

MANIPULAÇÃO GENÉTICA DO METABOLISMO DE GIBERELINAS DO ARROZ EM CONDIÇÕES DE SUBMERSÃO

Camilo E. Vital¹, Líria. G. Nunes¹, Rodrigo O. Almeida¹, Pieter B.F. Ouwkerk², Dominique Van Der Straeten³, Andréa M. Almeida¹. ¹Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, camilovital@yahoo.com.br, amalmeida@ufv.br. ²Institute of Biology, Leiden University, The Netherlands. ³Unit of Hormone Signalling and Bioimaging, Ghent University, Belgium.

O arroz irrigado por inundação com plantio pré-germinado é uma alternativa muito usada pelos produtores no cultivo da lavoura orizícola. O manejo usualmente adotado consiste na retirada da água da lavoura cerca de três dias após a semeadura, visando melhor estabelecimento das plântulas. No entanto, esta prática acarreta perda de nutrientes, além da reinfestação por plantas daninhas, especialmente o arroz vermelho. Além disso, a realização da drenagem inicial provoca a perda de considerável volume de água, recurso limitante em algumas regiões produtoras e principal item na composição do custo de produção. Estas perdas podem ser evitadas, através do manejo da água de irrigação, com manutenção de lâmina contínua e também é uma alternativa eficiente no controle de plantas invasoras. Por outro lado, o acamamento de plantas pode ser potencializado com a adoção de lâmina contínua. Este é o principal parâmetro a ser observado quando se avalia este manejo de irrigação, pois dificulta a colheita, interferindo no potencial produtivo e na qualidade de grãos (Marchezan *et al.* 2004). Desta forma, cultivares que sejam resistentes ao acamamento gerado pela inundação contínua seria uma alternativa para evitar os problemas mencionados.

O maior problema que restringe a sobrevivência da planta durante o alagamento é a deficiência na disponibilidade de oxigênio. Para enfrentar as condições de inundação, o arroz alonga rapidamente os tecidos submersos para alcançar o nível da água, evitando assim a anaerobiose (Almeida *et al.* 2003). Este alongamento excessivo dos tecidos que leva posteriormente ao acamamento da planta. O principal hormônio que controla esta resposta é a giberelina (GA). Neste trabalho, foi estudado o comportamento adaptativo sob condições de submersão de plantas transgênicas de arroz que sobre-expressam a GA 2-oxidase, uma enzima envolvida na degradação das giberelinas bioativas. O transgene encontra-se sob o controle do promotor OsACS-5 (*Oryza sativa* – sintase do ácido carboxílico), sendo este expresso somente em condições de submersão e hipóxia (Van Der Straeten *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2002).

Plantas de arroz não transformado (controle) e plantas de linhagens transformadas (geração T₂) originadas de eventos de transformação independentes foram crescidas em solução hidropônica. Para a seleção das plantas transgênicas com presença do inserto foi feito um teste *in situ* através da aplicação do antibiótico higromicina na superfície foliar de cada planta. No inserto há o gene de resistência ao antibiótico. O não aparecimento de necrose é correlacionado à presença do inserto nas plantas (figura 1). Uma análise destas plantas feita através da amplificação (PCR) do gene de resistência ao antibiótico e do transgene da GA 2-oxidase (figura 1) confirmando a presença do inserto nestas plantas e também a eficácia do ensaio com higromicina.

Plantas transgênicas foram analisadas quanto a sua viabilidade de desenvolvimento em condições normais aeróbicas e sob estresse de submersão. As plantas transgênicas e as plantas não transformadas crescidas em casa de vegetação por 15 dias foram submetidas ao tratamento sendo analisado o crescimento durante 1, 2, 3, dias de submersão. Posteriormente, foram

transplantadas para vasos onde foram analisadas até a formação de sementes. As plantas viáveis foram submetidas a um novo experimento para análise de condutância estomática (gs), transpiração (E), fotossíntese (A) e a relação CO₂ interna/CO₂ externa (Ci/CA) quatro dias após o tratamento de submersão.

A partir dos dados morfológicos das plantas observou-se que a linhagem com sobre-expressão do gene que codifica para a GA 2-oxidase, mostrou um crescimento médio menor que as plantas de arroz não transformado quando crescidas em condições de submersão (tabela 1). Esta evidência suporta que esta linhagem possui o transgene da GA 2-oxidase ativo. Quando submetidas ao tratamento de submersão, as plantas transformadas mostraram ser mais tolerantes, pois, após três dias de submersão total em solução nutritiva, estas sobreviveram e mostraram desenvolvimento vigoroso em condições normais. Terminado o mesmo período de tratamento, as plantas não transformadas apresentaram maior mortalidade (figura 2). Além disso, os indivíduos não transformados que sobreviveram ao tratamento de submersão mostraram um retardamento no desenvolvimento quando transferidos para as condições normais (figura 2).

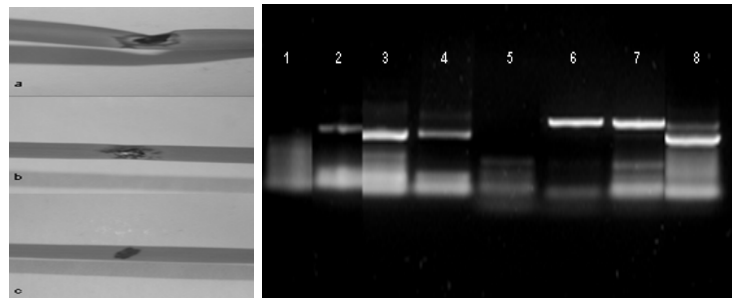


Figura 1 – Fotos de folhas de arroz (esquerda) submetidas ao ensaio com solução de higromicina. (a) planta não transformada com necrose; (b) transformada com necrose; (c) transformada sem necrose. As marcas em preto são usadas como referência do local de aplicação do antibiótico. À direita - análise molecular da incorporação do T-DNA. Foi feita amplificação (PCR) com par de *primers* (HPTF e HPTR) do gene de resistência a higromicina (1 a 4) e com os *primers* PcGA-2ox sense e T 35S anti-sense do transgene da GA 2-oxidase (5 a 8). 1 e 5 - controle não transformado; 2 e 3, 6 e 7 - linhagens transformadas independentes; 4 e 8 - plasmídeo com o T-DNA (controle positivo).

A análise dos parâmetros fisiológicos mostrou que a razão entre Ci/CA tende a aumentar em ambas plantas controle não transformadas e plantas transformadas com o tempo de submersão (1, 2, 3 dias). A taxa fotossintética foi maior nas plantas com 3 dias de submersão, não havendo diferença significativa entre os demais tempos. Os outros parâmetros analisados não tiveram variação significativa durante o período do experimento. Estes resultados demonstram que o tempo de submersão influencia na resposta da planta quando colocadas em recuperação após um período de estresse. Neste caso, foi analisado também o crescimento das plantas durante a submersão. As plantas não transformadas apresentaram um crescimento médio superior ao das demais linhagens transgênicas.

As análises moleculares mostraram que houve a incorporação do inserto no genoma das plantas transgênicas em estudo. As plantas com expressão do gene PcGA2-ox controlado pelo promotor OsACS-5, induzido em condições de submersão, são normais em florescimento e desenvolvimento dos grãos e mais

tolerante ao estresse provocado pelo alagamento do que as plantas não transformadas. Esta maior tolerância está associada à sobre-expressão do gene da GA 2-oxidase, enzima que degrada giberelinas ativas.

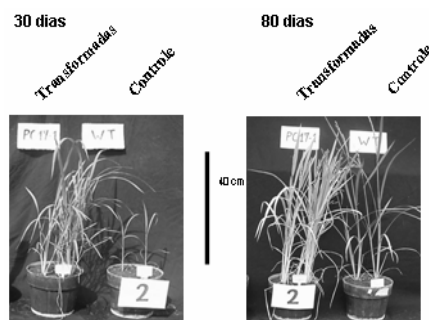


Figura 2 – Morfologia de plantas não transformadas (controle) e transformadas com 30 dias e com 80 dias após a germinação. As plantas foram crescidas durante 15 dias, sendo submersas por 2 dias e, posteriormente, transferidas para condições normais de aeração. As duas fotos referem-se às mesmas plantas.

Tabela 1 - Caracterização Morfológica de plantas de arroz transgênico e de arroz não transformado submetidos ao estresse por submersão.

Genótipo	Dias Submersão	Taxa de sobrevivência (%)	Crescimento médio durante a submersão (cm)	Folhas ² 90 dias após a semeadura	Floração ¹	Espiguilhas ²	Sementes ³
Controle	0	100	-	49	57	7	51
	1	67	4,0	15	61	3	60
	2	67	6,8	15	61	2	46
	3	33	6,6	28	61	5	40
Transgênico	0	100	-	28	57	5	70
	1	100	1,9	28	57	4	45
	2	80	5,5	28	57	4	50
	3	100	4,6	18	61	4	60

¹ dias após a semeadura; ² número médio por planta; ³ número médio por espiguiha

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M., VRIEZEN, W. H. AND VAN DER STRAETEN, D. (2003)

Molecular and physiological mechanisms of flooding avoidance and tolerance in rice. *Rus. J. Plant Physiol.*, 6: 743-751

MARCHEZAN, E.; CAMARGO, E.R.; LOPES, S. I.G.; SANTOS F.M.; MICHELON, S, 2004. Desempenho de genótipos de arroz irrigado cultivados no sistema pré-germinado com inundação contínua. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.5, p.1349-1354.

VAN DER STRAETEN, D., ZHOU, Z., PRINSEN, E., VANONCKELEN, H.A., VAN MONTAGU, M.C. (2001) A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice. *Plant Physiol.*, 125:955-968