

EXPRESSÃO DE GENES *LTPs1* EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO EM PLÂNTULAS DE ARROZ

PRISCILA ARIANE AULER^{1*}; GABRIELA PERES MORAES^{2*}; LETÍCIA CARVALHO BENITEZ^{2*}; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL^{2*}; ISABEL LOPES VIGHI^{2*}; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA^{3*}

¹Universidade Federal de Pelotas – pri_auler@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

*Apoio Financeiro CAPES e FAPERGS

1. INTRODUÇÃO

Considerado um dos cereais mais importantes do mundo, o arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado e consumido em todos os continentes, ocupando posição de destaque do ponto de vista social e econômico, por isso, sua produção tende a ser cada vez mais aperfeiçoada, objetivando maior qualidade e produtividade (FAO, 2013).

O estresse salino é um dos principais fatores abióticos que causam perdas acentuadas na produtividade das culturas. A tolerância do arroz a salinidade varia conforme o estágio de desenvolvimento, sendo os períodos de plântula e reprodutivo os mais críticos (DJANAGUIRAMAN et al., 2003). Dentre os principais danos causados pelo estresse salino, a nível celular, destacam-se os distúrbios na membrana plasmática, sendo seus efeitos manifestados por alterações na permeabilidade, na composição lipídica, potencial elétrico e atividade de enzimas e proteínas ligadas à membrana (PANDA; KHAN, 2009).

As proteínas LTPs (“Lipid Transfer Proteins”) compõem uma família também descrita como “Alpha-Amylase Inhibitors” (AAI), “Lipid Transfer” (LT) e “Seed Storage” (SS). Uma das funções importantes que tem sido atribuída a essas proteínas é o seu envolvimento em diferentes estresses abióticos (JANG et al., 2002). Genes que codificam proteínas LTPs foram diferencialmente regulados por várias condições ambientais, tais como temperatura elevada (OSHINO et al., 2007), estresse por frio (HWANG et al., 2005), estresse salino (CHOI et al., 2008) e estresse por metais pesados (GUO et al., 2007).

Conseqüentemente, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão diferencial de 11 genes que codificam membros da família de proteínas LTP1 em uma cultivar de arroz tolerante e uma sensível, submetidas ao estresse salino.

2. METODOLOGIA

A identificação *in silico* de possíveis genes *LTPs1* de arroz foi feita a partir das informações contidas no banco de dados de famílias gênicas Phytozome v.9.1, sendo selecionadas apenas as sequências de proteínas anotadas com o domínio HMMPfam PF00234 (*plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor*). As sequências de aminoácidos foram então alinhadas no banco de domínios conservados de proteínas CDD (*Conserved Domains and Protein Classification*) a fim de verificar se continham o motivo conservado de oito resíduos de cisteína, característico de proteínas LTPs.

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) dos genótipos BRS Bojuru (tolerante ao sal) e BRS Ligeirinho (sensível ao sal) foram germinadas e transferidas para potes plásticos contendo areia como substrato e mantidas em casa de vegetação.

Ao atingirem o estágio de desenvolvimento V_4 , as plantas foram submetidas à irrigação alternada, com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938) e água contendo NaCl na concentração de 150 mM (100 mL/pote). Foram realizadas cinco coletas com intervalo de 24 horas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao sal, com 3 repetições biológicas por tratamento).

O RNA total foi extraído com o reagente *Plant RNA Reagent Purilink* (Invitrogen®) e o cDNA fita simples sintetizado por transcrição reversa utilizando o *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-qPCR* (Invitrogen®). A partir das sequências nucleotídicas retiradas dos AKs, os *primers* foram desenhados com o auxílio dos softwares PRIMER EXPRESS V 3.0, BioEdit v7.0 e PerlPrimer v1.1.21.

A especificidade e curva padrão de eficiência dos *primers* foram avaliadas para cada genótipo. A especificidade foi observada a partir da existência de um pico único na curva de *melting* e a eficiência (E) foi obtida a partir de quatro diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:5, 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de *primer* testado. Foram selecionados os *primers* que obtiveram valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110%.

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o fluoróforo *SYBR Green* (Applied Biosystems®), sendo estas realizadas com triplicatas biológicas e técnicas. Utilizou-se como normalizador interno da reação o gene *UBQ10* (AK101547). A quantificação relativa da expressão (QR) foi feita utilizando o “método de comparação de CT” (*comparative threshold cycle method*) (LIVACK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando-se a equação $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Com base nos valores de quantificação relativa (QR) foram feitas análises de similaridade e agrupamento, a fim de agrupar os genes *LTPs* com respostas de expressão mais semelhantes. A similaridade foi estimada através da Distância Euclidiana (rotina *proc distance*), enquanto que para o agrupamento foi utilizado o método UPGMA (*proc cluster*) do software estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, observou-se que o gene *LTP7* apresentou um aumento de expressão de 19,01 às 96h horas de estresse na cultivar tolerante, quando comparado com uma expressão de 9,04 no genótipo sensível (Figura1). Já o gene *LTP10* apresentou alto valor de expressão, 70 vezes mais, às 96 horas de estresse, na cultivar BRS Ligeirinho quando comparado com o tratamento controle. Na cultivar BRS Bojuru esse mesmo gene manteve um padrão de expressão mínimo durante todos os tempos de exposição ao estresse salino. As respostas de expressão de um mesmo gene frente ao estresse podem variar amplamente em função do estágio de desenvolvimento, tecido ou órgão, tipo e intensidade de estresse, bem como do genótipo. Neste sentido, TAPIA et al. (2013) observaram que, em *Lotus japonicus*, submetidos a estresse por seca, a expressão do gene *LTP10* foi induzida em folhas e caules, porém foi reprimida em raízes.

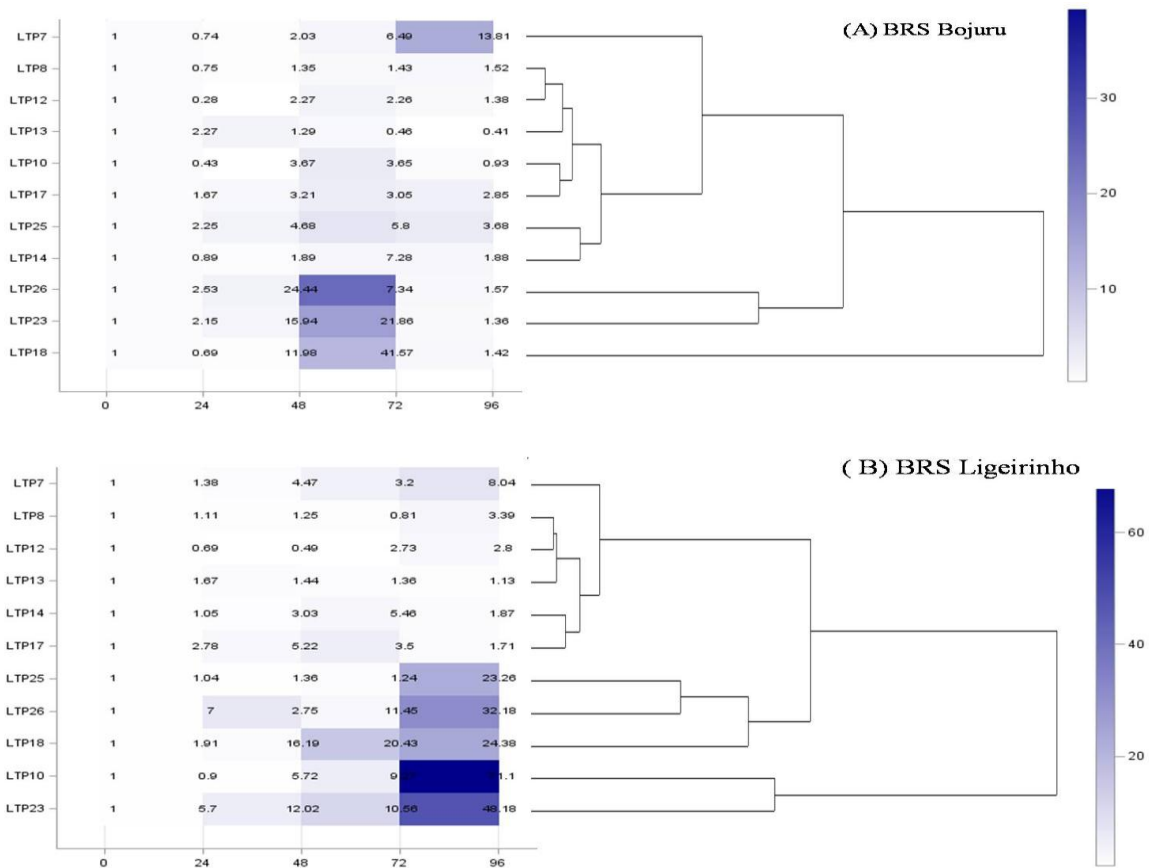


Figura 1- Dendrogramas e heatmap resultantes da análise de agrupamento dos genes *LTPs* com base nos valores de quantificação relativa (QR) para os genótipos BRS Bojuru (A) e BRS Ligeirinho (B).

Os genes *LTP26*, *LTP23* e *LTP18* apresentaram aumento de expressão tanto no genótipo sensível quanto no tolerante, porém com níveis de expressão e tempos de resposta diferenciados entre os genótipos. Resultados semelhantes foram obtidos por WANG et al. (2012). O envolvimento de genes *LTPs* em resposta ao estresse salino também foi observado em outras espécies, como a cevada (*Hordeum vulgare* L.) (FEDERICO et al., 2005).

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o gene *LTP7* tem elevados níveis de expressão no genótipo tolerante (BRS Bojuru), enquanto *LTP10* possui níveis mais elevados de expressão do genótipo sensível (BRS Ligeirinho). Estes resultados salientam a importância de mais estudos para identificar marcadores moleculares na seleção de genótipos contrastantes ao estresse salino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOI, A.M.; LEE, S.B.; CHO, S.H.; HWANG, I.; HUR, C.G.; SUH, M.C. Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, França, v.46, n.2, p.127-139, 2008.

DJANAGUIRAMAN, M.; RAMADASS, R.; DEVI, D.D. Assessment of rice genotypes for salinity tolerance at germination and seedling stage. **The Madras Agricultural Journal**, Índia, v.90, n.9, p.50-53, 2003.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Acessado em 23 de jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.fao.org/>.

FEDERICO, M.L., KAEPLER, H.F., SKADSEN, R.W. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley *Ltp* gene is determined by a shortened promoter sequence. **Plant Molecular Biology**, Suécia, v.57, n.1, p.35-51, 2005.

GUO, P.; BAI, G.; CARVER, B.; LI, R.; BERNARDO, A.; BAUM, M. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. **Molecular Genetics and Genomics**, Suécia, v.277, n.1, p.1-12, 2007.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. EUA, University of California College of Agriculture, Berkeley, 1938.

HWANG, E.W.; KIM, K.A.; PARK, S.C.; JEONG, M.J.; BYUN, M.O.; KWON, H.B. Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. **Journal of Bioscience**, Índia, v.30, n.5, p.657-667, 2005.

JANG, C.; KIM, D.; BU, S.; KIM, J.; LEE, S.; KIM, J.; JOHNSON, J. Isolation and characterization of lipid transfer protein (LTP) genes from a wheat-rye translocation line. **Plant Cell Reports**, Alemanha, v.20, n.10, p. 961-966, 2002.

LIVACK, K.J; SCHMITTGEN, T.S. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, EUA, v.25, p. 402-408, 2001.

OSHINO, T.; ABIKO, M.; SAITO, R.; ICHIISHI, E.; ENDO, M.; KAWAGISHI-KOBAYASHI, M. Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. **Molecular Genetics and Genomics**, Suécia, v. 278, p.31-42, 2007.

PANDA, S.K.; KHAN, M.H.G. Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal Agronomy and Crop Science**, Alemanha, v.195, n.6, p.442-454, 2009.

TAPIA, G.; MORALES-QUINTANA, L.; PARRA, C.; BERBEL, A.; ALCORTA, M. Study of *nsLTPs* in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (*LjLTP10*) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. **Plant Molecular Biology**, Suécia, v.82, n.4-5, p.485-501, 2013.

WANG, N.J.; LEE, C.C.; CHENG, C.S.; LO, W.C.; YANG, Y.F.; CHEN, M.N.; LYU, P.C. Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB). **BMC Genomics**, Inglaterra, v.13 n.1 p.1-9, 2012.