO MODERADO

Priscila Ariane Auler¹, Marcelo Nogueira do Amaral², Tatiana Rossatto², Gabriela dos Santos Rodrigues³, Alexandre Pereira Leivas³, Cristini Milech², Isabel Lopes Vighi⁴, Letícia Carvalho Benitez⁴, Eugenia Jacira Bolacel Braga⁵

Palavras-Chave: *Oryza sativa* L., *Imprint*, ajuste osmótico.

INTRODUÇÃO

A melhoria na estabilidade de produção dos genótipos em ambientes propensos ao déficit hídrico é de grande importância para a cultura do arroz de sequeiro e pode ser feita por meio do melhoramento genético com a identificação de características que possam contribuir para a tolerância à seca (BABU et al., 2003).

Atualmente, diversas pesquisas têm demonstrado que se as plantas passam por momentos de exposição a estresses prévios, tendem a apresentar mecanismos de memória celular que permitem que as mesmas se tornem mais tolerantes a futuras exposições. Com isso, memória de estresse ou *Imprint* é definida como modificações estruturais, genéticas e bioquímicas que ocorrem como consequência de um contato anterior ao fator de estresse, tornando as plantas, em geral, mais resistentes para futuros eventos desfavoráveis de mesma natureza (THELIER; LÜTTGE, 2012).

As plantas em condição de deficiência hídrica, exigem a ativação de um ajuste osmótico para manter o potencial hídrico, turgor e homeostase celular. O ajuste osmótico é um mecanismo que se estabelece mediante o acúmulo de solutos compatíveis, como a prolina, que contribuem para a manutenção do equilíbrio hídrico e preservação da integridade de componentes em condições de estresse (MARIJUAN; BOSCH, 2013).

A prolina pode ser sintetizada por duas rotas, a rota do glutamato e a da ornitina. Em condições de estresse osmótico, a rota via glutamato é a responsável pelo maior acúmulo deste aminoácido (HAYAT et al., 2012). A biossíntese de prolina ocorre, geralmente, no citosol de maneira constitutiva, sendo controlada pelo gene *P5CS2* (*pirrolina-5-carboxilato sintetase 2*). Por outro lado, em condições de estresse, sua biossíntese é aumentada nos cloroplastos, sendo controlada, principalmente, pelo gene *P5CS1* (*pirrolina-5-carboxilato sintetase 1*) (SZÉKELY et al., 2008).

Na rota alternativa de biossíntese, via ornitina, a mesma é transaminada para P5C via ornitina- δ -aminotransferase (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Sugere-se que em algumas espécies, em condições de estresse, o acúmulo deste osmólito se dá por esta rota (XUE et al., 2009).

O catabolismo de prolina ocorre nas mitocôndrias pela ação sequencial das enzimas pirrolina desidrogenase (PDH) e P5C desidrogenase (P5CDH). PDH é codificada por dois genes, enquanto que um único gene *P5CDH* foi identificado em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (RIBARITS et al., 2007).

Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi observar se o estresse hídrico em diferentes condições (com e sem pré-tratamento) tem influência no acúmulo de prolina assim como na expressão de genes do seu metabolismo, em genótipos melhorados geneticamente para

¹ Doutoranda em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Pelotas, Rua Pe. Anchieta, 4715, pri_auler@hotmail.com.

² Doutorandos (a) em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Pelotas;

³ Graduandos em Agronomia na Universidade Federal de Pelotas;

⁴ Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas;

⁵ Professora Associada III, Instituto de Biologia/DB, Universidade Federal de Pelotas.

cultivo em diferentes sistemas de irrigação: BRS Querência (várzea) e AN Cambará (sequeiro).

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido com dois genótipos de arroz, BRS Querência (várzea) e AN Cambará (sequeiro). As sementes foram germinadas e após 10 dias, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos (10L), contendo solo.

No estágio vegetativo V5, as plantas de cada genótipo foram divididas em dois grupos. No primeiro, as plantas não foram submetidas a pré-tratamento e no segundo grupo as plantas foram submetidas a déficit hídrico (monitorado com o equipamento TDR EC o qual determina o Conteúdo Volumétrico de Água no solo). Nas plantas pré-tratadas, a irrigação foi suspensa até que a umidade do solo atingisse 10% (estresse hídrico moderado). Após, os vasos foram rehidratados e mantidos nessa condição até a reaplicação do estresse, no estágio reprodutivo. Em (R1-R2), a irrigação foi suspensa novamente conforme descrito anteriormente.

Em vista disso, foram designadas quatro condições experimentais: C: controle (capacidade de campo); PT_v: Pré-tratamento no vegetativo e sem déficit hídrico no reprodutivo; PT_v+R: Pré-tratamento no vegetativo e subsequente déficit hídrico no reprodutivo; NPT: sem pré-tratamento no vegetativo e com déficit hídrico no reprodutivo. As coletas foram realizadas no estágio reprodutivo em todas as condições.

O delineamento experimental foi em DIC, em esquema fatorial 2 x 4 (dois genótipos e quatro condições estudadas) com três repetições biológicas por tratamento, sendo cada unidade experimental representada por um vaso contendo seis plantas.

Para a determinação do conteúdo de prolina foi utilizada a metodologia descrita por Bates et al. (1973), com algumas modificações e os resultados expressos em $\mu\text{mol prolina g}^{-1}$ MF (massa fresca).

O RNA total foi extraído de folhas utilizando-se o reagente *PureLink® Kit* (Invitrogen™). A qualidade e integridade do RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantidade e pureza em NanoDrop ND-1000. Cada amostra de mRNA foi reversamente transcrita em cDNA usando o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™). Foram desenhados *primers* na região transcrita dos genes de arroz que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de prolina (*P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR OAT*, *P5CDH* e *PDH*). Como normalizador interno das reações de RT-qPCR utilizou-se o gene *UBC-E2* (*Ubiquitina conjugada a enzima E2*), previamente testado para as condições experimentais. A quantificação relativa da expressão de cada gene foi obtida conforme descrito por Livak; Schmittgen (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o genótipo BRS Querência, o maior acúmulo de prolina ocorreu em PT_v+R com 0,159 mM prolina g^{-1} MF, seguido dos valores 0,112 e 0,098 mM prolina g^{-1} MF nas condições NPT e PT_v, respectivamente, todos sendo superiores ao teor de prolina na condição controle. O conteúdo deste aminoácido em AN Cambará foi inferior, ao genótipo de várzea, em todas as condições estudadas, no entanto, não diferindo significativamente entre as condições hídricas (Figura 1). Muitas evidências têm demonstrado que o estresse osmótico induz o acúmulo de prolina que é parcialmente regulado pela via de sinalização ABA-dependente (STRIZHOV et al., 1997). Deste modo, o estresse hídrico pode ativar a via da biossíntese de prolina, que pode atuar como um antioxidante não enzimático e, deste modo, influenciar no equilíbrio redox das plantas. Os resultados mostraram que, em BRS Querência, o acúmulo de prolina foi acentuado, principalmente em plantas pré-tratadas, evidenciando uma provável resposta de defesa incrementada pelo processo de memória, diferentemente do que ocorreu no AN Cambará (Figura 1).

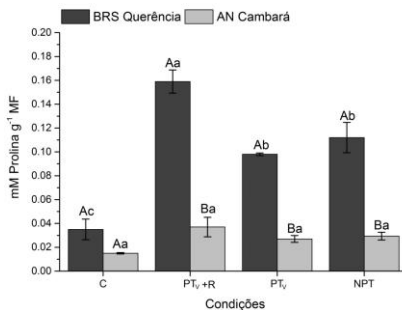


Figura 1- Conteúdo de prolina livre em folhas de arroz (BRS Querência e AN Cambará), após submetidas as diferentes combinações de déficit hídrico. Os valores são representados pela média de cada condição \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente nos genótipos e letras minúsculas iguais não diferem entre as condições dentro do mesmo genótipo.

Nas plantas que estavam em déficit hídrico no momento da coleta, os valores de expressão de *P5CS1* foram de 3,16 e 5,39, respectivamente. Na maioria dos casos, observa-se expressões menores que as do controle nos genes *P5CDH* e *PDH*, envolvidos no catabolismo mitocondrial de prolina (Figura 2A e 2B).

Em AN Cambará, houve aumento de expressão principalmente no gene *OAT* (QR= 4,07) em PT_v+R, proveniente da rota alternativa de síntese, em comparação com os demais genes de biossíntese. Em relação aos envolvidos no catabolismo, nota-se aumento de expressão nos tratamentos que receberam pré-tratamento, principalmente no gene *PDH*, com QR= 3,5 e QR= 2,59, respectivamente, demonstrando maior catabolismo de prolina neste genótipo, corroborando os valores baixos de quantificação do mesmo (Figura 2C e 2D).

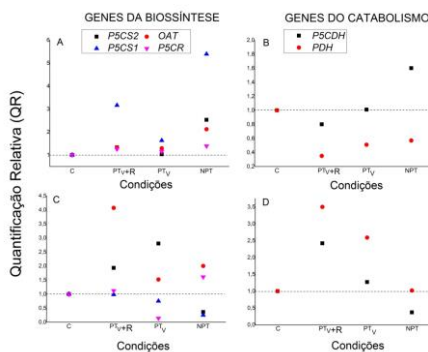


Figura 2- Quantificação Relativa (QR) da expressão de genes codificadores de enzimas envolvidas na biossíntese (*P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR* e *OAT*) e catabolismo (*P5CDH* e *PDH*) de prolina nos genótipos de arroz BRS Querência (A e B) e AN Cambará (C e D) após submetidas as diferentes combinações de déficit hídrico ao longo do ciclo.

Os resultados sobre a expressão dos genes do metabolismo de prolina em BRS Querência evidenciaram uma alta expressão do gene *P5CS1*, provavelmente induzido pelo déficit hídrico, e baixa resposta dos genes do catabolismo, principalmente do *PDH* que, de acordo com Satoh et al. (2002), tem sua expressão reprimida em condições de desidratação. Esses resultados correspondem a maior quantidade de prolina detectada neste genótipo, provavelmente auxiliando na busca da homeostase (Figura 1). Em contrapartida, em AN Cambará observou-se incremento na expressão do gene *OAT*. Por outro lado, também foi observado aumento na expressão dos genes do catabolismo nas plantas pré-tratadas (Figura 2D), o que poderia explicar a manutenção dos níveis de prolina entre todas as condições testadas (Figura 1), indicando uma auto-regulação da homeostase do metabolismo em AN Cambará.

CONCLUSÃO

Os aumentos dos níveis de prolina em BRS Querência correspondem ao aumento da expressão nos genes de biossíntese, enquanto a constância dos níveis de prolina em AN Cambará correspondem ao equilíbrio na expressão entre os genes envolvidos. O maior incremento de prolina e aumento de expressão dos genes da biossíntese em PTv+R no BRS Querência, podem estar associados com uma resposta advinda de memória do estresse prévio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABU, R. C.; et al. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. **Crop Science**, v.43, p.1457-1469, 2003.
- BATES, L. S.; et al. Rapid determination of free proline for waterstress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.
- HAYAT, S.; et al. Role of proline under changing environments. **Plant Signaling e Behavior**, v.7, n.11, p. 1-11, 2012.
- 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.
- MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 660-666, 2013.
- RIBARITS, A.; et al. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. **Planta**, v. 225, p. 1313-1324, 2007.
- SATOH, R.; et al. ACTCAT, a Novel cis-Acting Element for Proline- and Hypoosmolarity-Responsive Expression of the *ProDH* Gene Encoding Proline Dehydrogenase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 130, p. 709-719, 2002.
- STRIZHOV, N.; et al. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 12, n. 3, p. 557-569, 1997.
- SZÉKELY, G.; et al. Duplicated *P5CS* genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 53, p. 11-28, 2008.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.
- XUE, X.; et al. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **BMB Reports**, v. 42, p. 28-34, 2009.