

OsWRKY19 É RESPONSIVO A ESTRESSES ABIÓTICOS EM ARROZ

Vivian Ebeling Viana¹; Naciele Marini²; Fabiane Igansi de Castro dos Santos³; Ariadne Ribeiro Henriques⁴; Luciano Carlos da Maia⁵; Antonio Costa de Oliveira⁶;

Palavras-chave: (toxidez por ferro, submergência, fatores de transcrição, expressão gênica)

INTRODUÇÃO

No estado do Rio Grande do Sul, o cultivo do arroz se dá, em sua forma mais produtiva, através do cultivo irrigado. Em virtude a inundação do solo para esta forma de cultivo, somado a principal característica de solos do tipo hidromórficos, drenagem natural ineficiente e elevados teores de ferro, observa-se uma acentuada disponibilidade de Fe²⁺ na solução do solo (BRASIL, 1973). O aumento da concentração de Fe²⁺ na solução do solo pode levar a uma absorção excessiva deste metal, sendo este rapidamente acumulado nas folhas, podendo causar perdas consideráveis na produção de arroz (SAHRAWAT, 2004). A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos que limitam a produção de arroz irrigado em nível mundial. Além desse, o déficit parcial de oxig nio, também chamado hipoxia, devido à condições como a submergência é um dos maiores estresses abióticos dentre os quais as plantas são submetidas. As plântulas de arroz, quando completamente submersas, morrem dentro de uma semana (XU et al., 2006).

Com isso percebemos que as plantas crescem em um ambiente dinâmico que frequentemente impõe restrições sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais e essas variações do ambiente também chamadas de estresse, afetam o crescimento das plantas. Os primeiros eventos de adaptação a estresses ambientais são a percepção e subsequente sinalização da transcrição que conduz à ativação de várias respostas fisiológicas e metabólicas, incluindo a expressão de genes responsivos ao estresse (TRAN et al., 2004). A maioria dos estudos sobre fatores de transcrição WRKY tem indicado que, diversos membros da família, atuam na resposta imune da planta. Atualmente, os pesquisadores tem dedicado esforç os na análise funcional de genes que codificam para fatores de transcrição WRKY em resposta a estresses abióticos (CHEN et al., 2012).

Neste sentido o melhoramento para tolerância a estresses abióticos é um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura já que desenvolve cultivares superiores mais produtivas e mais bem adaptadas a condições ambientais adversas. Por este motivo a identificação dos genes e sua função é fundamental para a compreensão de processos biológicos nos quais estão envolvidos (BRESOLIN, 2010). Sendo assim, com o intuito de compreender o envolvimento dos genes WRKY na resposta a estresses abióticos, este trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão do gene *OsWRKY19* em plântulas de arroz sob estresse por submergência e toxidez por ferro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório do Centro de Gen mica e Fitomelhoramento, pertencente ao departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Foram utilizadas sementes de arroz irrigado das cultivares Nipponbare, BR IRGA 409 e Epagri 108, estas foram alocadas em caixas gerbox com papel germitest e colocadas para germinar em câmara de germinação (B.O.D.) a 25 C, fotoperíodo de 16 horas/8horas (luz/escuro) e umidade relativa de 100% por 7 dias, seguindo

¹ Msc. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Gen mica e Fitomelhoramento, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, CP. 354, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: vh.viana@gmail.com

² Dra. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

³ Msc. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas

⁴ Dra. em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas.

⁵ Prof. Dr. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

⁶ Prof. PhD. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com três repetições, sendo cada unidade experimental composta por cinco plântulas.

Para a indução de estresse por ferro, plântulas uniformes foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente com capacidade para 4 L contendo solução nutritiva de YOSHIDA (1976). Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas, e aeração permanente. A solução nutritiva foi trocada a cada sete dias. As plântulas se desenvolveram nessas condições por 14 dias, quando a plântula está no estágio de desenvolvimento V3. Foi então realizada a primeira coleta das plântulas no tratamento controle, sem estresse por toxidez por ferro. Ao restante dos recipientes as plântulas foram submetidas ao estresse por ferro sendo transferidas para recipientes contendo a solução nutritiva padrão mais 390mg de sulfato de ferro e permaneceram sob estas condições por 4, 8 e 12 dias, até a coleta. O pH foi aferido diariamente. Para a indução de estresse por submersão as plântulas foram transferidas para recipientes com capacidade para 2L, acondicionados em ambiente com fotoperíodo de 16 horas/8 horas (luz/escuro), estes recipientes continham areia e foram regados 2 vezes ao dia com água e solução nutritiva de YOSHIDA (1976). As plantas permaneceram nestas condições por 7 dias. Logo após, os 14 dias, estágio de desenvolvimento V3, foi realizada a primeira coleta das plântulas submetidas ao tratamento controle (0h- sem estresse por hipoxia). O restante dos recipientes com as plântulas foram submetidas aos tratamentos de estresse, ou seja, as plântulas permaneceram sob condição de submersão por 6, 12, 24 e 48 horas, até a coleta. As amostras de parte aérea, obtidas na indução dos estresses de submersão e excesso de ferro, foram coletadas e acondicionadas em ultra freezer a -80°C até a realização da extração de RNA.

As extrações de RNA foram realizadas em triplicatas biológicas e segundo o protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNaseI (Invitrogen TM®) para eliminação de contaminação com DNA genômico. Os cDNAs fita simples foram obtidos a partir de 2µg de RNA total, utilizando o kit SuperScript™III First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen TM). Os iniciadores foram desenhados através do programa Applied Biosystems Primer Express®. Os dados de expressão do gene *OsWRKY19* foram normalizados em relação ao nível de expressão do gene constitutivo *OsEF-1α*. Para o qRT-PCR foi utilizado 12,5 µl do kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science®) e as reações foram realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems®) com três repetições biológicas e três repetições técnicas. A quantificação relativa de cada gene foi feita utilizando o método do Ct comparativo, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os dados também foram analisados através de ferramentas do programa Mult Experiment Viewer (TIGR MeV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a resposta do gene *OsWRKY19* sob estresse por submersão (Figura 1A), foi possível verificar que houve diferenças no padrão de expressão frente aos tratamentos principalmente quando se observa a cultivar Nipponbare a qual apresentou um alto número de transcritos no tratamento de 24h sob submersão. Em relação ao comportamento deste gene na cultivar BR IRGA 409 foi possível observar que houve alterações significativas no número de transcritos, destacando maior pico de expressão deste gene em condições normais e um decréscimo no número de transcritos nos tratamentos subsequentes. Além destes aspectos, o comportamento deste gene foi inexpressivo para a cultivar Epagri 108, visto que não houve alterações significativas no número de transcritos nos diferentes tratamentos.

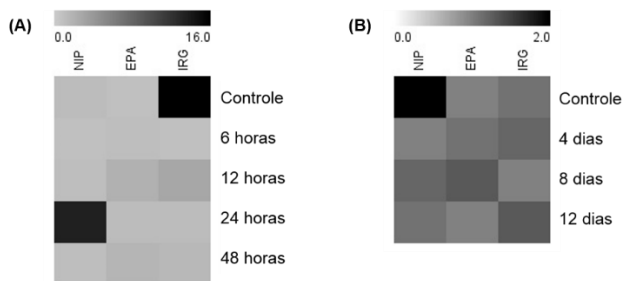


Figura 1. Perfil de expressão do gene *OsWRKY19* analisado nos estresses de submersão e excesso de ferro na parte aérea de plântulas de três genótipos de arroz irrigado, Nipponbare (NIP), Epagri 108 (EPA) e BR IRGA 409 (IRG) através da técnica de qRT-PCR e representado por escalas que variam de 1 – 16 e 1 - 2, utilizando o Mult Experiment Viewer (TIGR MeV). Uma extremidade da escala representada pela cor cinza claro indica menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor preta indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPEL, 2014. (A) perfil de expressão do gene *OsWRKY19* sob estresse por submersão nos tratamentos controle e 6, 12, 24 e 48 horas sob estresse. (B) perfil de expressão do gene *OsWRKY19* analisado nos tratamentos controle e 4, 8 e 12 dias sob estresse.

Em estresse por excesso de ferro, o gene *OsWRKY19* (Figura 1B) apresentou alterações nos níveis de transcritos nas três cultivares estudadas. Os resultados demonstram que este gene é expresso em condições normais principalmente na cultivar Nipponbare a qual apresentou um maior número de transcritos. Foi possível observar também que na cultivar Nipponbare há alterações no número de transcritos nos tratamentos de 8 e 12 dias sob estresse. Ainda, em relação a cultivar BR IRGA 409 notou-se que há alteração no número de transcritos para este gene no tratamento de 12 dias sob estresse, diferente do observado na cultivar Epagri 108 o qual é possível verificar uma maior alteração no número de transcritos no tratamento de 8 dias sob estresse. Este resultado sugere que, a expressão do gene *OsWRKY19* no tratamento de 8 dias sob estresse na cultivar Epagri 108, pode estar relacionado a tolerância ao estresse já que esta é caracterizada como tolerante ao excesso de ferro e, diferente deste resultado, a expressão do gene *OsWRKY19* no tratamento de 12 dias sob estresse na cultivar BR IRGA 409 caracterizada pela sensibilidade ao excesso de ferro no solo.

Em estudos utilizando a técnica de microarranjo, foi possível verificar a expressão diferencial do gene *OsWRKY19* em estresse abiótico e estresse biótico sugerindo assim uma expressão deste gene nos diferentes estresses. O gene *OsWRKY19* bem como outros *OsWRKY* respondem a estresse osmótico bem como estresse por patógenos *Magnaporthe grisea* e *Magnaporthe oryzae* (BERRI et al, 2009). Em plântulas de arroz foram submetidas a estresses abióticos como frio, salinidade e seca, e tratamentos com fitormônios como ácido abscísico, auxinas, ácido giberélico, metil jasmonato e ácido salicílico foi verificado o perfil diferencial de expressão do gene *OsWRKY19* em qRT-PCR. Foi observado que não houve alterações na expressão gênica para nenhum tratamento com estresse abiótico, porém, os resultados demonstraram que o gene *OsWRKY19* foi subexpresso sob o tratamento com auxinas (RAMAMOORTHY et al, 2008). Estudos de microarranjo sobre estresses bióticos em arroz, verificaram o mecanismo molecular em resposta a *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* mediadas pelo gene de milho *Rxo1*. Os resultados indicaram que este gene foi capaz de induzir fatores de transcrição WRKY, inclusive o gene *OsWRKY19*, que apresentou funções nas primeiras etapas da interação entre o arroz e a bactéria indicando que este gene desempenha um importante papel nas vias basais de defesa, como rota do ácido salicílico (ZHOU et al, 2010).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados é possível concluir que o gene *OsWRKY19* é responsivo aos estresses abióticos de submergência e excesso de ferro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERRI, S.; ABBRUSCATO, P.; FAIVRE-RAMPANT, O.; BRASILEIRO, A. C.; FUMASONI, I.; SATOH, K.; KIKUCHI, S.; MIZZI, L.; MORANDINI, P.; PÉ, M. E.; PIFFANELLI, P. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v.9, n.120, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária. Divisão de Pesquisa Pedológica. **Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Rio Grande do Sul**. Recife. (Boletim Técnico, 30), p. 341, 1973.
- BRESOLIN, A. P.; **Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**. 2010. Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- CHEN, L.; SONG, Y.; LI, S.; ZHANG, L.; ZOU, C.; YU, D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1819, p.120–128, 2012
- LIVAK K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. **Methods**, v25, p. 402–408, 2001.
- RAMAMOORTHY, R.; JIANG, S.; KUMAR, N.; VENKATESH, P. N.; RAMACHANDRAN, S. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. **Plant Cell Physiology**, v.49, n.6, p: 865–879, 2008.
- TRAN L. P.; NAKASHIMA M. K.; SAKUMA Y.; SIMPSON S. D.; FUJITA Y.; MARUYAMA K.; FUJITA M.; SEKI M.; SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K. Y. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. **The Plant Cell**, v.16, p.2481–2498, 2004.
- XU, K.; XU, X.; FUKAO, T.; CANLAS, P.; MAGHIRANG-RODRIGUEZ, R.; HEUER, S.; ISMAIL, A.M.; BAILEY-SERRES, J.; RONALD, P.C.; MACKILL, D.J. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, v. 442, p. 705–708, 2006.
- YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Banos: IRRI, 1976.
- ZHOU, Y.; XU, M.; ZHAO, M.; XIE, X.; ZHU, L.; FU, B.; LI, Z. Genome-wide gene responses in a transgenic rice line carrying the maize resistance gene *Rxo1* to the rice bacterial streak pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. **BMC Genomics**, v.11, n.78, 2010.