

## **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES E ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO NO GENOMA DO ARROZ \***

**PRISCILA ARIANE AULER<sup>1</sup>; LETÍCIA CARVALHO BENITEZ<sup>2</sup>; SANTIAGO  
 VASQUEZ-MORENO<sup>3</sup>; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - [pri\\_auler@hotmail.com](mailto:pri_auler@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [lecbenitez@gmail.com](mailto:lecbenitez@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Politécnica de Madrid - [santiago.moreno@upm.com](mailto:santiago.moreno@upm.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - [jacirabraga@hotmail.com](mailto:jacirabraga@hotmail.com)

\* Apoio financeiro CAPES e FAPERGS

### 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ficando atrás apenas do milho (FAO, 2013). Além de ser a principal fonte de alimentação da população mundial, tem grande influência no desenvolvimento sócio-econômico e por isso sua produção tende a ser cada vez mais aperfeiçoada, objetivando maior qualidade e produtividade.

Os estresses abióticos ocorrem, com maior ou menor intensidade, em todas as áreas agrícolas do Brasil (RAMALHO et al., 2009), dentre estes, a salinidade do solo e da água utilizada para irrigação é um fator limitante para a produção de arroz. A tolerância do arroz a salinidade varia conforme o estágio de desenvolvimento da cultura, sendo os períodos de plântula e reprodutivo os mais críticos (DJANAGUIRAMAN et al., 2003).

O genoma dos vegetais é composto por elementos transponíveis (TEs), os quais são sequências de DNA que se movem dentro genoma, e frequentemente se duplicam neste processo (FESCHOTTE et al., 2002). De acordo com Feschotte (2008), os TEs podem influenciar a expressão de genes tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional. Há evidências de que a atividade dos TEs pode estar ligada ao seu estado de metilação, sendo este um dos principais mecanismos epigenéticos relacionados à capacidade de transposição. Sabe-se também, que as alterações epigenéticas são fortemente influenciadas por estresses ambientais, como salinidade (DYACHENKO et al., 2006).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a distribuição dos TEs em regiões de genes associados à salinidade e avaliar o efeito do desmetilante 5-azacytidine (AzaC) como inibidor da metilação de DNA, ativando o movimento dos transposons.

### 2. METODOLOGIA

Foram selecionados 14 genes candidatos responsivos ao estresse salino, conforme informações de dados experimentais de microarranjo das cultivares FL478 (tolerante) e IR29 (sensível) contidas no banco de dados do NCBI-GeoProfiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>). Para a identificação dos TEs foram realizados alinhamentos nas regiões gênicas, *downstream* e *upstream* dos genes candidatos na base de dados GIRI REPBASE (<http://www.girinst.org/>), sendo que a ferramenta de informática base utilizada para realizar as anotações foi ARTEMIS *DNA sequence viewer and annotation tool\_v.13.3.0*.

A partir dos dados obtidos na anotação de elementos de transposição em torno aos 14 genes candidatos, foram desenhados *primers* específicos para cada

loco de interesse. Como norma geral, os *primers* foram ancorados em regiões com alto grau de conservação entre as subespécies *indica* e *japônica* e que os produtos de amplificação apresentassem, ao menos, um elemento transponível potencialmente ativo.

Sementes de arroz dos genótipos Nipponbare (*O. sativa* ssp *japonica*) e BRS Agrisul (*O. sativa* ssp. *indica*) foram desinfestadas e geminadas em câmara de crescimento por 5 dias. Após este período as plântulas, foram divididas em dois lotes e cada lote submetido a um tratamento. No tratamento 1, as plântulas foram umedecidas com água e no tratamento 2 com água contendo 30 mL de uma solução de 5-Aza-2-deoxycytidine (AzaC) na concentração de 130µM, sendo ambos os tratamentos levados para câmara de crescimento durante 3 dias. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para cultivo hidropônico e irrigadas com solução nutritiva de Yoshida por 6 dias. Após este período foram adicionados 0 (controle) e 150 mM de NaCl à solução nutritiva e após 5 dias de exposição ao estresse, folhas e raízes foram coletadas para extrações de DNA e análise de PCR. Desta forma, o experimento foi constituído de quatro tratamentos para cada genótipo: T1 (pré tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + irrigação com Yoshida 0 mM de NaCl); T2 (pré tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + irrigação com Yoshida 150 mM de NaCl); T3 (pré tratamento com AzaC + irrigação com Yoshida 0 mM de NaCl); T4 (pré tratamento com AzaC + irrigação com Yoshida 150 mM de NaCl).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

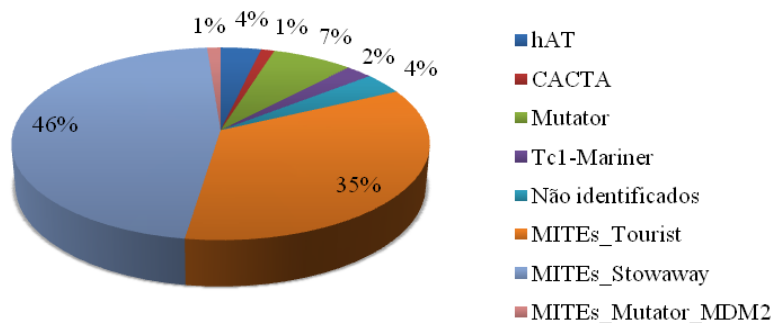
A análise de alinhamento, na base de dados GIRI REPBASE, detectou a ocorrência de 100 TEs com *score* ≥ 600. Deste total, 16% foram encontrados na região gênica, 34% na região *downstream* e 50% na região *upstream*. Os resultados obtidos apontam um maior número de cópias de TEs pertencentes à classe II, sendo os do tipo MITEs os mais freqüentes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de cópias de TEs pertencentes às classes I e II encontrados em 14 genes responsivos à salinidade

Classes	Número de cópias
<b>Classe I</b>	
LTR Retrotransposon	3
Non LTR Retrotransposon	10
<b>Classe II</b>	
<i>Subclasse 1</i>	
Transposons	15
MITEs	69
<i>Subclasse 2</i>	
Helitron	1
<b>Classe Não identificada</b>	2
<b>Total de TEs encontrados</b>	100

Dentre os TEs da classe I, foram encontrados, homólogos a retrotransposons sem LTR, sendo 30% deles pertencentes à ordem LINE e 70% à ordem SINE. Entre os TEs da classe II, o maior número de cópias identificadas, 98,8%, correspondem a TEs da subclasse 1, sendo *hAT* com 4% e *Mutator* com 7%, os mais frequentes, enquanto que dentre os TEs não autônomos do tipo MITEs, *Stowaway-like* e *Tourist-like*, aparecem com 46,4% e 35% das cópias identificadas, respectivamente (Figura 2).

Estes resultados levantam a hipótese de que estes TEs, principalmente os inseridos na região *upstream*, possam estar envolvidos na resposta de alguns destes genes frente ao excesso de salinidade, conferindo maior ou menor plasticidade adaptativa às plantas. Hipótese semelhante foi avaliada por Singh et al. (2010), os quais constataram que o gene *OsGT61-1*, codificador de glicosiltransferase em arroz, é responsivo a ácido abscísico e NaCl. Ao avaliarem a região promotora deste gene encontraram dois TEs do tipo MITEs, denominados *Gaijin* (144 pb) e *Wanderer* (211 pb), porém, constataram que a presença destes TEs influencia de forma negativa a expressão do gene.

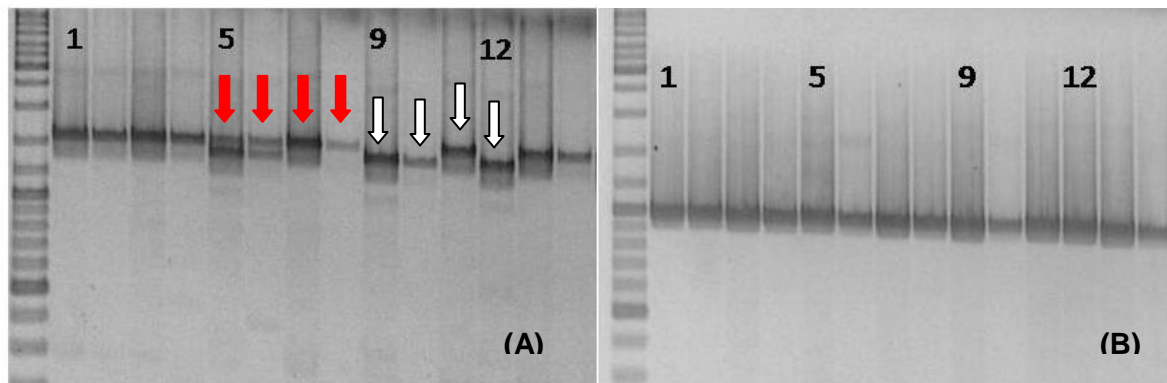


**Figura 2.** Distribuição de TEs encontrados, da Classe II (transposons autônomos e MITEs), em 14 genes responsivos à salinidade, incluindo região gênica, *downstream* e *upstream*.

Foram testados 14 pares de *primers*, distribuídos em 14 diferentes locos: LOC\_OS01g41880, LOC\_OS03g14654, LOC\_OS07g39630, LOC\_OS08g20544, LOC\_OS11g06720, LOC\_OS07g07050, LOC\_OS02g57450, LOC\_OS03g44500, LOC\_OS01g43870, LOC\_OS06g48950, LOC\_OS08g10020, LOC\_OS02g41590, LOC\_OS09g38700 e LOC\_OS04g38270. Apenas o loco LOC\_OS01g41880 foi polimórfico, evidenciando diferenças entre os genótipos e entre os tratamentos.

No tratamento 2, foram identificados dois alelos nas amostras de folhas e raízes de BRS Agrisul e um alelo na amostra de folhas de Nipponbare (Figura 3A, setas vermelhas). No tratamento 3, as amostras de folha e raiz de BRS Agrisul apresentaram tamanho de *amplificom* diferente aos observados nos tratamentos 1 e 2 e igual ao tratamento 4 (Figura 3A, setas brancas).

De acordo com Grandbastien (2004) tem sido observada a ativação dos TEs em situações de estresse, tanto de origem biótica quanto abiótica. No entanto, para identificar se a origem do polimorfismo referente ao tamanho dos *amplificons* é devido a transposição induzida por NaCl ou AzaC, serão necessários estudos complementares de sequenciamento. Os demais marcadores testados foram monomórficos, conforme exemplo ilustrado na Figura 3B.



**Figura 3.** Gel de eletroforese para LOC\_OS01g41880 (A) e LOC\_OS03g14654 (B). Amostras 1-4: pré tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + irrigação com Yoshida 0 mM de NaCl, folha e raiz BRS Agrisul e folha e raiz Nipponbare, respectivamente. Amostras 5-8: pré tratamento com AzaC + irrigação com Yoshida 0 mM de NaCl, folha e raiz BRS Agrisul e folha e raiz Nipponbare, respectivamente. Amostras 9-11: pré tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + irrigação com Yoshida 150 mM de NaCl, folha e raiz BRS Agrisul e folha Nipponbare, respectivamente. Amostras 12-14: pré tratamento com AzaC + irrigação com Yoshida 150 mM de NaCl, folha BRS Agrisul e folha e raiz Nipponbare, respectivamente. O marcador de peso molecular utilizado foi *DNA Ladder Mix* (10000 pb) (GeneRuler™).

#### 4. CONCLUSÕES

Existe uma maior frequência de elementos transponíveis na região *upstream* de genes responsivos à salinidade, sendo o maior número de cópias de TEs pertencentes à classe II do tipo MITEs (*Stowaway-like* e *Tourist-like*); e o LOC\_OS01g41880 é polimórfico para os genótipos e tratamentos estudados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DYACHENKO, O.V.; ZAKHARCHENKO, N.S.; SHEVCHUK, T.V.; BOHNERT, H.J.; CUSHMAN, J.C.; BURYANOV, Ya.I. Effect of hipermethylation of CCWGG sequences in DNA of Mesembryanthemum crystallinum plants on their adaptation to salt stress. **Biochemistry**, v.31, n.4, p.461-465, 2006.
- DJANAGUIRAMAN, M.; RAMADASS, R.; DEVI, D.D. Effect of salt stress on germination and seedling growth in rice genotypes. **The Madras Agricultural Journal**. v.9, p.50-53, 2003.
- FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Acessado em 23 de set. 2013. Online. Disponível em: <http://www.fao.org/>.
- FESCHOTTE, C.; JIANG, N.; WESSLER, S.R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.329-341, 2002.
- FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, V. 9, P.397-405, 2008.
- GRANDBASTIEN, M.A. Stress activation and genomic impact of plant retrotransposons. **Journal of Social Biology**, v.198, p.425-432, 2004.
- RAMALHO, M.A.P.; SILVA, G.S.; DIAS, L.A.S. Genetic plant improvement and climate changes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.189-195, 2009
- SINGH, A.; SINGH, U.; MITTAL, D.; GROVER, A. Transcript expression and regulatory characteristics of a rice glycosyltransferase *OsGT61-1* gene. **Plant Science**, v.179, p.114-122, 2010.