

EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DE ERFs EM DUAS CULTIVARES DE ARROZ SOB CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA DE OXIGÊNIO

Railson Schreinert dos Santos¹; Luis William Pacheco Arge²; Frederico Pedro Madabula³; Mariana Madruga Kruger⁴; Camila Pegoraro⁵; Luciano Carlos da Maia⁶; Cesar Valmor Rombaldi⁷; Antonio Costa de Oliveira⁸

Palavras-chave: estresse, qPCR, Nipponbare, Bonança.

INTRODUÇÃO

Estresses bióticos e abióticos são responsáveis pela limitação da produtividade e da qualidade da produção agrícola. O arroz (*Oryza sativa* L.) sofre com diversos estresses, entre eles a deficiência de oxigênio pela submergência das plântulas poucos dias após a semeadura.

A falta de oxigênio devido a condições como a submergência é um dos maiores estresses abióticos dentre os quais as plantas são submetidas. Tal estresse costuma reduzir a produtividade das culturas, pois, devido à limitada disponibilidade de oxigênio para a fosforilação oxidativa, ocorre uma crise energética, ou seja, uma diminuição na quantidade de ATP produzida (GIBBS e GREENWAY, 2003; BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008) trazendo diversas consequências para o metabolismo celular primário com reflexos no secundário (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2004).

Apesar de saber da existência de formas de adaptação através da regulação da atividade gênica em níveis de RNA e proteínas, muitos dos mecanismos moleculares de resposta à anoxia, ainda são pouco entendidos (OTSUKA et al., 2010).

Dentre os genes que estão relacionados à resposta e tolerância vegetal a estresses ambientais, incluindo o estresse por submergência, destacam-se alguns membros pertencentes à família ERF (*Ethylene Response Factors*) (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007; MIZOI et al., 2012; VOGEL et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Esta família tem sido empregada em estudos comparativos entre diferentes genótipos submetidos a estresse por submergência (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). Sabendo-se da importância deste tipo de experimento, espera-se que estudos mais aprofundados possam retornar informações relevantes sobre genes que, por ter uma regulação diferenciada, confirmam maior capacidade adaptativa a determinados genótipos.

Considerando-se a possibilidade de que genótipos de arroz de diferentes níveis de tolerância à submergência tenham a transcrição de ERFs regulada diferencialmente e que tal diferença possa ter relação adaptativa ao estresse em questão, objetivou-se neste trabalho encontrar diferenças de expressão de três ERFs quando comparando duas diferentes cultivares de arroz, as quais têm diferentes níveis de sensibilidade ao encharcamento: Nipponbare (cultivar de arroz irrigado) e Bonança (cultivar de arroz de sequeiro).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas. Plântulas de arroz das

¹ M. Sc. Engenheiro Agrônomo, Doutorando na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) - Campus Universitário CEP:96001-970 Cx. Postal 354, E-mail: rschsan@hotmail.com;

² M. Sc. Tecnólogo em Fruticultura, Doutorando na UFPEL – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM);

³ M. Sc. Engenheiro Agrônomo, Instituto de Investigação Agrária de Moçambique;

⁴ M. Sc. Bióloga, Doutoranda na UFPEL – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM);

⁵ Dr. Engenheiro Agrônomo, Bolsista de Pós-Doutorado na EMBRAPA Uva e Vinho;

⁶ Dr. Engenheiro Agrônomo, Professor na UFPEL – FAEM;

⁷ Dr. Engenheiro Agrônomo, Professor na UFPEL – FAEM;

⁸ Dr. Engenheiro Agrônomo, Professor na UFPEL – FAEM;

cultivares Nipponbare e Bonança, germinadas durante 15 dias, foram transferidas para potes de vidro e submetidas a estresse por hipoxia (submergência) e anoxia (N₂) durante 24 e 72 horas.

As plântulas tiveram sua parte aérea removida e macerada para quantificação da expressão transcricional de três ERFs (AK105991, AK108830 e AK067313). Extraiu-se o RNA de acordo com o protocolo do *PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™)* e para a síntese de cDNA utilizou-se o kit comercial *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™)*. Para quantificação da expressão transcricional utilizou-se o reagente *SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®)* em aparelho *7500 Fast RealTime PCR System (Applied Biosystems®)*. O CT (*Cycle Threshold*) foi calculado na reação de PCR exponencial, e dele obteve-se o nível de expressão relativa (QR – Quantificação Relativa) pela fórmula $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene substitutivo utilizado na reação foi o *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*.

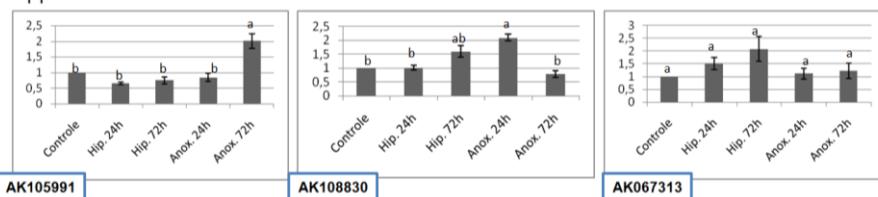
Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a qPCR foram: AK105991 F: GCACACACCAGATCGCATCCTC/R: GGTTCGAGCGCTTTCATGAGCT; AK108830 F: GGCAAGTGGGTGTCGGAGATCA/R: CAGCCAGATGCGCGACTTCTTC; AK067313 F: TGCTCCGTGCAAGTGAGGAAGA/R: CAGCGATTGAATCAGGGCCATC; AK064960 (GAPDH) F: AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT/R: CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT.

Os resultados foram expressos em QR em gráficos de barras. A análise estatística foi realizada no programa R (R TEAM, 2013) com o pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2013) utilizando-se o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de expressão para os diferentes tratamentos são exibidos na figura 1.

Nipponbare



Bonança

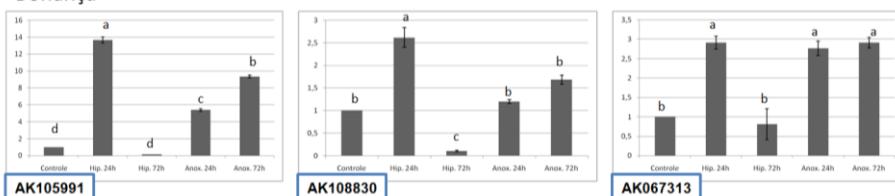


Figura 1. Quantificação Relativa (QR) de transcritos para plântulas das cultivares Nipponbare e Bonança em estresse por hipoxia e anoxia durante 24 e 72 horas. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pela avaliação de qPCR, percebe-se que a cv. Bonança apresentou maior acúmulo de transcritos de ERFs frente aos diferentes estresses. Tal resultado indica que, provavelmente, se trata de uma resposta a danos causados por esse estresse, e não por uma indução de mecanismo de tolerância, tendo em vista que se trata de uma cultivar não tolerante ao encharcamento. É sabido que ERFs são, em alguns casos, respostas primárias à ação de agentes estressores, mas isso nem sempre é regra. Por exemplo, ao se induzir um estresse pode ocorrer aumento na produção de etileno, e esse hormônio pode atuar na ativação ou

repressão de ERFs. Porém, a ação dos agentes estressores pode agir diretamente na transcrição de muitos outros genes, sejam eles fatores de transcrição ou não (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007).

Análises de microarranjo demonstram que genes que codificam fatores de transcrição se mostram diferencialmente expressos em arroz de sequeiro submetido a estresse por seca utilizando polietilenoglicol. Além desta constatação inicial, os mesmos pesquisadores ainda sugerem que tais genes mais expressos em arroz de sequeiro possam contribuir para um aumento de tolerância a seca em cultivares irrigadas bem como outras espécies intolerantes a tal estresse (WANG et al., 2007).

Genes responsáveis por transdução de sinal são diferencialmente expressos em arroz de sequeiro submetido à estresse por seca (GAO et al., 2009). Sabe-se que ERFs têm papel na tolerância vegetal à estresse por seca (QUAN et al., 2010) e que estes podem ainda mediar um *crosstalk* entre tolerância à seca e submergência (FUKAO et al., 2011).

Trabalhos futuros utilizando técnicas como transgenia, poderão demonstrar se os ERFs expressos em maior quantidade durante as primeiras 24 horas de hipoxia na cv. Bonança, têm mesmo relação com danos já causados, ou se os mesmos possuem alguma função particular em uma tentativa de adaptação da planta à condições de estresse. De qualquer forma, o padrão extremamente variável de resposta destes genes aos diferentes estresses testados nas duas diferentes cultivares, não parece indicar nenhum candidato em especial à participação na adaptação do vegetal a condições de submergência, nem mesmo nos possibilita apontar um fator determinante para regulação de sua expressão. A avaliação da expressão transcricional dos genes testados em diferentes genótipos, diferentemente do que ocorreu nos trabalhos anteriormente citados, não foi um método eficiente na identificação de genes candidatos a maiores estudos visando a tolerância ao estresse por deficiência de oxigênio.

CONCLUSÃO

A resposta transcricional dos ERFs testados é mais intensa na cultivar Bonança, especialmente às 24 horas de hipoxia. Assim, pode-se dizer que foram encontradas diferenças de expressão entre as cultivares, mas não é possível estabelecer uma relação entre a resposta transcricional destes genes e uma maior adaptação da cultivar Nipponbare às condições de deficiência de oxigênio.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à CAPES, ao CNPq e à FAPERGS pela concessão das bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY-SERRES J.; VOESENEK L.A. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 313-339, 2008.

FUKAO, T. et al. The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. **The Plant Cell**, v. 23, p. 412-427, 2011.

GAO, F.H. et al. Comparative transcriptional profiling under drought stress between upland and lowland rice (*Oryza sativa* L.) using cDNA-AFLP. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, p. 3555-3571, 2009.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**. v. 30, p. 1-47, 2003.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R. et al. Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. **Plant Physiology**, v. 144, p. 218-231, 2007.

MENDIBURU, F. *agricolae*: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package

version 1.1-4, 2013. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>> Acesso em: 12 maio. 2013.

MIZOI, J. et al. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 86-96, 2012.

OTSUKA, C. et al. Hypoxia-Inducible Genes Encoding Small EF-Hand Proteins in Rice and Tomato. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 2463–2469, 2010

QUAN, R. et al. Overexpression of an ERF transcription factor TSRF1 improves rice drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 476–488, 2010.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013 URL <http://www.R-project.org/>.

SANTOS R.S. dos et al. Transcriptional Regulation of Seven ERFs in Rice Under Oxygen Depletion and Iron Overload Stress **Tropical Plant Biology**, v. 6, p. 16–25, 2013.

WANG, H. et al. Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, p. 1109-1126, 2007.

VOGEL, M.O. et al. Combinatorial Signal Integration by APETALA2/Ethylene Response Factor (ERF)-Transcription Factors and the Involvement of AP2-2 in Starvation Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 5933-5951, 2012.