

EXPRESSÃO GENICA DIFERENCIAL EM GENOTIPOS DE ARROZ CONTRASTANTES QUANTO À TOLERÂNCIA AO FRIO NOS ESTÁDIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO

CAROLINE BORGES BEVILACQUA¹; SILVANA SPANIOL FIN²; CAROLINA
 TERRA BORGES²; EDUARDO VENSKE²; PAULO DEJALMA ZIMMER³

¹ PPGCTS – FAEM/UFPeI, Pelotas, RS, Brasil– carolinebevi@gmail.com

² PPGCTS – FAEM/UFPeI, Pelotas, RS, Brasil Pelotas – silvana_fin@hotmail.com;
 carol_tborges@hotmail.com; eduardo.venske@yahoo.com.br

³ PPGCTS – FAEM/UFPeI, Pelotas, RS, Brasil– dejalma@msn.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal mais consumido no planeta, constituindo-se a base da alimentação de 2/3 da população mundial. Entre os países produtores, o Brasil está em décimo lugar, com uma produção média de 11 milhões de toneladas (FAO, 2013). No Rio Grande do Sul (RS) predomina-se o cultivo sob irrigação por inundação e o Estado destaca-se como maior produtor nacional, responsável por mais de 60% do total produzido no Brasil (SOSBAI, 2012).

Existem fatores que podem prejudicar a produtividade do arroz, entre os quais, a ocorrência de temperaturas baixas é um dos estresses que causam maiores injúrias às plantas. Nas fases iniciais de desenvolvimento pode prejudicar a germinação, emergência e estabelecimento da cultura do arroz. A ocorrência de frio é considerado um problema para essa cultura, pois a grande maioria das cultivares em uso, no Brasil, é de origem tropical (MERTZ et al., 2009), e tendo em vista ser um fator de difícil controle, a busca pela tolerância desse estresse abiótico é a principal solução para evitar prejuízos (SERAFIM, 2003).

Alguns genótipos de arroz são mais tolerantes ao estresse pelo frio do que outros, e isso pode ser atribuído a diversos genes. Entre esses genes que apresentam expressão gênica diferencial, sob condições de baixa temperatura se destacam JRC 2606 e JRC 3709 (RABANNI et al., 2003). Atualmente existe um grande número de estratégias disponíveis para analisar a expressão diferencial de genes de interesse, como a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).

Frente ao exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão dos genes JRC 2606 e JRC 3709 em diferentes genótipos de arroz.

2. METODOLOGIA

Para a obtenção do material vegetal o experimento foi instalado em BOD, no laboratório de sementes Flávio Farias Rocha do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas - RS, em delineamento completamente casualizado, com três repetições. Foram utilizados três genótipos de arroz, o ecótipo de arroz vermelho 116 e cultivares BRS 6 Chuí (sensível ao frio) e Diamante (tolerante ao frio).

O arroz foi semeado sob o substrato vermiculita em vasos de 200 mL mantido em câmara de crescimento 14 dias, no escuro. Nos tratamentos com frio, utilizou-se a temperatura alternada de 18°C por 10 h e 13°C por 14 h e a testemunha a 25°C. A coleta dos coleóptilos foi realizada aos 14 dias após

semeadura, os quais foram colocados em nitrogênio líquido e armazenados a 80 °C para a posterior extração de RNA.

O RNA foi extraído utilizando-se o Kit Trizol – (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram submetidas a digestão com DNase I™ (Invitrogen™) e tiveram sua pureza e integridade mensuradas através de análises de absorvância (260/280 nm), através do espectrofotômetro Nano Vue (Plus Spectrophotometer) e por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para a síntese do cDNA fita simples foi utilizado o kit III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) segundo as recomendações do fabricante.

Os pares de primers dos genes JRC 2606 e JCR 3709, juntamente com o endógeno actina foram obtidos a partir das sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise quantitativa de expressão gênica em tempo real (qRT-PCR) dos genes foi realizada em um equipamento LightCycler 480 Instrument II (96)™ (Roche Applied Science™) usando o SYBR® Green.

Os dados ópticos foram posteriormente analisados com auxílio do programa LightCycler® 480 Gene Scanning Software. Para o cálculo do nível da expressão gênica foi utilizada a equação $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) no qual QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial, ΔCT se refere à diferença entre o CT da amostra amplificada para o gene alvo e o CT da mesma amostra amplificada para o gene controle (actina) e o $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra de interesse e o ΔCT da amostra de referência-calibrador, que foi a amostra sem tratamento por frio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 está demonstrada a expressão dos genes JRC 2606 e JRC 3709 nos três genótipos de arroz estudados, sob estresse por baixas temperaturas nos estádios iniciais de desenvolvimento, relativamente à expressão em condições de temperatura ótima de cultivo.

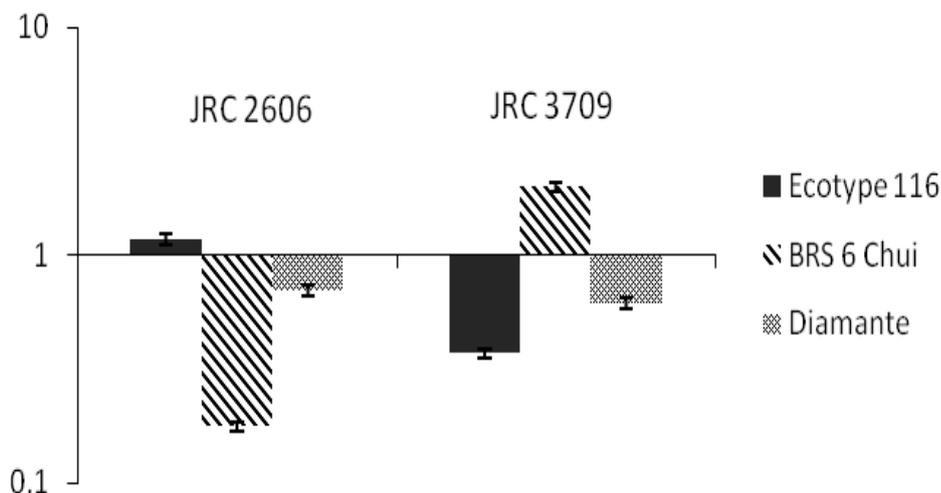


Figura 1. Expressão relativa dos genes JRC 2606 e JRC 3709 em genótipos de arroz em estádios iniciais de desenvolvimento sob condições de baixa temperatura.

Observou-se maior expressão do gene JRC 2606 no ecótipo de arroz vermelho 116. Na cultivar BRS 6 Chuí houve a menor expressão entre os demais,

sendo que na Diamante a expressão deste gene também foi mais baixa que sob condições ótimas de temperatura. Para o gene JRC 3709 a maior expressão é observada em BRS 6 Chuí, seguida de Diamante e, com menor expressão, o ecótipo 116.

Glutamato desidrogenase (JRC 2606) é uma enzima hexamérica envolvida no metabolismo de nitrogênio, que é codificada por dois genes separados, GDH1 e GDH2, enquanto JRC 3709 é uma proteína calcineurina B, que desempenha um papel na regulação da expressão da Glutamato desidrogenase (TURANO, et al., 1997)

Observando a relação entre a expressão de Glutamato desidrogenase e calcineurina B verifica-se que a cultivar tida como tolerante ao estresse em estudo (Diamante) apresentou um equilíbrio na expressão destas duas proteínas, diferentemente do que ocorreu com os outros genótipos, que apresentaram um desbalanceamento em termos da expressão, isto é, expressaram elevadamente uma das proteínas e de tiveram reduzida a expressão da outra.

4. CONCLUSÕES

Sob condições de baixa temperatura no desenvolvimento inicial, há contrastes na expressão dos genes JRC 2606 e JRC 0937 entre os genótipos de arroz estudados, sendo que o ecótipo de arroz vermelho 116 apresenta maior expressão de JRC 2606 e BRS 6 Chuí de JRC 0937, sendo sugerido que estes genes podem ser utilizados como marcadores moleculares para a seleção de genótipos de arroz com tolerância ao frio nas fases iniciais de desenvolvimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Acesso 23 jan.2013. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; CRUZ, H.L., MENEGHELLO, G.E.; FERRARI, C.S; ZIMMER, PD. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, n.1, p.23-29, 2009.

RABBANI, M.A., MARUYAMA, K., ABE, H., KHAN, M.A., KATSURA, K., ITO, Y., YOSHIWARA, K., SEKI, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. **Plant Physiology** 133: 1755–1767, 2003.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, n.6, p.1101-1108, 2008.

SERAFIM, D. C. S. Mapeamento de QTLs para tolerância ao frio e características de importância agrônômica em arroz. **Dissertação** (mestrado) em Fitotecnia / Área de concentração Plantas de Lavoura, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

SOSBAI. XXIX REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO. **Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Sociedade sul-brasileira de Arroz irrigado. Gravatal, RS -2012.

TURANO, F.J.; THAKKAR, S.S.; FANG, T., WEISEMANN, J.M. Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, n.113, p.1329-1341, 1997.