

# DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM RAÍZES DE DOIS GENÓTIPOS DE ARROZ CONTRASTANTES NA RESPOSTA À BAIXA TEMPERATURA

Angie G. Sierra Rativa<sup>1</sup>; Daniele Friedrich<sup>2</sup>; Édina A. R. Blasi<sup>3</sup>; Felipe Kuhn<sup>4</sup>; Janete Mariza Adamski<sup>5</sup>; Janette Palma Fett<sup>6</sup>; Felipe Klein Ricachenevsky<sup>7</sup>; Guilherme Loss de Moraes<sup>8</sup>; Joseane Biso de Carvalho<sup>9</sup>; Mara Cristina Barbosa Lopes<sup>10</sup>; Raul Antonio Sperotto<sup>11</sup>

**Palavras-chave:** frio, tolerância, RNAseq.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de arroz entre os países não-asiáticos. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), em 2013 o estado do Rio Grande do Sul foi responsável por 66,9% da produção nacional. Porém, a baixa temperatura, comum no sul do país na época do plantio, pode causar perdas no rendimento de até 25% (CRUZ et al., 2013), pois as variedades cultivadas nesta região pertencem à subespécie *indica*, que embora apresente grãos de melhor qualidade, é bastante sensível ao frio (CRUZ & MILACH, 2000; SAITO et al., 2004).

Quando submetidas às baixas temperaturas durante os meses de setembro a novembro (fases iniciais de desenvolvimento, devido à semeadura antecipada), estas plantas apresentam redução na germinação e no desenvolvimento, podendo reduzir também a quantidade e qualidade dos grãos (CRUZ & MILACH, 2004). Portanto, a baixa temperatura é um dos estresses que mais limitam a produção de arroz.

Anteriormente foram realizadas análises fisiológicas e moleculares em dois genótipos de arroz da subespécie *indica* (previamente caracterizados como sensível e tolerante ao frio) em sementes em germinação (DAMETO et al., 2015) e em folhas durante a fase vegetativa (dados não publicados). Contudo, foi percebido que as raízes dessas plantas apresentavam diferenças visuais quando submetidas à baixa temperatura, indicando que parte da resposta ao frio poderia ser devido a modificações nas raízes.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas fisiológicas e moleculares de raízes de genótipos de arroz contrastantes quanto à resposta ao frio.

## MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de arroz foram desinfestadas e colocadas para germinar por cinco dias em uma incubadora BOD à 24°C em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para vermiculita expandida, mantidas por aproximadamente 14 dias em incubadora e depois transferidas para copos plásticos com meio hidropônico por mais dez dias. Assim, foram analisados os seguintes parâmetros (n = 14): peso seco e comprimento das raízes, e número de pelos radiculares. As análises fisiológicas realizadas foram: peroxidação de lipídios (reagente *Schiff*), acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reagente *diaminobenzidine*), e detecção da perda de integridade de membrana plasmática, indicativo de morte celular (reagente *Evans Blue*). Foi feita a extração

<sup>1</sup> Graduada em Ciências Biológicas, estagiária voluntária, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Talini, 171 - Universitário, Lajeado - RS, 95900-000 (angie2821@outlook.com).

<sup>2</sup> Graduada em Ciências Biológicas, Centro Universitário UNIVATES.

<sup>3</sup> Mestranda em Biotecnologia, Graduada em Ciências Biológicas, Centro Universitário UNIVATES.

<sup>4</sup> Mestrando em Biotecnologia, Graduado em Ciências Biológicas, Centro Universitário UNIVATES.

<sup>5</sup> Pós-doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS.

<sup>6</sup> Professor PPG Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>7</sup> Professor PPG Agrobiologia, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>8</sup> Laboratório Nacional de computação científica, LNCC.

<sup>9</sup> Laboratório Nacional de computação científica, LNCC.

<sup>10</sup> Pesquisadora do Setor de Melhoramento Genético do Instituto Rio-Grandense do Arroz, Cachoeirinha, RS.

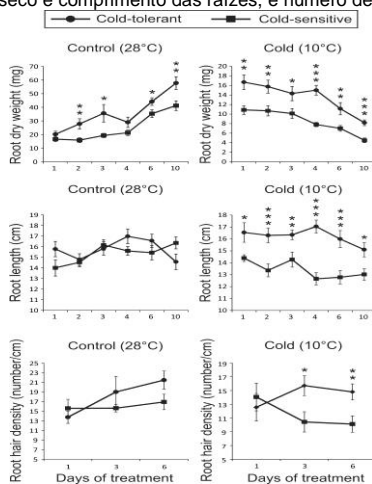
<sup>11</sup> Professor PPGBiotec, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Centro Universitário UNIVATES.

de RNA das amostras de raízes das plantas dos dois genótipos sob condição de frio, e as mesmas foram submetidas ao sequenciamento em grande escala (*deep RNAseq*). Através de análises de bioinformática, estes dados foram analisados, e a qualidade dos dados de RNAseq foram confirmados através da análise de expressão gênica de genes específicos por RT-qPCR.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes das plantas submetidas à baixa temperatura mostraram uma grande diferença nos genótipos tolerante e sensível ao frio. Na Figura 1 verifica-se que o peso seco da raiz (mg), o comprimento da raiz (cm) e o número de pelos radiculares é maior no genótipo tolerante em condições de baixa temperatura (10°C), evidenciando um desenvolvimento mais vigoroso das raízes do genótipo tolerante.

Figura 1. Peso seco e comprimento das raízes, e número de pelos radiculares.



Utilizando o reagente *Evan Blue* foi possível verificar que as raízes das plantas do genótipo tolerante ao frio apresentam níveis mais baixos de perda de integridade de membrana plasmática (dados não mostrados), evidenciando menores níveis de morte celular, quando comparado ao genótipo sensível ao frio.

De acordo com SONG et al., (2011), a localização histoquímica da peroxidação de lipídios é uma das ferramentas-chave na avaliação da tolerância/sensibilidade ao frio, pois ela é usada para o diagnóstico de danos na membrana causados por estresse oxidativo. Utilizando o reagente de Schiff foi possível visualizar uma maior concentração de aldeídos (resultantes da peroxidação lipídica) nas raízes das plantas do genótipo sensível ao frio (dados não mostrados), evidenciando que este genótipo apresenta níveis mais elevados de estresse oxidativo e de peroxidação de lipídios que o genótipo tolerante ao frio.

Utilizando o reagente *diaminobenzidine* foi possível verificar que as raízes do genótipo tolerante ao frio apresentam menores níveis de acúmulo de  $H_2O_2$  que o genótipo sensível (dados não mostrados), mostrando que o genótipo tolerante ao frio provavelmente apresente níveis mais elevados de enzimas antioxidantes, responsáveis pela detoxificação de  $H_2O_2$ , e consequentemente níveis mais reduzidos de estresse oxidativo.

As análises de sequenciamento em grande escala (RNAseq) foram realizadas nas amostras de raízes dos dois genótipos (tolerante e sensível ao frio) após 24 horas de tratamento (10°C). De acordo com a Tabela 1, somente 27 genes apresentaram expressão diferencial sob condição de frio, sendo 15 deles mais expressos no genótipo tolerante e 12 mais expressos no genótipo sensível ao frio. Foi possível verificar que o genótipo tolerante apresenta expressão mais elevada de genes relacionados à manutenção de estruturas proteicas, assimilação de nitrogênio e sínteses de hormônios (etileno e brassinosteroides). Por outro lado, o genótipo sensível ao frio apresentou maior expressão de genes relacionados com o remodelamento da parede celular, sinalização de Ca<sup>2+</sup>, e enzimas antioxidantes.

Para confirmar a qualidade dos dados do RNAseq, a expressão de alguns genes específicos foi testada por RT-qPCR. Conforme a Figura 2, as diferenças de expressão encontradas no RNAseq forma confirmadas para os quatro genes testados por RT-qPCR, apesar do valor de *fold change* detectado no RNAseq e no RT-qPCR serem diferentes.

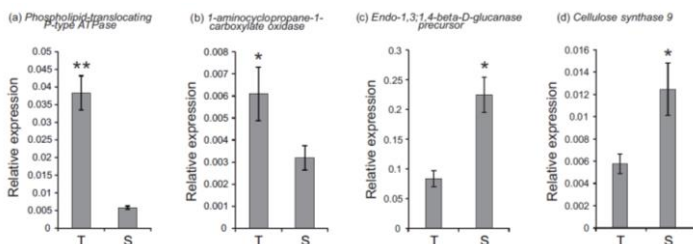
Tabela 1. Genes diferencialmente expressos (RNAseq).

Sequences more expressed on the cold-tolerant genotype			
Description	Location	Fold-change Tolerant / Sensitive	p-value
expressed protein	LOC_Os05g07560	11.1	1.47 e-30
CR2-associated factor 2, chloroplast precursor	LOC_Os01g21990	10.6	8.61 e-15
Galactosyl transferase domain containing protein	LOC_Os07g23494	8.9	1.11 e-08
hsp20/alpha crystallin family protein	LOC_Os01g08880	6.2	2.52 e-13
Phospholipid-translocating P-type ATPase	LOC_Os11g25980	5.2	2.30 e-06
reticulone oxidase-like protein precursor	LOC_Os06g35700	4.0	1.33 e-05
expressed protein	LOC_Os07g28260	3.9	1.51 e-09
MLA6 protein	LOC_Os10g04110	3.5	8.42 e-06
ferredoxin-nitrite reductase	LOC_Os02g52730	3.2	2.04 e-06
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	LOC_Os09g5680	3.0	2.71 e-07
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	LOC_Os09g27750	2.7	0.000260
protein binding protein	LOC_Os11g16030	2.7	2.46 e-05
expressed protein	LOC_Os01g08950	2.6	7.08 e-09
cytochrome P450	LOC_Os10g38110	2.6	9.60 e-05
cytochrome P450 71A1	LOC_Os12g16720	2.4	1.43 e-05

Sequences more expressed on the cold-sensitive genotype			
Description	Location	Fold-change Sensitive / Tolerant	p-value
Similar to Endo-1,3,1,4-beta-D-glucanase precursor	LOC_Os11g17540	10.0	2.01 e-12
glutamate receptor	LOC_Os09g25934	9.2	1.66 e-20
glutathione peroxidase	LOC_Os11g18170	6.4	6.78 e-12
expressed protein	LOC_Os09g26940	5.1	1.75 e-13
expressed protein	LOC_Os09g39310	5.1	1.09 e-08
expressed protein	LOC_Os02g59810	4.5	2.74 e-06
metallothionein	LOC_Os01g74300	3.8	1.15 e-07
expressed protein	LOC_Os09g33876	3.6	0.000175
Ost9tbl30 - beta-glucosidase	LOC_Os09g1430	3.3	0.000128
nicotianamine synthase	LOC_Os03g19427	3.1	3.93 e-05
expressed protein	LOC_Os06g40034	2.7	9.24 e-05
CESA9- cellulose synthase	LOC_Os09g25490	2.0	0.000149

Figura 2. Confirmação dos dados do RNAseq por RT-qPCR.



## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que as raízes de genótipos de arroz contrastantes quanto à resposta ao frio podem responder diferencialmente ao estresse por baixa temperatura. Embora estes dois genótipos possuam um perfil genético semelhante (linhagens irmãs), alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos podem estar envolvidos com a tolerância ou a sensibilidade ao frio, podendo ser utilizados em futuras abordagens biotecnológicas visando aumentar a tolerância do arroz à baixa temperatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 03 out. 2013.

CRUZ, R. P. da; SPEROTTO, R. A.; CARGNELUTTI, D.; ADAMSKI, J. M.; TERRA, T. de F.; FETT, J. P. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. **Food Energy Secur**, v. 2, n. 2, p. 96-119, 2013.

CRUZ, R. P. da; MILACH, S. C. K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Sci Agric**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2004.

DAMETTO, A; SPEROTTO, R; ADAMSKY, J; BLASI, E; CARNELUTTI, D; OLIVEIRA, L; RICACHENESVKY, F; FREGONEZI, J; MARIATH, J; CRUZ, R; MARGIS, R; FETT, J. Cold tolerance in rice germinating seeds revealed by deep RNAseq analysis of contrasting indica genotypes. **Plant Science**, v. 238, p. 112. 2015

SAITO, K. M, et al. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 82-86, 2001.

SONG, S., CHEN, Y., CHEN, J., DAI, X Y ZHANG, W. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependt tolerance of rice plants to abiotic stress. **Planta**, v. 234, p. 331-345, 2011.