

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**



**Dissertação**

**Expressão de genes WRKY e alterações morfológicas em arroz sob  
estresse por submergência**

**Vívian Ebeling Viana**

**Pelotas, 2014**

**Vívian Ebeling Viana**

**Expressão de genes WRKY e alterações morfológicas em arroz sob  
estresse por submergência**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia área de concentração em Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.**

**Orientador: Antonio Costa de Oliveira**

**Co-orientador (es): Luciano Carlos da Maia**

**Naciele Marini**

**Pelotas, 2014**

**Dados de catalogação na fonte:**

Maria Beatriz Vagheti Vieira – CRB-10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V614e Viana, Vívian Ebeling

Expressão de genes WRKY e alterações morfológicas em arroz sob estresse por submergência / Vívian Ebeling Viana. – 99f. : Il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Área de concentração: Fitomelhoramento. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 20134. – Orientador Antonio Costa de Oliveira; co-orientador Luciano Carlos da Maia e Naciele Marini.

1.Agronomia. 2. Fitomelhoramento. 3. *Oryza sativa*. 4.

**Banca examinadora:**

Antônio Costa de Oliveira, Ph.D. – FAEM/UFPeI – ORIENTADOR  
(PRESIDENTE)

Naciele Marini, Dr<sup>a</sup>. – FAEM/UFPeI, Pós doutoranda, Bolsista  
CAPES/EMBRAPA – CO-ORIENTADORA

Rogério Oliveira de Souza, Dr. – FAEM/UFPeI

Taciane Finatto, Dr<sup>a</sup>. - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dedico aos meus pais Amauri e Cristina e minha irmã Aline

Minha vida.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Ph.D. Antonio Costa de Oliveira por investir sua confiança e ideias, me proporcionando desenvolver este trabalho.

Ao Professor Dr. Co-orientador Luciano Carlos da Maia, pelos conhecimentos que muitos contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Naciele Marini pois, além de co-orientar foi amiga, foi paciente, foi persistente e quando foi necessário, teve pulso forte e, hoje posso dizer que devo a ela todo meu conhecimento no laboratório de biologia molecular.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia pela oportunidade em realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Professora Juliana Fernando do Instituto de Biologia, pela disponibilidade e compreensão na realização de uma etapa deste trabalho.

Ao CDTEC pela disponibilidade para que fosse possível realizar uma etapa este trabalho.

A Embrapa pela disponibilidade para que fosse possível realizar uma etapa este trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Naciele Marini, Dr<sup>a</sup> Taciane Finatto e ao Dr Rogério de Oliveira Souza por aceitarem o convite e fazerem parte da banca examinadora.

Ao Professor Eduardo Soares, pela ajuda com a língua inglesa e a contribuição para este trabalho.

Aos meus pais, Amauri e Cristina por me proporcionarem, com todo amor e dedicação, ser o que sou hoje.

A minha irmã Aline, fiel amiga de todas as horas.

Agradeço especial ao Carlos Busanello, colega, amigo e companheiro, pela força, compreensão, alegria e que muito contribuiu com o desenvolvimento deste trabalho.

A Roberta Ebeling e a Senhorinha Marlene pelo apoio e pela fiel torcida.

Ao grupo do Centro de Genômica e Fitomelhoramento/UFPel, em especial as meninas, companhia de todos os dias, Bianca Hoffman, Daisy Ramirez (pela companhia de sala), Gabriela Lemos (pelas dicas e risadas), Glacy Silva (pelo conhecimento científico), Fabiane dos Santos (pela companhia na ida a cantina), Mariana Kruger, Naciele Marini (a chefe), Solange Silveira (pelos debates e companhia no lab.), Raissa Martins, e ao Railson Santos (pelos conhecimentos científicos).

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com meu desenvolvimento científico e pessoal.

Agradeço a Deus, não por fim, mas porque sem ele eu não teria tido todas estas oportunidades e não teria tido a oportunidade em conhecer todas estas pessoas importantes na minha vida.

## Resumo

VIANA, Vívian Ebeling. **Expressão de genes WRKY e alterações morfológicas em arroz sob estresse por submergência.** 2014, 99f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS - Brasil.

O crescimento populacional mundial tem contribuído para uma maior demanda de arroz, enquanto que alterações ambientais, causadas pelo homem, contribuem com o aumento da frequência de precipitações. Estas condições formam um ambiente de hipoxia, e restringem a produção do arroz. Frente a isso as plantas respondem com adaptações morfológicas e alterações em nível molecular. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos morfológicos e anatômicos em cultivares de arroz *Oryza sativa* L. submetidas a hipoxia e verificar o perfil de expressão dos genes de regulação complexa e simples de fatores de transcrição WRKY envolvidos na resposta ao estresse por hipoxia. Os resultados obtidos demonstraram que ocorre alterações morfológicas e anatômicas nas cultivares de arroz irrigado quando submetidas ao estresse por hipoxia, principalmente no sistema radicular. Ainda, o aerênquima é mais desenvolvido nas cultivares Epagri 108 e Nipponbare quando submetidas ao estresse por hipoxia. No estudo de expressão gênica através da técnica de qRT-PCR, foi possível observar que os genes WRKY responderam ao estresse por hipoxia, mas não foi possível, para este estresse, verificar uma diferença entre a resposta do perfil de expressão dos genes de regulação simples e complexa em plântulas de arroz sob estresse por hipoxia.

**Palavras-chave:** *Oryza sativa*, hipoxia, adaptações morfológicas, expressão gênica, estresse abiótico.

## Abstract

Viana, Vivian Ebeling. **Expression of genes WRKY and morphological alterations in rice under stress by submergence**. 2014, 99p. Master Degree Dissertation – Post Graduation Program in Agronomy. Federal University of Pelotas – RS – Brazil.

The growth of the world's population has contributed for a greater demand of rice while environmental alterations caused by men contribute to an increase of rainfall. This conditions create a hypoxia environment and restrict the production of rice. Under these conditions, plants with morphological adaptations and alterations in molecular level. Thus, this work had as its objective to evaluate the morphological and anatomical effects in rice cultivars *Oryza sativa* L. submitted to hypoxia and to verify the expression profile of genes of complex and simple regulation of WRKY transcription factors involved in the response of stress by hypoxia. The results obtained demonstrated that morphological and anatomical alterations occur in cultivars of irrigated rice when submitted to stress by hypoxia, manly in their root system. Furthermore, the aerenchyma is more developed in the cultivars Epagri 108 and Nipponbare when submitted to stress by hypoxia. In the study of genic expression through the qRT-PCR technique, it was possible to observe that the WRKY genes responded to stress by hypoxia but it not possible, for this stress, to verify a difference between the response of the expression profile of genes of simple and complex regulation in seedlings of rice under stress by hypoxia.

Keywords : *Oryza sativa* , hypoxia , morphologic adaptations, gene expression, abiotic stress .

## Lista de Figuras

### CAPÍTULO II - ANÁLISE MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DE CULTIVARES DE ARROZ SOB ESTRESSE POR SUBMERGÊNCIA

- Figura 1. (A) Recipientes de 2L contendo areia com as plântulas de arroz sob irrigação com água e solução nutritiva, (B) Recipientes de 2L contendo as plântulas de arroz em submergência, (C) Plântulas de cultivares de arroz irrigado com 14 dias, sob tratamento controle, sem estresse por hipoxia, (D) Plântulas de cultivares de arroz irrigado com 16 dias, sob tratamento de 48h de estresse por hipoxia. CGF/FAEM/UFPel 2014.....47
- Figura 2. Gráfico de regressão para o caráter de número de raízes para as cultivares de arroz irrigado. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....52
- Figura 3. Gráfico de regressão para o caráter de matéria fresca de raiz (MFR), para as cultivares de arroz irrigado. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....53
- Figura 4. Gráfico de regressão para o caráter de matéria seca de raiz (MSR), para as cultivares de arroz irrigado. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....53
- Figura 5: Desenvolvimento de aerênquima na região intermediária de raízes de plântulas de arroz submetidas a hipoxia. Secção transversal em raiz da cultivar Epagri 108 submetida ao tratamento controle (A), secção transversal em raiz da cultivar Epagri 108 submetida ao tratamento de hipoxia por 48h (B), secção transversal em raiz da cultivar Nipponbare submetida ao tratamento controle (C), secção transversal em raiz da cultivar Nipponbare submetida ao tratamento de hipoxia por 48h (D), secção transversal em raiz da cultivar BR IRGA 409 submetida ao tratamento controle (E) e secção transversal em raiz da cultivar BR IRGA 409 submetida ao tratamento de hipoxia por 48h (F). As barras nas fotomicrografias equivalem a 30 µm. Sendo, ep: epiderme, ex: exoderme, es: esclerênquima, ae: aerênquima e em: endoderme. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....55

### CAPÍTULO III - PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA FAMÍLIA WRKY SOB ESTRESSE POR SUBMERGÊNCIA

- Figura 1. Figura da fórmula do cálculo referente à eficiência do inicializador utilizado. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....68
- Figura 2. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY11*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....71
- Figura 3. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY23* analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....72
- Figura 4. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY17*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....73
- Figura 5. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY19*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....74
- Figura 6. Gráfico com o perfil de expressão do gene de *regulação* intermediária *OsWRKKY4*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....75
- Figura 7. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação intermediária *OsWRKKY73*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEl, 2014.....76

- Figura 8. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação simples *OsWRKKY56*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....77
- Figura 9. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação simples *OsWRKKY62*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....78
- Figura 10. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação simples *OsWRKKY71*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....79
- Figura 11. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY11*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....80
- Figura 12. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY23*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....81
- Figura 13. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY17*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....81
- Figura 14. Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY19*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPEL, 2014.....82
- Figura 15. Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação intermediária *OsWRKY4*, analisado no tratamento controle (0h) e em

quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....83

Figura 16. Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação intermediária *OsWRKY73*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....84

Figura 17. Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação simples *OsWRKY56*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....85

Figura 18. Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação simples *OsWRKY62*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....85

Figura 19. Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação simples *OsWRKY71*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....86

Figura 20. Perfil de expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse por hipóxia, analisados em cinco tratamentos (0h, 6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado (A) cultivar Nipponbare, (B) cultivar Epagri 108 e (C) cultivar BR IRGA 409, através da técnica de qRT-PCR e representado por escalas que variam de 1 – 146.4, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....92

Figura 21. Perfil de expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse por hipóxia, analisados em cinco tratamentos (0h, 6h, 12h, 24h e 48h), no tecido radicular de três genótipos de arroz irrigado (A) cultivar Nipponbare, (B) cultivar Epagri 108 e (C) cultivar BR IRGA 409,

através da técnica de qRT-PCR e representado por escalas que variam de 1 – 146.4, utilizando o *Multi Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....93

## Lista de tabelas

### **CAPÍTULO II - ANÁLISE MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DE CULTIVARES DE ARROZ SOB ESTRESSE POR SUBMERGÊNCIA**

Tabela 1. Análise de variância conjunta para os caracteres de comprimento de parte aérea (CPA), em cm, comprimento de raiz (CR), em cm, número de raízes (NR), número de folhas (NF), comprimento de coleóptilo (CC), em cm, massa fresca da parte aérea e raiz (MFPA e MFR), em gramas, massa seca da parte aérea e raiz (MSPA e MSR) em gramas, de plântulas de cultivares arroz irrigado, submetidas ao estresse por hipoxia. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....50

Tabela 2. Teste de comparação de médias para o caractere de massa fresca da parte aérea (MFPA) nas cultivares de arroz irrigado quando submetidas ao estresse por hipoxia. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....51

Tabela 3. Teste de comparação de médias para os caracteres: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleóptilo (CC), massa fresca e massa seca de parte aérea (MFPA e MSPA), nas cultivares de arroz irrigado quando submetidas ao estresse por hipoxia. UFPel/FAEM/CGF, 2014.....51

### **CAPÍTULO III - PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA FAMÍLIA WRKY SOB ESTRESSE POR SUBMERGÊNCIA**

Tabela 1. Classificação dos genes quanto ao número de elemento *cis* e ao processo de regulação. CGF/FAEM/UFPel 2014.....64

Tabela 2. Informações referentes aos genes e suas sequências de nucleotídeos utilizados nas análises de expressão dos genes em qRT-PCR. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....66

Tabela 3. Resultados do experimento de validação dos genes *OsWRKY11*, *OsWRKY23*, *OsWRKY56*, *OsWRKY17*, *OsWRKY71*, *OsWRKY4*, *OsWRKY19*, *OsWRKY73*, *OsWRKY62*, *UBQ5*, *eEF-1 $\alpha$* , *NAPB*, *OsWRKY1*, *OsWRKY35*, *OsWRKY113*, *OsWRKY46/91*, *OsWRKY40*, *OsWRKY97*, *OsWRKY64*, *Os03g20560* e *OsWRKY28* realizados a partir de diluições seriadas de cDNA de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2014.....70

## Sumário

1- Introdução geral .....	19
1.2 – Referências bibliográficas .....	19
2 - Capítulo I .....	21
Revisão bibliográfica .....	21
2.1 - A cultura do arroz .....	21
2.2 - O solo do Sul do Brasil .....	22
2.3 - Estresses abióticos .....	22
2.4 - Estresse ocasionado por submergência .....	24
2.5 - Regulação gênica .....	26
2.6 - Elementos elementos regulatórios de ação <i>cis</i> e o controle da expressão gênica .....	27
2.7- Genes <i>WRKY</i> .....	29
2.8 – Estrutura e classificação dos <i>WRKY</i> .....	29
2.9 - Função dos <i>WRKY</i> .....	32
Referências Bibliográficas .....	33
3- Capítulo II .....	44
Análise morfológica e histológica de cultivares de arroz sob estresse por submergência .....	44
3.1- Introdução .....	44
3.2- Material e Métodos .....	46
3.2.1- Material Vegetal .....	46
3.2.2- Análises histológicas das raízes .....	48
3.3- Resultados e discussão .....	48
3.3.1 – Avaliação da morfologia de plântulas de arroz irrigado .....	48
3.3.2 – Desenvolvimento de aerênquima em raízes de arroz irrigado sob estresse por submergência .....	54
3.4- Conclusões .....	56
4 - Capítulo III .....	59
Perfil de expressão de genes da família <i>WRKY</i> sob estresse por submergência .....	59
4.1 - Introdução .....	59
4.2 - Material e métodos .....	60

4.2.1 - Indução do estresse e obtenção das amostras vegetais.....	60
<b>4.2 - Extração de RNA total.....</b>	<b>61</b>
4.2.3 - Síntese de cDNA.....	62
4.2.4 – Seleção e desenho de inicializadores para qRT-PCR.....	63
4.2.5 - Análise estatística .....	68
<b>4.3 – Resultados.....</b>	<b>69</b>
4.3.1 Validação dos inicializadores .....	69
4.3.2 - Perfil de expressão dos genes da família WRKY na parte aérea de cultivares de arroz submetidas ao estresse por submergência.....	71
4.3.3 - Perfil de expressão dos genes da família WRKY no tecido radicular de cultivares de arroz submetidas ao estresse por submergência.....	79
<b>4.4 - Discussão .....</b>	<b>86</b>
<b>4.6 – Conclusões.....</b>	<b>94</b>
<b>4.7 - Referências bibliográficas.....</b>	<b>94</b>
<b>5- Considerações finais .....</b>	<b>98</b>

## 1- Introdução geral

O arroz é um dos alimentos mais importantes, sendo consumido por mais da metade da população mundial todos os dias (IRRI, 2014). O aumento das temperaturas em decorrência do aquecimento global poderá provocar fortes impactos na produção deste cereal. O mais recente relatório do IPCC (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas) prevê que a produção de alimentos em todo o mundo poderá sofrer um impacto drástico nas próximas décadas, por conta destas mudanças climáticas, causando uma importante influência na segurança alimentar em todo o mundo (IPCC, 2013; GRISP, 2014).

Um dos estresses que poderá ser causado pelas alterações da geografia na produção agrícola no Brasil, é o estresse por inundação. O excesso de água é uma das principais restrições para o cultivo de arroz em solos de várzea. A submersão a curto prazo (*flash floods*), por mais de duas semanas pode causar sérias perdas nos campos de arroz, independentemente do estágio de desenvolvimento do vegetal. Sendo assim, novas variedades de arroz tolerantes a estresses abióticos, incluindo a submersão, e tecnologias para explorar o potencial genético destas variedades, estão cada vez mais, se tornando imprescindíveis (IRRI, 2014).

As plantas tem desenvolvido mecanismos intrínsecos, em diferentes aspectos, como a nível estrutural, celular e molecular, para adaptação a condições adversas (CHEN et al., 2012). Os órgãos vegetais obtém oxigênio pela respiração, diretamente do ambiente, porém quando o solo se torna excessivamente úmido, a transferência de oxigênio do ar para o solo é bloqueado, sem o reabastecimento do oxigênio pelo ar, o oxigênio remanescente no solo é rapidamente consumido pelas plantas e microrganismos do solo.

Assim, o aerênquima, tecido que compreende uma elevada percentagem de espaços preenchidos com gás, se torna uma alternativa estratégica para a planta obter oxigênio (DREW et al., 2000).

No aspecto molecular, ocorre a indução gênica em nível transcricional (CHEN et al., 2012). Portanto, a regulação transcricional é essencial para a adaptação das plantas aos estresses abióticos. Diversos fatores de transcrição são requeridos para que ocorra a regulação gênica (GAO et al., 2007).

O genoma da *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e do arroz (*Oryza sativa* L.) codificam para mais de 2100 e 2300 fatores de transcrição, respectivamente (RIAÑO-PACHÓN et al., 2007). Entre eles, os WRKY, estes compreendem uma das maiores famílias de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica (CHEN et al., 2012).

Diversos estudos tem indicado o envolvimento dos WRKY na resposta imune da planta, frente a estresses bióticos. Porém, outros estudos também tem como foco, desvendar as redes de regulação gênica frente aos estresses abióticos (RUSHTON et al., 2010). A operação genética da transcrição é baseada no controle dos promotores dos genes por fatores de transcrição. Dessa forma, os fatores de transcrição controlam a quantidade de RNA produzido pelos genes os quais se ligam (ROSENFELD et al., 2005). Modificações na dinâmica de atividade dos fatores de transcrição alteram o transcriptoma, o qual implica em mudanças fenotípicas e metabólicas. Os fatores de transcrição que regulam a expressão gênica, reconhecem sequências específicas de DNA, estas sequências são conhecidas como elementos regulatórios de ação *cis* (MITSUDA; OHME-TAKAGI, 2009).

Com base na quantidade de elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs) com ocorrência significativa ( $P < 5\%$  pelo Teste Z) na região promotora (1000 pares de bases à montante da região) dos genes superexpressos, os genes foram classificados em: genes de regulação simples, que são os que possuem, em sua região promotora, de um a sete ERACs, e provavelmente respondem a um ou poucos estresses, e genes de regulação complexa, que apresentam de 24 a 35 ERACs na região promotora, e por apresentarem maior quantidade de responderiam a diversos estresses (FINATTO, 2012).

Considerando a importância de estudos visando o aumento da produtividade e a tolerância a estresses abióticos, torna-se necessário estudar as alterações morfológicas de cultivares de arroz expostas ao estresse por hipoxia e o perfil de expressão de genes pertencentes a família WRKY, nestas cultivares em diferentes tempos de exposição ao estresse, afim de que se tenha um melhor entendimento sobre os mecanismos de regulação do estresse.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo: 1) avaliar os efeitos morfológicos e anatômicos em cultivares de arroz submetidas a hipoxia, 2) verificar o perfil de expressão dos genes de regulação complexa e simples de fatores de transcrição WRKY envolvidos na resposta ao estresse por hipoxia.

## 1.2 – Referências bibliográficas

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.

DREW, M. C.; HE, C.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, v. 5, n.3, p: 123-127, 2000.

FINATTO, T.; **Transcriptomic analysis of genes and LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) in response to iron toxicity**. 2012. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GAO, J.; CHAO, D.; LIN, H. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.49, n.6, p: 742–750, 2007.

GRISP - Global Rice Science Partnership. Disponível em <http://www.grisp.net/> Acesso em 10 fevereiro 2014.

IRRI - International Rice Research Institute. Disponível em <http://irri.org/> Acesso em 10 fevereiro 2014.

MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, M. Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. **Plant Cell Physiology**, v.50, n.7, p:1232–1248, 2009.

RIAÑO-PACHÓN, D. M.; RUZICIC, S.; DREYER, I.; MUELLER-ROEBER, B. PInTFDB: an integrative plant transcription factor database. **BMC Bioinformatic**, v.8, n.42, 2007.

ROSENFELD, N.; YOUNG, J. W.; ALON, U.; SWAIN, S.; ELOWITZ, M. B. Gene Regulation at the Single-Cell Level. **Science**, v.307, p:1962-1965, 2005.

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E.; RINGLER, P.; SHEN, Q. J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, v.15, n.5, p: 247-258, 2010.

## 2 - Capítulo I

### Revisão bibliográfica

#### 2.1 - A cultura do arroz

O sistemas de cultivo de arroz irrigado são responsáveis por 75% da produção global de arroz, fornecendo o alimento básico para cerca de 2 bilhões de pessoas (IRRI, 2014). No Brasil, a produção oscila entre 11-13 milhões de toneladas, sendo o maior estado produtor o Rio Grande do Sul, respondendo por 67,0% da produção brasileira, com 1.066,6 mil hectares cultivados, representando 44,6% da área nacional. O fato de toda a área cultivada estar relacionada ao sistema irrigado, fez com que o estado obtivesse a maior produtividade nacional no ano de 2013 (CONAB, 2013).

O gênero *Oryza* é composto por 23 espécies (VAUGHAN e CHANG, 1995) destas, apenas duas são cultivadas, *Oryza sativa* L. (arroz cultivado asiático) e *Oryza glaberrima* Steud. (arroz cultivado africano). Ambas as espécies cultivadas são diplóides com número de cromossomos igual a 12 ( $2n=24$ ), porém existem espécies poliplóides com  $2n = 48$ . As duas espécies cultivadas e seus respectivos ancestrais possuem o mesmo genoma A, pois seus híbridos não apresentaram nenhum distúrbio cromossômico significativo (MORISHIMA et al., 1992). A porção de eucromatina do genoma do arroz é estimada por ter 430Mb de tamanho sendo assim o menor genoma dentre os cereais. O genoma do arroz é 3.7 vezes maior que o genoma de *Arabidopsis thaliana* e 6.7 vezes menor que o genoma humano (YU et al, 2002; IRGSP, 2005).

O crescimento populacional tem implicado em uma maior demanda de produção aliada a alta qualidade do arroz produzido. Contudo, diversos fatores restringem a produção do arroz, como estresses bióticos e abióticos. Afim de

superar estes fatores é necessário novas tecnologias que unam a biotecnologia e o melhoramento genético convencional (BRESOLIN, 2010).

## **2.2 - O solo do Sul do Brasil**

Os solos de várzea do sul do Brasil, apesar das grandes variações, apresentam uma característica comum, que é a sua formação sob condições hidromórficas (GOMES et al., 1992). Esses solos são encontrados nas planícies dos rios e lagos, onde se desenvolvem sobre sedimentos. Como estes sedimentos apresentam grande variabilidade na composição granulométrica e mineralógica, os solos desenvolvidos deles apresentam grande variação de características de um local para outro, que se refletem na aptidão de seu uso (KLAMT et al., 1985).

No Rio Grande do Sul, estes solos abrangem cerca de sete milhões de hectares, correspondendo a 25% da área total do Estado, com relevo plano a suavemente ondulado (GOMES et al., 1992). Estes solos de relevo plano e que apresentam camadas impermeáveis no subsolo são destinados, quase que exclusivamente para o cultivo do arroz (PINTO et al., 1999).

Ao longo do processo de formação dos solos, os minerais mais solúveis são lixiviados, enquanto o menos solúveis vão sendo acumulados. Óxidos de ferro e alumínio são minerais de difícil solubilidade e que, portanto, acabam se acumulando nos solos (VIEIRA et al., 1999). O material de origem dos solos tem grande importância na determinação da ocorrência de toxidez causada em função do acúmulo de um ou mais minerais presentes em excesso no solo, como o ferro e o alumínio, por exemplo, que são fatores limitantes para a produção de arroz.

## **2.3 - Estresses abióticos**

As plantas crescem em um ambiente dinâmico que frequentemente impõe restrições sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (TRAN, 2004). O crescimento das plantas é muito afetado por estresses causados por variações do ambiente (ICHIMURA et al., 2000). O termo “estresse abiótico” inclui diversos estresses causados por complexas condições ambientais como a alta

luminosidade, altas e baixas temperaturas, seca, salinidade, calor, toxidez por metais e hipoxia (HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2010).

Os estresses abióticos podem ser divididos em estresses nutricionais e estresses por condições climáticas adversas. Incluem, no primeiro caso, escassez de nutrientes (i.e., nitrogênio e fósforo) ou toxidez por excesso de elementos no solo (i.e., alumínio e ferro). No segundo caso pode-se agrupar estresse por seca, altas ou baixas temperaturas, encharcamento do solo e salinidade, que são os maiores responsáveis por danos as culturas agrícolas (BOHNERT, 1995). Este último tipo de estresse, pode afetar a integridade fisiológica da planta, direta ou indiretamente, alterando o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento do vegetal (GARG, 2002). Para a sobrevivência, as plantas tem se adaptado para responder a estes estresses sob os aspectos moleculares, celulares, fisiológicos e bioquímicos (NAKASHIMA; SHINOZAKI, 2009).

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). Estresses causados por condições adversas de ambiente induzem a expressão de genes em diversas espécies de plantas (BARTELS; SUNKAR, 2005). Inúmeros genes induzidos por estresse abiótico têm sido identificados através experimentos envolvendo a técnica de microarranjo (NAKASHIMA; SHINOZAKI, 2009). Estes genes têm sido classificados em dois grupos maiores, um grupo que codifica produtos diretamente para a proteção das células estressadas, e o outro grupo que regula a expressão e a sinalização da transcrição em resposta a estresses abióticos (SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2003).

Sendo assim, o estudo das redes gênicas envolvidas na regulação a estresses abióticos é de grande importância para os programas de melhoramento de arroz irrigado. O conhecimento das bases moleculares envolvidas nestes estresses representa uma importante ferramenta para o avanço do entendimento do comportamento das plantas sob condições adversas (BRESOLIN, 2010).

## 2.4 - Estresse ocasionado por submergência

Nos últimos anos, o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas, tem informado que as mudanças climáticas mundiais induzidas pelo homem aumentarão a frequência das precipitações de alta magnitude bem como atividade de ciclones extratropicais, como resultado, a ocorrência de eventos de inundação em planícies e terras cultivadas são esperadas (IPCC, 2013).

O excesso de água do solo é determinante para taxa de difusão de oxigênio no solo por causa da pequena difusão de gases na água em relação ao ar. Logo após a inundação do solo a respiração das raízes e microrganismos esgota o oxigênio remanescente e o meio ambiente torna-se hipoxico, quando os níveis de oxigênio limita-se à respiração mitocondrial e, mais tarde anoxica quando a respiração é completamente inibida (PONNAMPERUMA, 1972). Assim, a primeira restrição para o crescimento das plantas sob alagamento é imediata, devido a falta de oxigênio necessária para sustentar a respiração aeróbia dos tecidos submersos (ARMSTRONG, 1979).

Ocorre então a formação de camadas distintas quanto a disponibilidade de oxigênio, uma camada superficial, de alguns milímetros e, logo abaixo desta, é formado um ambiente com pouco ou nenhum oxigênio disponível (PONNAMPERUMA, 1972). Frente a isso, para as plantas conseguirem manter o crescimento em ambientes como este, as plantas de arroz desenvolveram adaptações estruturais na parte aérea e no tecido radicular as quais lhes permite transportar o oxigênio necessário para manter a respiração celular nos locais de crescimento (JACKSON; ARMSTRONG, 1999).

Estas adaptações estruturais incluem formação dos espaços de ar dentro do tecido para melhorar as trocas gasosas além de induzir a formação de raízes adventícias mediadas pelo etileno (VRIEZEN et al., 2003). Uma série de processos bioquímicos desencadeados na planta podem estimular a formação de aerênquima devido à diminuição no oxigênio no solo sob alagamento (hipoxia). O aumento na formação de aerênquima é uma das respostas adaptativas mais importantes frente ao estresse por hipoxia e anoxia (COLMER, 2003).

O aerênquima pode ser classificado como esquizógeno ou lisígeno, de acordo com o processo de formação. O aerênquima esquizógeno ou constitutivo resulta da separação das células e dos espaços intracelulares, devido ao arranjo

diferencial das células que compõem os tecidos e pode ser encontrado em plantas bem supridas de oxigênio. O segundo tipo de aerênquima, lisígeno, é resultado da morte das células que compõem os tecidos da raiz e do colmo e é desencadeado por estímulos do ambiente do solo inundado, principalmente pela falta de oxigênio (EVANS, 2003).

O início da formação do aerênquima lisígeno ocorre poucas horas após ser percebida a redução nos níveis internos de oxigênio (EVANS, 2003). Esta redução inicia uma série de processos metabólicos que promovem a ativação de vias bioquímicas específicas de controle genético formando substâncias que atuam como sinalizadores bioquímicos, sendo a principal delas, o etileno, a partir das quais desencadeia a morte celular programada (DREW et al., 2000; COLMER et al., 2006).

Em raízes de arroz, genes específicos da família gênica da ACC sintase, são induzidos pela deficiência de oxigênio produzindo etileno, o qual está envolvido na formação do aerênquima (DREW et al., 2000). A evidência de que genes da ACC sintase são expressos em condições anaeróbicas, é que o etileno está envolvido no crescimento do arroz em condições de baixa tensão. Em contrapartida, estudos relatam ainda que o envolvimento do etileno na formação de aerênquima ainda não é conclusivo em arroz já em milho essa relação é melhor explicada (EVANS, 2003).

Trabalhos com arroz demonstraram que com a hipoxia há um aumento na concentração de etileno, o que promove o crescimento de vários órgãos incluindo coleóptilo, mesocótilo, raiz e caule (JACKSON, 1985) e aumenta a formação de aerênquima e raízes adventícias. O aerênquima lisígeno é o tipo de formação predominante nos tecidos do arroz (JUSTIN; ARMSTRONG, 1991) e pode variar de 5% na ponta até 45% em regiões maduras da raiz (ARMSTRONG, 1971).

Além disso, o arroz possui características adicionais que contribuem para a sua tolerância a situações de inundação e conseqüente hipoxia. A ativação de  $\alpha$ -amilases e da mobilização de amido para a produção de energia para a manutenção dos processos metabólicos básicos sob hipoxia ou anoxia, tem sido implicada como uma das principais adaptações metabólicas de plantas de arroz sob inundação (VRIEZEN et al., 2003). Respostas metabólicas a hipoxia tem geralmente sido descritas como ativas ou passivas em relação ao consumo de

carboidratos não estruturais. Esta resposta leva ao consumo de hidratos de carbono, solúveis, não estruturais para remobilizá-los a fim de produzir ATP através da glicólise e regenerar  $\text{NAD}^+$  por meio da fermentação alcoólica (COLMER, et al., 2006). Estudos tem demonstrado que plântulas tolerantes ao estresse por hipoxia apresentam de 30-50% mais carboidratos não estruturais comparado com cultivares suscetíveis (SARKAR et al., 2006).

Diversos genes que codificam para enzimas que controlam a quebra de sacarose e a fermentação anaeróbica, são regulados de maneira temporal em resposta a deficiência de oxigênio. Cultivares de arroz que variam de acordo com a tolerância a submersão, apresentaram cinéticas diferentes em relação a acumulação de transcritos, codificando para enzimas envolvidas na fermentação (fosfofrutoquinase, fosfoglicerato quinase, enolase, PDC e ADH) (COLMER et al., 2006).

## 2.5 - Regulação gênica

O controle da expressão gênica é crucial para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos em geral (CASTRILLO et al., 2011). A regulação da transcrição é um mecanismo importante na expressão gênica, e tem um papel de dinamização na evolução funcional e morfológica, com potencial de manipulação biotecnológica para características agronômicas (ZHANG et al., 2005; HAEUSSLER; JOLY, 2010).

Análises genômicas e moleculares tem demonstrado que, diversos sistemas de regulação da transcrição estão envolvidos na indução de genes que respondem a estresses (SHINOZAKI et al., 2003). Embora, a maior parte das sequências reguladoras de genes ocorrem *upstream* do sítio de iniciação da transcrição e tradução, muitas exceções são conhecidas. Por conseguinte, a determinação de sítios de ligação do fator de transcrição não deve ser restringida apenas a regiões situadas *upstream* (STEFFENS et al. 2004).

Em plantas, a regulação da transcrição é mediada por um grande número de fatores de transcrição, que controlam a expressão de diversos genes alvos e, muitas vezes estão envolvidos na sinalização da transcrição (WELLMER; RIECHMANN, 2005). Sítios de ligação dos fatores de transcrição são elementos funcionais que determinam o momento e local da atividade da transcrição (VANDEPOELE et al., 2009).

Fatores de transcrição são conhecidos por serem reguladores essenciais de respostas celulares e fisiológicas a estímulos ambientais (GUAN et al., 2010). Estes fatores de transcrição regulam a primeira etapa da expressão gênica, e são usualmente definidos como proteínas contendo domínio de ligação, que reconhecem sequências específicas de DNA, estas sequências são conhecidas como elementos regulatórios de ação *cis* e estão localizados na região promotora dos genes (MITSUDA e OHME-TAKAGI, 2009).

Informações sobre os sítios de ligação, dos fatores de transcrição em genomas inteiros é usual para identificar genes alvos de um fator de transcrição específico (BÜLOW et al., 2006). É de fundamental importância, ainda que difícil, identificar genes que respondem a certos estímulos endógenos e/ou estímulos ambientais (ZHANG et al., 2005). Tendo em vista que, o crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados pela expressão de genes específicos em ocasiões apropriadas e em órgãos particulares (YE et al., 2012).

Os produtos resultantes da ação destes genes não são apenas importantes para tolerância ao estresse, mas também na regulação da expressão gênica e na sinalização da transcrição em resposta ao estresse. Estes produtos são classificados em dois grupos, o primeiro grupo inclui proteínas, com provável função de tolerância a estresses, como as chaperonas e as prolinas. O segundo grupo contém proteínas envolvidas na expressão gênica, que provavelmente agem na resposta ao estresse, e incluem os fatores de transcrição (YAMAGUSHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006).

## **2.6 - Elementos regulatórios de ação *cis* e o controle da expressão gênica**

A rede de sinalização, de percepção e de resposta, a alguns estresses requerem a interação entre diversos sensores. Logo após do reconhecimento do estresse pelas células, ocorre uma cascata de sinais que ativam genes envolvidos na resposta ao estresse. Os fatores de transcrição regulam a transcrição do gene, assim, uma mudança em suas atividades resulta em mudanças metabólicas e fenotípicas em resposta ao estímulo. Os fatores de transcrição contêm o domínio de ligação de DNA que reconhece frações específicas na sequência de DNA, estas sequências específicas são conhecidas como elementos regulatórios de ação *cis*.

Estes elementos regulatórios de ação *cis* estão localizados na região promotora do gene e, juntamente com os fatores de transcrição, formam o complexo de iniciação da transcrição. Nestes complexos, diversos fatores de transcrição e elementos regulatórios de ação *cis* interagem como reguladores da transcrição gênica. Diversos sítios de fatores de ação *cis* são conhecidos por estarem envolvidos na transcrição em resposta a estresses (SHINOZAK et al., 2003).

A expressão gênica é controlada principalmente em nível de transcrição, onde ocorre a ligação entre fatores de transcrição e elementos regulatórios de ação *cis*, nas regiões *upstream* de genes, e desempenham importantes funções (ZHANG et al., 2005). Estes elementos regulatórios de ação *cis* funcionam como ativadores e/ou repressores na regulação da expressão gênica de folhas, caules, raízes e panículas (YE et al., 2012).

O conhecimento sobre elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora dos genes, e os fatores de transcrição, é importante para obtermos um melhor entendimento dos sistemas que regulam a expressão gênica (CASTRILLO et al., 2011). No geral, elementos regulatórios de ação *cis* representam uma grande lacuna em nossa compreensão de genomas, especialmente as grandes regiões não codificantes (HAEUSSLER; JOLY, 2010). Portanto, se alguns elementos regulatórios de ação *cis* são conhecidos por estarem diretamente envolvidos na regulação da transcrição gênica em resposta a um estímulo, estes poderiam ser utilizados para identificar genes de interesse (ZHANG et al., 2005).

Em uma análise de microarranjo utilizando a cultivar Nipponbare submetida à toxidez por ferro, Finatto (2012) identificou 1569 genes superexpressos sendo que na região promotora (1 kbp à montante ao sítio de início da transcrição) destes genes, foram identificados os elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs) com ocorrência significativa pelo teste Z ( $P < 0,05$ ). Foram encontrados 300 ERACs com ocorrência significativa nos 1569 promotores dos genes superexpressos. O número de ERACs por promotor variou de 1 a 35. Sendo que os genes com promotores apresentando a média de ocorrência de ERACs menos dois desvios padrões foram considerados genes de regulação simples (totalizando 99 genes), já os genes que possuem a média de ocorrência de ERACs mais dois desvios padrões foram considerados genes

de regulação complexa (totalizando 81 genes). Os demais genes foram classificados como de regulação intermediária. Com base nisto, estima-se que provavelmente os genes de regulação complexa por apresentarem maior número de ERACs em sua região promotora seriam responsivos a outros estresses além da toxidez por ferro.

## 2.7- Genes *WRKY*

Fatores de transcrição atuam em conjunto com outros componentes da maquinaria transcricional para modular a expressão de genes alvos, de forma espacial e temporal. Em geral, isso ocorre por ligação a uma pequena sequência de nucleotídeos (elementos regulatórios de ação *cis*) contidos em regiões regulatórias do gene que estão sobre seu controle. As diferentes classes de fatores de transcrição apresentam domínios específicos de ligação ao DNA, que discrimina entre os distintos elementos regulatórios de ação *cis* em sítios alvos dentro do genoma (CIOLKOWSKI et al., 2008).

Em plantas superiores, a família *WRKY* é a maior entre as famílias de fatores de transcrição e é encontrada em todos os vegetais (RUSHTON et al., 2010). Genes da família *WRKY* tem demonstrado um grande sucesso evolucionário no reino vegetal, onde sucessivos eventos de duplicação tem resultado em grandes famílias gênicas (BERRI et al., 2009) e incluem 74 membros em *Arabidopsis*, mais de 100 membros em arroz, 197 em soja, 66 em mamão, 68 em sorgo, 38 em *Physcomitrella patens*, 35 em *Selaginella moellendorffii*, 80 em pinus e mais de 45 em cevada (CHEN et al., 2012).

## 2.8 – Estrutura e classificação dos *WRKY*

Denominados dessa forma em decorrência do domínio *WRKY* de 60 aminoácidos invariantes ao longo da região peptídica, incluindo ainda a sequência altamente conservada *WRKYGQK* na extremidade livre N, seguido pelo motivo dedo de zinco  $Cx4-5Cx22-23HxH$  ou  $Cx7Cx23HxC$  (CHIA et al., 2013) na extremidade livre C (RUSHTON, et al., 2010), que fornece as propriedades ligantes ao DNA, principalmente ao sítio conservado W-box (C/T)TGAC(T/C) (BERRI et al., 2009). Esses dois motivos são vitais para a alta afinidade de ligação dos fatores de transcrição *WRKY*, a sequência consensus

e os W-box, sendo que ainda sítios alternativos de ligação tem sido identificados (CHEN et al., 2012). Em algumas proteínas WRKY, as sequências de aminoácidos WRKY tem sido reportadas como WRRY, WSKY, WRKY, WVKY ou WKKY (RUSHTON, et al., 2010). As proteínas WRKY contém as seguintes estruturas: putativos sinais básicos de localização nuclear, zíper de leucina, região rica em serinas-treoninas, região rica em glutaminas, região rica em prolinas e domínios quinase TIR-NBS-LRRs. Assim, devido a estas caracterizações em sua estrutura, as proteínas WRKY podem desempenhar sua função mais apropriada na regulação da expressão gênica (CHEN et al., 2012).

O domínio WRKY consiste de quatro cadeias de proteína folha-beta, com os resíduos de cistidina/histidina formando uma cavidade ligante ao zinco. Os resíduos de WRKYGQK correspondem a porção amino-terminal da folha-beta que a partir de uma superfície saliente da proteína promove o acesso ao sulco maior e o contato com o DNA. Isso foi proposto já que a folha-beta contendo o motivo WRKYGQK realiza o contato com uma região de aproximadamente 6-pb, o que é compatível com o comprimento do W-box. A conservação do domínio WRKY é observada por uma notável conservação de seu local de ligação cognato, a W-box (TTGACC / T). Alguns trabalhos em leveduras tem demonstrado que algumas proteínas WRKY tem apresentado que o W-box é o mínimo consenso requerido para uma especifica ligação ao DNA. Ferramentas de bioinformática e estudos funcionais de promotores de genes de plantas tem encontrado grupos de W-boxes em promotores induzidos por estresses. Existem poucos relatos onde proteínas WRKY se ligam a regiões não W-box, um exemplo é o *OsWRKY13* que pode se ligar ao elemento PRE4 (TGCGCTT) bem como ao W-box. Os sítios W-box geralmente são ocupados por fatores de transcrição WRKY (RUSHTON, et al., 2010).

Genes codificados por proteínas WRKY são encontrados em alguns organismos eucariotos não fotossintetizantes, indicando sua origem antes do surgimento em eucariotos fotossintetizantes (CHIA et al., 2013). Em eucariotos superiores, incluindo as plantas, de 8 a 10% das proteínas são fatores de transcrição, que desempenham um importante papel no estabelecimento de redes transcricionais regulatórias, governando assim diversos perfis de expressão celular (CIOLKOWSKI et al., 2008).

Avanços significativos, a respeito da nossa compreensão de proteínas WRKY tem ocorrido nos últimos anos. A pesquisa tem focado em papéis adicionais de fatores de transcrição WRKY em processos como germinação, senescência e respostas a estresses bióticos e abióticos (RUSHTON, et al., 2010).

Inicialmente, pela ausência da completa família gênica em algumas espécies de plantas, os WRKY foram divididos em três grupos baseados no número de domínios WRKY (dois domínios classifica no grupo I de proteínas e um domínio classifica em outros grupos) e a estrutura dos dedos de zinco (C<sub>2</sub>HC classifica o grupo III de proteínas). O grupo gênico II foi dividido em IIa, IIb, IIc, IId e IIe baseado na sequência do primeiro aminoácido. Análises posteriores, com base em dados filogenéticos, apresentaram que a família WRKY em plantas superiores é mais acuradamente dividida em Grupo I, IIa, IIb, IIc, IId + IIe, e Grupo III. Genes do Grupo III não são monofiléticos (RUSHTON, et al., 2010).

Alguns genes WRKY em *Arabidopsis* foram descritos e classificados com base no número de domínios WRKY e nas características dos motivos dedo de zinco (EULGEM et al., 2000). Proteínas WRKY com dois domínios foram classificadas no grupo I e as demais proteínas com um domínio WRKY foram classificadas no grupo II. Em geral, os domínios WRKY dos membros do grupo I e do grupo II tem o mesmo tipo de motivo dedo de zinco cujo padrão de ligantes potenciais de zinco CX<sub>4</sub>-5-CX<sub>22</sub>-23 -HXH é o único motivo dedo de zinco conhecido. O único motivo dedo de zinco de proteínas WRKY é distinto nos membros do grupo 1 e 2. Ao invés de um padrão C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, seus domínios WRKY contém o motivo C<sub>2</sub>HC. Como resultado desta distinção este foi classificado no grupo III (BERRI et al., 2009).

Para reconstruir as relações evolutivas dos genes WRKY em arroz e *Arabidopsis*, uma árvore filogenética foi construída com todas as sequências de domínio WRKY das duas espécies. A árvore filogenética obtida sugere uma futura divisão do grupo III em três grupos distintos: 3A, 3B e 3C. Mais especificamente, a presença de um sub-grupo que apresenta apenas genes WRKY de *Arabidopsis* (3A), um Segundo apenas contendo genes *OsWRKY* (3B) e um terceiro grupo (3B) contendo os genes remanescentes. Essa divisão ocorre por consequência de eventos específicos de duplicação no grupo *OsWRKY*, o

qual ocorreu depois da separação de monocotiledôneas e dicotiledôneas e que são bem documentadas em arroz. Estes eventos levaram a grande expansão do grupo 3 de WRKY de arroz para um total de 36 genes o qual representa 35% da família gênica OsWRKY (BERRI et al., 2009).

## 2.9 - Função dos WRKY

Desde o começo das pesquisas com fatores de transcrição WRKY, fica evidente que eles regulam diversos processos na planta. O progresso recente demonstra que diversos genes WRKY atuam em vias de sinalização induzidas por estresse. 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 focado na análise funcional de genes que codificam para fatores de transcrição WRKY em resposta a estresses abióticos (CHEN et al., 2012).

Afim de evidenciar o envolvimento dos fatores de transcrição WRKY em resposta a estresses abióticos, vários estudos estão sendo conduzidos. Estes estresses abióticos incluem seca em cultivares de arroz (RICACHENEVSKY et al. 2010), em linhas transgênicas de *Arabidopsis* (SONG et al., 2009) e em linhas transgênicas de *Paspalum notatum* Flugge (XIONG et al., 2010), estresse por frio e seca em cevada (MARÉ et. al., 2004), estresse por calor e seca em tabaco (RIZHISKY et. al., 2002), toxidez por ferro em arroz (RICACHENEVSKY, 2007; RICACHENEVSKY et al. 2010) e senescência em arroz (RICACHENEVSKY et al. 2010).

Além disso estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo embriogênese, regulação de vias biossintéticas, sinalização hormonal, dormência e germinação de sementes. O gene *Transparent Testa Glabra 2 (TTG2)* em *Arabidopsis* é um exemplo, e codifica para o fator de transcrição *AtWRKY44* que atua no desenvolvimento de tricomas e coloração do tegumento (JOHNSON et al., 2002).

Desde o momento em que os genes WRKY tem sido reportados pelo envolvimento em resposta a diversos estresses, análises de expressão gênica

estão sendo realizadas por técnicas de qRT-PCR e microarranjo a nível de genoma e sob diversas condições (RAMAMOORTHY et al., 2008).

Tendo em vista a dinâmica ambiental as quais as culturas estão relacionadas, o entendimento das redes de regulação gênica as quais envolvem os fatores de transcrição, incluindo os WRKY, é de suma importância já que estes são reguladores de respostas celulares e fisiológicas aos estímulos do ambiente. Ainda, a obtenção do panorama como um todo, interação planta/ambiente, permite aliar os conhecimentos moleculares e ferramentas biotecnológicas ao melhoramento convencional, na busca por genótipos tolerantes a estresses abióticos limitantes ao crescimento e desenvolvimento vegetal acometendo assim a produtividade.

### **Referências Bibliográficas**

AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

ARMSTRONG, W. Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration, and waterlogging. **Physiologia Plantarum**, v.25, p.192–197, 1971.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances in Botanical Research**, v.7,p:225–332, 1979.

BARBERON M.; ZELAZNYA E.; ROBERT S.; CONÉJÉROA G.; CURIEA C, FRIML J.; VERTA G.; Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n.32, p.450–458, 2011.

BARTELS D.; SUNKAR R.; Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 24:23–58, 2005.

BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I.; Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v.201, p.137-147, 1998.

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.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, v. 7, p.1099–1111, 1995.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**, Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. p. 365, 1992.

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.

BÜLOW L.; STEFFENS N.O.; GALUSCHKA C.; SCHINDLER M.; HEHL H.; AthaMap: From in silico Data to Real Transcription Factor Binding Sites. **In Silico Biology**, v.6, p. 243–252, 2006.

CABELLO J. V.; CHAN R. L.; The homologous homeodomain-leucine zipper transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer tolerance to drought and salinity stresses via the induction of proteins that stabilize membranes. **Plant Biotechnology Journal**, v.10, p.815–825, 2012.

CAMARGO F.A.O.; TEDESCO M.J.; **Solos alagados**. In Bissani CA, Gianello C, Tedesco MJ and Camargo FAO (ed) Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas. Editora Gênese, Porto Alegre, p.187-193, 2004.

CASTRILLO G.; TURCK F.; LEVEUGLE M.; LECHARNY A.; CARBONERO P.; COUPLAND G.; PAZ-ARES J.; OÑATE-SÁNCHEZ L.; Speeding *Cis-Trans*

Regulation Discovery by Phylogenomic Analyses Coupled with Screenings of an Arrayed Library of Arabidopsis Transcription Factors. **Plos one**, v.6, n.6, 2011.

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.

CHEN, H.; LAI, Z.; SHI, J.; XIAO, Y.; CHEN, Z.; XU, X. Roles of *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. **BMC Plant Biology**, v.10, n.281, 2010.

CHIA, Y.; YANGA, Y.; ZHOU, Y.; ZHOU, J.; FANB, B.; YUA, J.; CHEN, Z. Protein–Protein Interactions in the Regulation of WRKY Transcription Factors. **Molecular Plant Advance Access**, 2013.

CHRISTOU, P. **Rice Biotechnology and Genetic Engineering**. Technomic Publication: Basel, Switzerland. 1994.

CIOLKOWSKI, I.; WANKE, D.; BIRKENBIHL, R. P.; SOMSSICH, I. E. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. **Plant Molecular Biology**, v.68, p: 81-92, 2008.

CLARKSON D. T.; HANSON J. B.; The mineral nutrition of higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.31, p. 239-298, 1980.

COLMER, T.D. Long-distance transport of gases in plants: A perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell Environmental**, v.26, p:17-36, 2003.

COLMER, T. D.; COX, M. C. H.; VOESENEK, A. C. J. Root aeration in rice (*Oryza sativa*): evaluation of oxygen, carbon dioxide, and ethylene as possible regulators of root acclimatizations. **New Phytologist**, v.170, p: 767 – 778, 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br/> . Acesso em 21 janeiro 2014.

CONNOLLY E. L.; GUERINOT M. L.; Iron stress in plants. **Genome Biology**, v.3, n.8, review 1024, p.1-4, 2002.

CRESTANI M.; DA SILVA J. A. G.; DE SOUZA V. G.; HARTWIG I.; LUCHE H. S.; DE SOUSA R. O.; DE CARVALHO F. I. F.; DE OLIVEIRA A. C.; Irrigated rice genotype performance under excess iron stress on hydroponic culture. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.87-95, 2009.

CURIE, C.; BRIAT, J.F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review in Plant Biology**, v.54, p.183–206. 2003.

D'ABUNDO D. M.; **Effects of submergence and hypoxia on the growth and anatomy of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings**. 2003. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

DREW, M. C.; HE, C.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, v. 5, n.3, p. 123-127, 2000.

DOLFERUS R.; ELLIS M.; BRUXELLES G.; TREVASKIS B.; HOEREN F.; DENNIS E.S.; PEACOCK W.J.; Strategies of Gene Action in Arabidopsis during Hypoxia. **Annals of Botany**, v.79, p.21-31, 1997.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. The WRKY super-family of plant transcription factors. **Trends Plant Science**, v.5, n.5, p:199-206, 2000.

EVANS, D.E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, v.161, p:35- 49, 2003.

FAGERIA N.K.; SLATON N.A.; BALIGAR V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**. v.80, p.63–152. 2003.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. **BioTechniques**. v. 26, n.1, p.112-125. 1999.

FINATTO, T.; **Transcriptomic analysis of genes and LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) in response to iron toxicity**. 2012. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FUKAO T.; BAILEY-SERRES J.; Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, p 449-456, 2004.

GARG A. K.; KIM J.; OWENS T.; RANWALAS A. P.; CHOI Y. D.; KOCHIAN L. V.; WU R. J.; Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 99, no. 25, p.15898–15903, 2002.

GOMES, A. S.; CUNHA, N. G.; PAULETTO, E. A.; SILVEIRA, R. J. C.; TURATTI, A. L. **Solos de várzea: uso e manejo**. In.: MARCÂNTONIO, G. (Coord.). Solos e irrigação. Porto Alegre : Ed. da UFRGS/FEDERACITE, 1992. p. 64-79.

GOFF S. A. et al; A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, n.92, p.92-100, 2002.

GUAN J.; YEH C.; LIN Y.; KE Y.; CHEN M.; YOU J.; LIU Y.; LU C.; WU S.; LIN C.; A 9 bp *cis*-element in the promoters of class I small heat shock protein genes on chromosome 3 in rice mediates L-azetidine-2-carboxylic acid and heat shock responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p.4249–4261, 2010.

HAEUSSLER M.; JOLY J. L.; When needles look like hay: How to find tissue-specific enhancers in model organism genomes. **Developmental Biology**, v.350, p.239-254 2010.

HIRAYAMA T.; SHINOZAKI K.; Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. **The Plant Journal**, v. 61, p.1041–1052, 2010.

HELL, R. e STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Plants**, v. 216, p. 541-551. 2003.

ICHIMURA K.; MIZOGUCHI T.; YOSHIDA R.; YUASA T.; SHINOZAKI K.; Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. **The Plant Journal**, v.24, n.5, p.655-665, 2000.

IPCC, 2013: **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp

IRGSP, International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p. 793-800, 2005.

IRRI – **International Rice Research Institute**. Disponível em <http://irri.org/>. Acesso em 22 janeiro 2014.

JACKSON M.B.; ARMSTRONG W.; Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant biology**. v.1, p. 274-287, 1999.

JACKSON, M.B. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p:145-174, 1985.

JOHNSON, C.; KOLEVSKI, B.; SMYTH, D. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. **Plant Cell**, v.14, n.6, p.1359-1375, 2002.

JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, v.118, p:49-62,1991

KLAMT, E.; KAMPF, N.; SCHENEIDER, P. **Solos de várzea no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre : UFRGS, 1985. (Boletim Técnico de Solos, 4).

LABATE, C. A.; CALDAS, D. G. G.; MOON, D. H.; DE CARVALHO, M. C. C. G. **Genômica Funcional** – Apostila. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP. 2007.

LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T-Y.; SCHAALL, B, A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.103, n. 25, p. 9578-9583, 2006.

MARSCHNER, H.; RÖHMELD, V. Strategies of plants for acquisition of iron. **Plant Soil**, v. 165, p.375–88. 1994.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, San Diego, USA. 1995.

MIGEON A.; BLAUDEZ D.; WILKINS O.; MONTANINI B.; CAMPBELL M. M.; RICHAUD P.; THOMINE S.; CHALOT M.; Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. **Cellular and Molecular Life Science**, v.67, p.3763–3784, 2010.

MITSUDA N.; OHME-TAKAGI M.; Functional Analysis of Transcription Factors in *Arabidopsis*. **Plant e Cell Physiology**, v.50, n.7, p. 1232–1248, 2009.

MORI, S. Iron acquisition by plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.250–530 ,1999.

MORISHIMA. H; SANO. Y; OKA. H.I. Evolutionary studies in cultivated rice and its wild relatives. **Evolutionary Biology**, v.8, p.135-184. 1992.

NAKASHIMA K.; ITO Y.; SHINOZAKI K. Y. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, v. 149, p.88–95, 2009.

NEGISHI, T.; NAKANISHI, H.; YAZAKI, J.; KISHIMOTO, N.; FUJII, F. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fedeficient barley roots. **The Plant Journal**, v.30, p.83–94, 2002.

NOZOYE T.; NAGASAKA S.; KOBAYASHI T.; TAKAHASHI M.; SATO Y.; SATO Y.; UOZUMI N.; NAKANISHI H.; NISHIZAWA N. K. Phytosiderophore Efflux Transporters Are Crucial for Iron Acquisition in Gramineous Plants. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.7, 2011.

PERATA, P.; ALPI, A. Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, v. 93, p. 1–17, 1993.

PINTO, L. F. S.; PAULETO, E. A.; GOMES, A. da S.; SOUZA, R. O. **Caracterização de solos de várzea**. In: Gomes, A.S.; Pauletto, E.A. (Eds). Manejo do solo e da água em áreas de várzea. Pelotas: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 1999. Cap.1, p.11-36.

PONNAMPERUMA, F.N.; The chemistry of submerged soils. **Advanced Agronomy**. v.24, p.29-96, 1972.

RAHMAN A. M.; RAHMAN M. M.; KADOHASHI K.; MAKI T.; HASEGAWA H.; Effect of external iron and arsenic species on chelant-enhanced iron bioavailability and arsenic uptake in rice (*Oryza sativa* L.). **Chemosphere**, v.84, p.439–445, 2011.

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.

RICACHENEVSKY, F. K.; SPEROTTO, R. A.; MENGUER, P. K.; FETT, J. P. Identification of Fe-excess-induced genes in rice shoots reveals a WRKY transcription factor responsive to Fe, drought and senescence. **Molecular Biology Reports**, v.37, p:3735–3745, 2010.

RICACHENEVSKY, Felipe Klein. **Análise da expressão gênica diferencial em arroz (*Oryza sativa* L. ssp. Indica) em resposta ao excesso de ferro**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v.130, n.3, p:1143-1151, 2002.

ROBERTS, L.A.; PIERSON, A.J.; PANAVIENE, Z.; WALKER, E.L. Yellow stripe1: expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. **Plant Physiology**, v.135, p.112–120. 2004.

RÖMHMELD, V.; MARSCHNER, H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. **Advanced Plant Nutrition**, v.2, p.155-204, 1986.

ROMHELD V.; Different strategies for iron acquisition in higher plants. **Physiology Plantarum**, v.70, p. 231-234, 1987.

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E.; RINGLER, P.; SHEN, Q. J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, v.15, n.5, p. 247-258, 2010

SAHRAWAT, K. L.; Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**, v.27, p.1471-1504, 2004.

SARKAR, R. K.; REDDY, N. J.; SHARMA, S. G.; ISMAIL, A. M. Physiological basis of submergence tolerance in rice and implications for crop improvement. **Current Science**, v. 91, n. 7, p: 899 -906, 2006.

SASAKI T.; BURR B.; International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3 p.138–141, 2000.

SHINOZAKI K.; SHINOZAKIY K. Y.; SEKI M.; Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.410–417, 2003.

SONG, Y.; JING, S.; YU, D.; Overexpression of the stress-induced OsWRKY08 improves osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, p.4671–4678, 2009.

STEIN R.J.; RICACHENEVSKY F.K.; FETT J.P.; Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). **Plant Science**, v.177, p.563–569, 2009.

STEFFENS N. O.; GALUSCHKA C.; SCHINDLER M.; BUÈLOW L.; HEHL R.; AthaMap: an online resource for in silico transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.368-372, 2004.

TAKAGI, S.; NOMOTO, K.; TAKEMOTO, T., Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plant. **Journal of Plant Nutrition**. v.7, p.469-477. 1984.

TODAKA D.; NAKASHIMA K.; SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K. Y.; Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in Rice. **The rice journal**, v.5, n.6, 2012.

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.

USHIMARUA T.; KANEMATSUB S.; SHIBASAKAC M.; TSUJID H. Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia plantarum**, v.107, p.181–187, 1999.

VANDEPOELE K.; QUIMBAYA M.; CASNEUF T.; VEYLDER L.; VAN DE PEER Y. Unraveling Transcriptional Control in Arabidopsis Using *cis*-Regulatory Elements and Coexpression Networks. **Plant Physiology**, v.150, p. 535–546, 2009.

VAUGHAN, D. A.; CHANG, T.T. **Collecting the rice gene pool**. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; REID, R. Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. Wallingford: CAB International, p.659-675, 1995.

VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 633p. 1999.

VOESENEK, L.A.C.J, COLMER, T.D., PIERIK, R., MILLENAAR, F.F., PEETERS, A.J.M. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**, v. 170, p. 213–226, 2006.

VRIEZEN, W. H.; ZHOU, Z.; STRAETEN, D. V. D. Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. **Botany**, v. 91, p.263-270, 2003.

XIONG, X.; JAMES, V. A.; ZHANG, H.; ALTPETE, F. Constitutive expression of the barley HvWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). **Molecular Breeding**, v.25, p.419–432, 2010.

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.

WARDA. **Annual Report 2000**. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WELLMER F.; RIECHMANN J.L. Gene network analysis in plant development by genomic technologies. **International Journal of Developmental Biology**, v.49, p.745–759, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K.; Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. **The Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.781–803, 2006.

YE R.; ZHOU F.; LIN Y.; Two novel positive *cis*-regulatory elements involved in green tissue-specific promoter activity in rice (*Oryza sativa* L ssp.). **Plant Cell Reports**, 2012.

YU J.; HU S.; WANG J.; WONG G. K.; LI S.; LIU B.; DENG Y.; DAI L.; ZHOU Y.; ZHANG X.; CAO M.; LIU J.; SUN J.; TANG J.; CHEN Y.; HUANG X.; LIN W.; YE C.; TONG W.; CONG L.; GENG J.; HAN J.; LI L.; LI W.; HU G.; HUANG X.; LI W.; LI J.; LIU Z.; LI L.; LIU J.; QI Q.; LIU J.; LI L.; LI T.; WANG X.; LU H.; WU T.; ZHU M.; NI P.; HAN H.; DONG W.; REN X.; FENG X.; CUI P.; LI X.; WANG H.; XU X.; ZHAI W.; XU Z.; ZHANG J.; HE S.; ZHANG J.; XU J.; ZHANG K.; ZHENG X.; DONG J.; ZENG W.; TAO L.; YE J.; TAN J.; REN X.; CHEN X.; HE J.; LIU D.; TIAN W.; TIAN C.; XIA H.; BAO Q.; LI G.; GAO H.; CAO T.; WANG J.; ZHAO W.; LI P.; CHEN W.; WANG X.; ZHANG Y.; HU J.; WANG J.; LIU S.; YANG J.; ZHANG G.; XIONG Y.; LI Z.; MAO L.; ZHOU G.; ZHU Z.; CHEN R.; HAO B.; ZHENG W.; CHEN S.; GUO W.; LI G.; LIU S.; TAO M.; WANG J.; ZHU L.; YUAN L.; YANG H.; A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, v. 296, p.79-92, 2002.

ZHANG W.; RUAN J.; HO T.D.; YOU Y.; YU T.; QUATRANO R.S.; *Cis*-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v.21 n.14, p.3074–3081, 2005.

ZHENG S. J. Iron homeostasis and iron acquisition in plants: maintenance, functions and consequences. **Annals of Botany**, v.105, p.799–800, 2010.

## **3- Capítulo II**

### **Análise morfológica e histológica de cultivares de arroz sob estresse por submersão**

#### **3.1- Introdução**

A submersão nas plantas, provoca a falta de oxigênio, a aeração deficiente costuma reduzir a produtividade das culturas, tornando este um dos maiores estresses abióticos em plantas. Ainda, a redução no rendimento, pode ser parcialmente atribuída à ocorrência de alternância de seca progressiva e alagamento repentino, afetando as funções de desenvolvimento e o crescimento das raízes. Entretanto, as plantas de arroz possuem mecanismos de adaptação a estes ambientes, e conseguem resistir a tais variações temporais de umidade no solo (ZEIGLE; PUCKRIDGE, 1995).

O arroz é uma das poucas espécies que pode germinar e crescer em solos permanentemente encharcados (PERATA; ALPI, 1993). Porém, quando completamente submersas, a maioria das cultivares de arroz morrem dentro de uma semana. Neste caso, a respiração aeróbica e a fotossíntese são inibidas, ocorrendo a estimulação de diversas respostas frente ao estresse, como a mudança da respiração aeróbica para respiração anaeróbica. Algumas cultivares de arroz podem sobreviver de 10 a 14 dias sob completa submersão (XU et al., 2006). Uma estratégia que as plantas desenvolvem frente a este estresse é

a utilização de carboidratos não estruturais, afim de suprir a energia requerida para o crescimento e manutenção do metabolismo vegetal. Cultivares de arroz tolerantes a este estresse, apresentam de 30 a 50% mais carboidratos não estruturais quando comparadas com cultivares suscetíveis ao estresse por hipoxia (SARKAR, 2006).

Além disso, estas condições de pouco oxigênio afetam diretamente o metabolismo básico das plantas, pois, desestabilizam a via da fosforilação oxidativa. Esta rota, está localizada na membrana mitocondrial e, é normalmente responsável pela regeneração do NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e do poder redutor NADP<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada), necessário para a glicólise, e com a produção concomitante de ATP (adenosina trifosfato). A ausência, ou a limitada disponibilidade de oxigênio no acceptor final de elétrons, bloqueia a via de produção de ATP (DOLFERUS et al., 1997). Sendo que, a produção de ATP é necessária para o metabolismo celular e processos de desenvolvimento das plantas pois, é requerido por diversas enzimas, incluindo as enzimas que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004).

Para suportar este estresse, as plantas expostas a baixas taxas de oxigênio empregam várias adaptações morfológicas e metabólicas (SANTOS, 2012). Em algumas variedades de arroz, a submergência estimula o rápido alongamento das raízes (VOESENEK et al. 2006). Acredita-se que o alongamento das raízes, através do solo com déficit de oxigênio, facilita a aquisição de oxigênio e o estabelecimento de uma resposta frente a mudança do ambiente (D'ABUNDO, 2003).

O aerênquima, tecido especializado que contem espaços preenchidos por gases, é o tecido mais importante na adaptação anatômica para o crescimento das plantas em ambientes inundados. O oxigênio da atmosfera ou gerado através da fotossíntese, é transportado, mais facilmente, por difusão e/ou fluxo de massa, pelo aerênquima até raízes, caules e folhas submersos, que estão deficientes de oxigênio (JACKSON; ARMSTRONG 1999; SURALTA; YAMAUCHI, 2008; ITO et al., 1999).

Tendo em vista estas adaptações morfológicas das plantas, quando submetidas ao estresse por hipoxia, o objetivo deste trabalho foi avaliar os

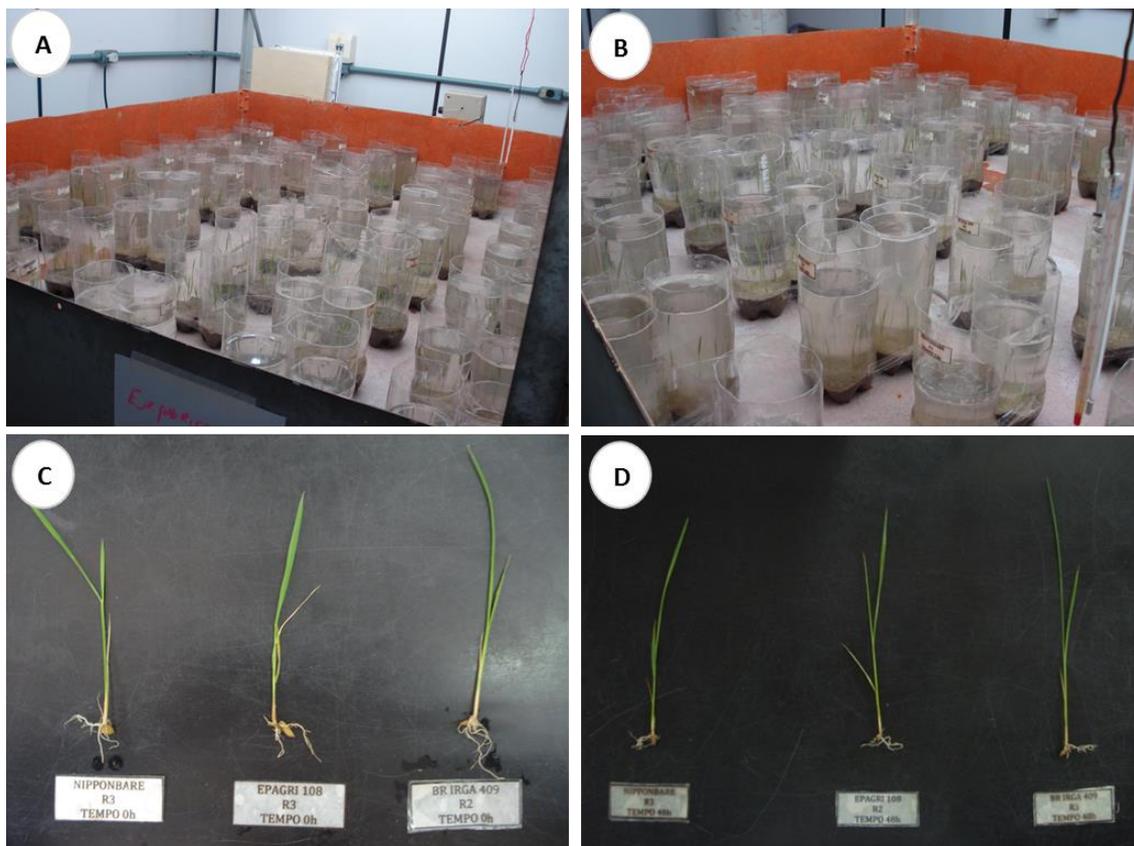
efeitos morfológicos e histológicos em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas a hipoxia.

### **3.2- Material e Métodos**

#### **3.2.1- Material Vegetal**

O experimento foi conduzido no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pertencente ao departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Foram utilizadas no estudo 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 os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Posteriormente as plântulas com 7 dias, foram transferidas para recipientes com capacidade para 2L (Figura 1A), acondicionados em ambiente com fotoperíodo de 16 horas/8horas (luz/escuro), estes recipientes continham areia e foram regados 2 vezes ao dia com água e solução nutritiva de YOSHIDA (1976) contendo: 91,4 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 40,3 g L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 71,4 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 88,6 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 324,0 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5 g L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,074 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,934 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,035 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,031 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 7,7 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e 11,9 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico monohidratado, em pH 5,0 ± 0,1. As plantas permaneceram nestas condições por 7 dias.



**Figura 1.** (A) Recipientes de 2L contendo areia com as plântulas de arroz sob irrigação com água e solução nutritiva, (B) Recipientes de 2L contendo as plântulas de arroz em submersão, (C) Plântulas de cultivares de arroz irrigado com 14 dias, sob tratamento controle, sem estresse por hipoxia, sendo o R: repetição, (D) Plântulas de cultivares de arroz irrigado com 16 dias, sob tratamento de 48h de estresse por hipoxia, sendo o R: repetição. CGF/FAEM/UFPel 2014.

Logo após, os 14 dias, foi realizada a primeira coleta das plântulas submetidas ao tratamento controle (0h- sem estresse por hipoxia) e estas foram avaliadas. O restante dos recipientes com as plântulas foram submetidas aos tratamentos de estresse (Figura 1B), ou seja, as plântulas permaneceram sob condição de submersão por 6, 12, 24 e 48 horas, até a coleta. O experimento foi composto por três repetições de cada tratamento para cada cultivar, sendo utilizado delineamento experimental completamente casualizado.

Foram coletadas 12 plantas de cada repetição de cada tratamento e avaliados os caracteres: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de

raiz (CR), número de raízes (NR), número de folhas (NF), comprimento de coleóptilo (CC), massa fresca da parte aérea e raiz (MFPA e MFR) e massa seca da parte aérea e raiz (MSPA e MSR). Os caracteres de MSPA e MSR foram determinados pelo peso dos tecidos depois de secos em estufa à 60°C, até atingirem massa constante (COLMER et al., 2006).

Para as análises estatísticas, os dados foram transformados para distribuição binomial segundo Steel e Torrie, 1980. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa SAS (SAS 9.3 Statistical Analysis System). Para os efeitos foram gerados gráficos de regressão.

### **3.2.2- Análises histológicas das raízes**

Amostras de raízes foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965, modificado com a utilização de tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica ascendente e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®) segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (ANCAP) com navalha descartável (Feather). As secções com 5 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05% (SAKAI, 1973) em tampão fosfato e citrato (MCILVAINE, 1921) pH 4,5 e montadas em resina sintética “Entellan” (Merck®).

A documentação dos resultados foi realizada através da captura de imagens a partir de lâminas usando câmera Leica® DC 300F acoplada ao microscópio Leica®DM LB.

## **3.3- Resultados e discussão**

### **3.3.1 – Avaliação da morfologia de plântulas de arroz irrigado**

Através dos resultados obtidos na análise de variância (Tabela 1) pode-se observar que houve interação entre os fatores de genótipo e tratamento para os caracteres de NR, MFR e MSR, indicando que estes se comportaram de maneira distinta quando submetidas aos tratamentos. Sendo assim, pode-se dizer que o efeito do tempo de exposição à hipoxia foi responsivo para estes caracteres, já que estes apresentaram diferenças significativas. Em estudos

utilizando cultivares de milho, arroz e trigo sob hipoxia, foi demonstrado que em ambas as espécies, as raízes foram mais afetadas, quando comparando com a parte aérea (DAS et al., 2009).

Para CPA, CC, MFPA e MSPA o efeito dos tratamentos de hipoxia foi significativo, diferentemente do observado em estudos anteriores, em arroz submetido a hipoxia por 4 semanas, onde o tempo de exposição ao estresse por hipoxia não alterou a parte aérea (SURALTA; YAMAUCHI, 2008). Ainda, para os caracteres de CR e NF não foram observados efeitos significativos entre as fontes de variação.

**Tabela 1.** Análise de variância conjunta para os caracteres de comprimento de parte aérea (CPA), em cm, comprimento de raiz (CR), em cm, número de raízes (NR), número de folhas (NF), comprimento de coleóptilo (CC), em cm, massa fresca da parte aérea e raiz (MFPA e MFR), em gramas, massa seca da parte aérea e raiz (MSPA e MSR) em gramas, de plântulas de cultivares arroz irrigado, submetidas ao estresse por hipoxia. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

FV	GL	Quadrado médio								
		CPA	CR	NR	NF	CC	MFPA	MSPA	MFR	MSR
<b>Genótipo</b>	2	0.0156	0.0047	0.0354*	0.0256	0.0443	0.0483*	0.0142	0.4278*	0.2687*
<b>Tratamento</b>	4	0.0301*	0.0068	0.0433*	0.0143	0.0502*	0.1604*	0.0367*	0.0565*	0.1268*
<b>Int GxT</b>	8	0.1511	0.0053	0.0167*	0.0188	0.0242	0.0207	0.0092	0.0426*	0.0462*
<b>Resíduo</b>	30	0.0089	0.0072	0.0072	0.0132	0.0168	0.0095	0.0125	0.0071	0.0176
<b>Média</b>		-0.0123	0.0054	-0.0617	-0.0431	-0.0556	0.0585	-0.0130	0.0398	0.1667

\* Significativamente diferente de um, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Na tabela da análise de comparação de médias (Tabela 2), para caractere de MFPA, foi possível observar diferença significativa entre os genótipos demonstrando que, a cultivar Nipponbare e a cultivar Epagri 108 diferiram quanto a este caractere.

**Tabela 2.** Teste de comparação de médias para o caractere de massa fresca da parte aérea (MFPA) nas cultivares de arroz irrigado quando submetidas ao estresse por hipoxia. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

Genótipo	Massa fresca parte aérea
Nipponbare	0.11867 A
BR IRGA 409	0.05113 AB
EPAGRI 108	0.0058 B

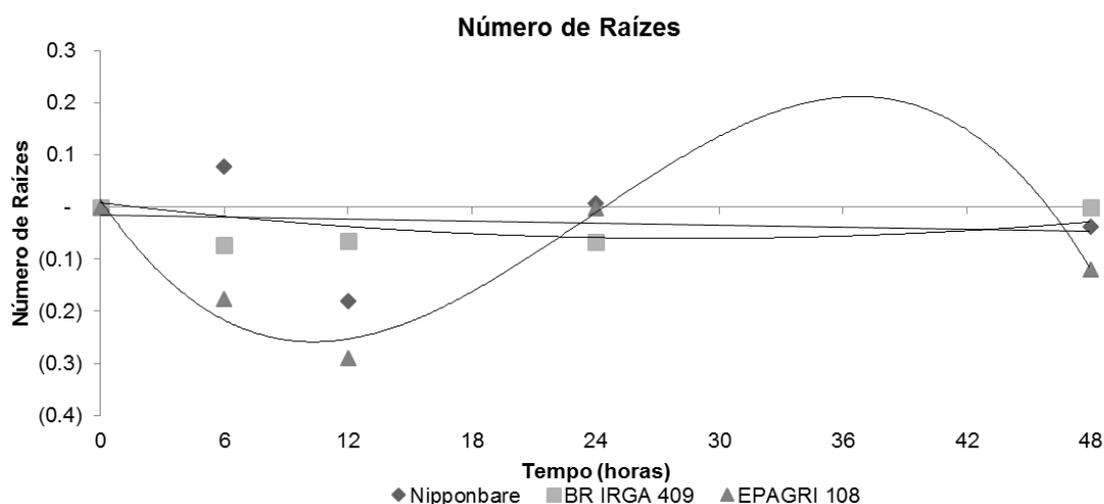
Para os caracteres que apresentaram significância para o fator tratamento, observa-se a tabela 3, onde notou-se que o caractere de CC apresentou diferença entre o tratamento controle e os demais tratamentos sob hipoxia. Para o caractere de MFPA foi possível observar que os tratamentos controle, 6 e 12h sob hipoxia diferiram dos demais tratamentos. Os caracteres de CPA e MSPA não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

**Tabela 3.** Teste de comparação de médias para os caracteres: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleóptilo (CC), massa fresca e massa seca de parte aérea (MFPA e MSPA), nas cultivares de arroz irrigado quando submetidas ao estresse por hipoxia. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

Trat	CPA	CC	MFPA	MSPA
0h	10.271A	0.673A	0.514B	0.086A
6h	9.211A	0.627AB	0.435B	0.073A
12h	8.956A	0.455B	0.515B	0.076A
24h	11.342A	0.688AB	0.729A	0.092A
48h	11.119A	0.625AB	0.757A	0.098A

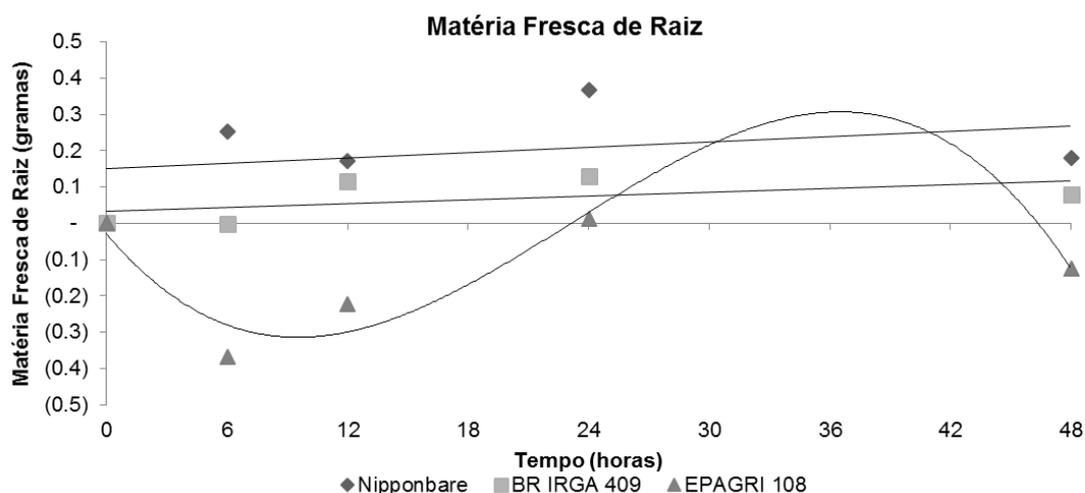
Afim de demonstrar as diferenças para os caracteres de NF, MFR e MSR, foram obtidos perfis de comportamento destes caracteres para os genótipos

estudados. Para o caractere de NR (Figura 2) na cultivar Nipponbare bem como para a cultivar BR IRGA 409 foi observado um discreto decréscimo. O NR na cultivar Epagri 108 foi mais afetado no tratamento de 12h sob hipoxia porém notou-se um aumento no NR no tratamento de 24h sob hipoxia e posterior decréscimo no tratamento de 48h. Este decréscimo, para este caractere, indica um forte efeito da submergência por mais de 24h.



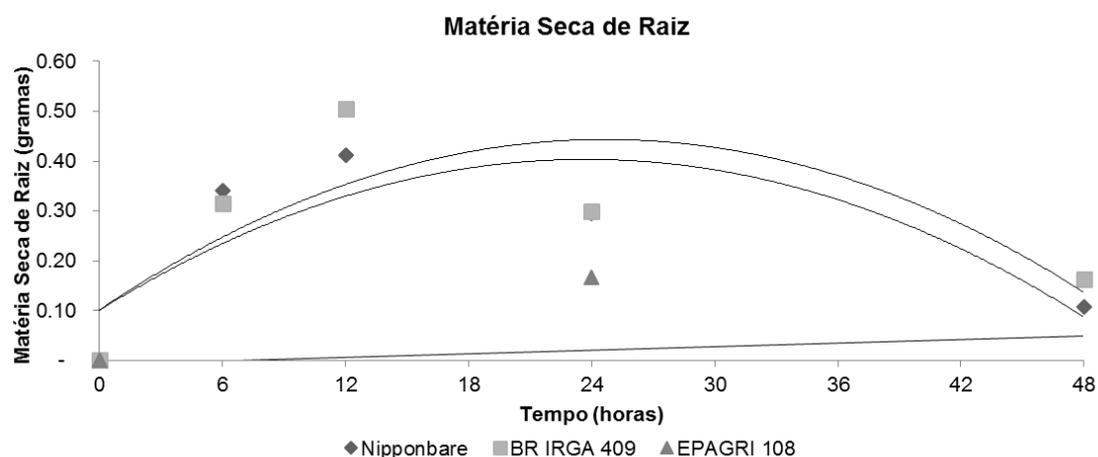
**Figura 2.** Gráfico de regressão para o caráter de número de raízes para as cultivares de arroz irrigado. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

Em relação a MFR (Figura 3) podemos verificar que para a cultivar Nipponbare houve um aumento progressivo na MFR, bem como para a cultivar BR IRGA 409. A cultivar Epagri 108 apresentou um forte decréscimo no teor de matéria fresca de raiz, principalmente sob o tratamento de 12h de submergência.



**Figura 3.** Gráfico de regressão para o caráter de matéria fresca de raiz (MFR), para as cultivares de arroz irrigado. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

Em relação à MSR (Figura 4), foi possível observar um forte efeito do tratamento sob este caractere nas cultivares Nipponbare e BR IRGA 409, já que foi observado um decréscimo no teor de matéria seca de raiz quando submersas por 48h. Para a cultivar Epagri 108, houve um aumento progressivo no teor de materia seca de raiz até 48h, o maior tempo de exposição a hipoxia



**Figura 4.** Gráfico de regressão para o caráter de matéria seca de raiz (MSR), para as cultivares de arroz irrigado. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

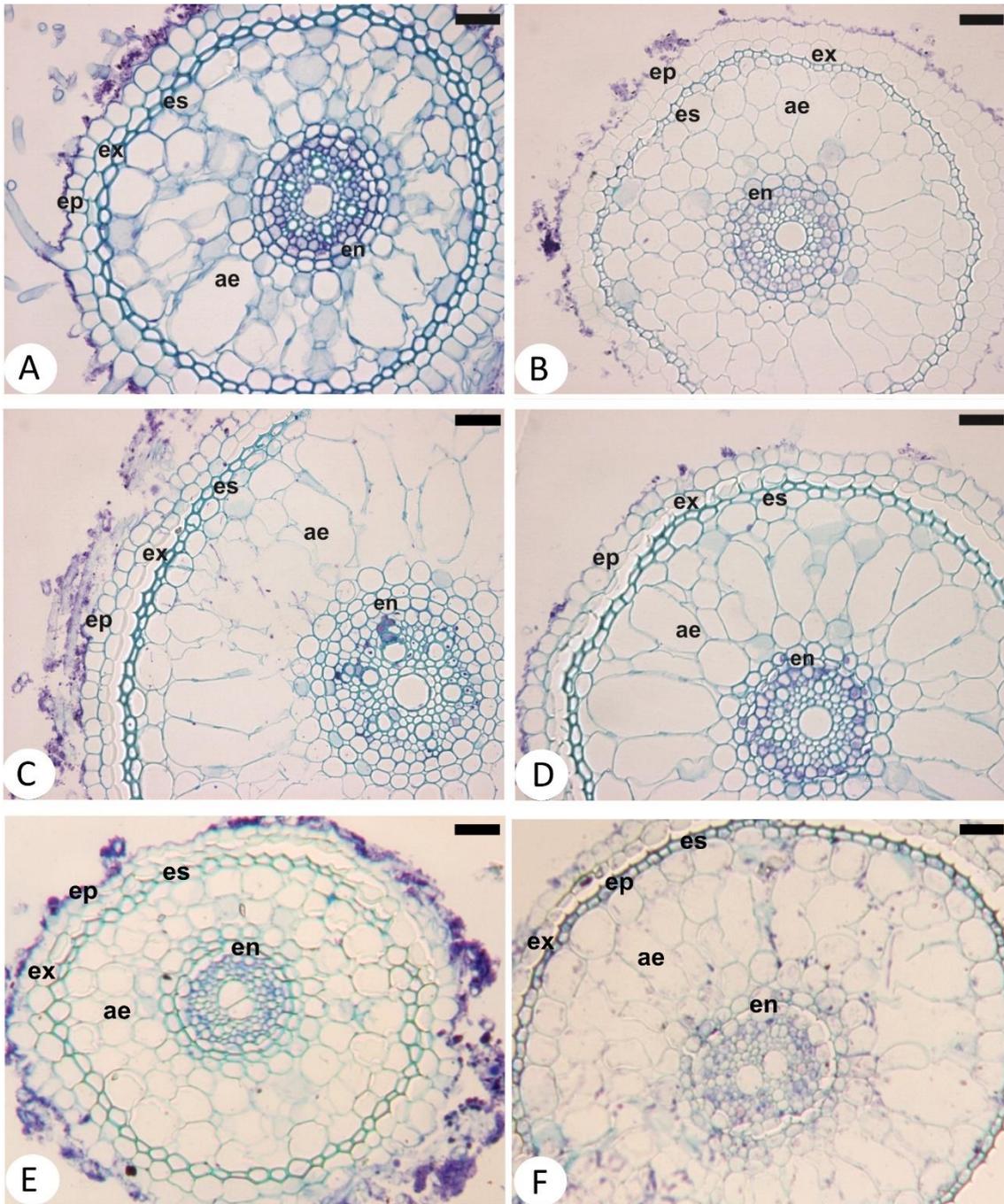
Os resultados para MSR, concordam com Alves (2002), onde em estudos relacionados à hipoxia em milho (*Zea mays* L.) na cultivar Saracura, foi verificado que houve um decréscimo no teor de MSR de acordo com o aumento do tempo de exposição ao estresse, afirmando ainda que este pequeno decréscimo no teor de MSR, possa ser um indicativo de tolerância ao déficit de oxigênio. Em contrapartida, estudos com arroz sob hipoxia demonstraram um aumento progressivo no teor de MSR em plântulas, submersas por 25 dias, quando comparadas as plântulas do tratamento drenado. Foi relatado ainda que este aumento no teor de MSR tem forte relação com o número de raízes adventícias formadas em resposta ao decréscimo de oxigênio (COLMER et al., 2006).

### **3.3.2 – Desenvolvimento de aerênquima em raízes de arroz irrigado sob estresse por submersão**

Através de cortes anatômicos das raízes das cultivares estudadas, foi possível analisar o desenvolvimento do aerênquima, nas plântulas no tratamento controle e quando submetidas a 48h de hipoxia (Figura 5).

As cultivares Epagri 108 (Figura 5A) e Nipponbare (Figura 5C), apresentaram no tratamento controle um aerênquima mais desenvolvido quando comparado a cultivar BR IRGA 409 (Figura 5E). Em relação as secções transversais nas raízes, no tratamento de 48h sob hipoxia, foi verificado que as cultivares Epagri 108 (Figura 4B) e Nipponbare (Figura 5D) apresentaram uma maior degradação das células do córtex, quando comparado aos cortes histológicos das raízes no tratamento controle, resultando assim na formação do aerênquima lisígeno. A cultivar BR IRGA 409 (Figura 5F), apresentou uma menor degradação das células do córtex, demonstrando assim uma discreta diferença no desenvolvimento do aerênquima quando comparado ao corte histológico da raiz no tratamento controle. Sendo assim, pode-se dizer que o estresse por hipoxia induziu a formação de aerênquima em raízes de arroz irrigado.

Estudos tem indicado que a hipoxia estimula a formação de aerênquima em raízes de arroz (JUSTIN; ARMSTRONG 1987; ITO, et al., 1999). Contudo, a formação de aerênquima é influenciada por fatores intrínsecos da planta, como constituição genética, o que sugere diferenças morfológicas e anatômicas entre espécies e até mesmo entre cultivares (AULAKH et al., 2000).



**Figura 5:** Desenvolvimento de aerênquima na região intermediária de raízes de plântulas de arroz submetidas a hipoxia. Secção transversal em raiz da cultivar Epagri 108 submetida ao tratamento controle (A), secção transversal em raiz da cultivar Epagri 108 submetida ao tratamento de hipoxia por 48h (B), secção transversal em raiz da cultivar Nipponbare submetida ao tratamento controle (C), secção transversal em raiz da cultivar Nipponbare submetida ao tratamento de hipoxia por 48h (D), secção transversal em raiz da cultivar BR IRGA 409 submetida ao tratamento controle (E) e secção transversal em raiz da cultivar BR IRGA 409 submetida ao tratamento de hipoxia por 48h (F). As barras nas fotomicrografias equivalem a 30  $\mu$ m. Sendo, ep: epiderme, ex: exoderme, es: esclerênquima, ae: aerênquima e em: endoderme. UFPel/FAEM/CGF, 2014.

O aumento na formação do aerênquima é uma das mais importantes respostas adaptativas das plantas frente a hipoxia e anoxia (JACKSON; ARMSTRONG, 1999). Plantas que apresentam maior capacidade em desenvolver aerênquima teoricamente transportam mais oxigênio para a extremidade das raízes, favorecendo o crescimento radicular e, assim, promover um maior aprofundamento do sistema radicular no solo, o que pode ser desejável, tendo em vista um aumento da área de absorção e o volume do solo a ser explorado na busca por nutrientes (HOLZSCHUH et al., 2010).

### 3.4- Conclusões

Ocorre alterações morfológicas de aumento no número de raízes e matéria fresca e seca de raízes, e alterações histológicas de desenvolvimento de aerênquima nas cultivares de arroz irrigado, quando submetidas ao estresse por hipoxia, principalmente no sistema radicular.

O aerênquima é mais desenvolvido nas cultivares Epagri 108 e Nipponbare, quando submetidas ao estresse por hipoxia, no estágio de desenvolvimento V3.

### Referências bibliográficas

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “saracura” (BRS 4154) ao alagamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p.41-52, 2002.

AULAKH, M.S.; WASSMANN, R.; RENNENBERG, H.; FINK, S. Pattern and amount of aerenchyma relate to variable methane transport capacity of different rice cultivars. **Plant Biology**, v. 2, p. 182-194, 2000.

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.

CALHEIROS, R. O. et al. Efeito do manejo do lençol freático na adaptação fisiomorfológica de duas espécies de trigo ao encharcamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.2, p.194-202, 2000.

COLMER, T. D.; COX, M. C. H.; VOESENEK, L. A. C. J. Root aeration in rice (*Oryza sativa*): evaluation of oxygen, carbon dioxide, and ethylene as possible regulators of root acclimatizations. **New Phytologist**, v.170, p.767–778, 2006.

D'ABUNDO D. M.; **Effects of submergence and hypoxia on the growth and anatomy of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings**. 2003. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

DAS, K. K.; PANDA, D.; SARKARA, R. K.; REDDYA, J. N.; ISMAIL, A. M. Submergence tolerance in relation to variable floodwater conditions in rice. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p. 425–434, 2009.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act?. **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, 2004. GOMES, A. S. et al. Solos de várzea: uso e manejo. In: MARCÂNTONIO, G. (Coord.). Solos e irrigação. Porto Alegre: Ed. da UFRGS/FEDERACITE, 1992. p. 64-79.

HOLZSCHUH, J. M.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I. Avaliação da porosidade e placa férrica de raízes de arroz cultivado em hipoxia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p:1763-1769, 2010.

ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; YOSHIDA, T.; YUASA, T.; SHINOZAKI, K. Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. **The Plant Journal**, v.24, n.5, p.655-665, 2000.

ITO, O.; ELLA, E.; KAWANO, N. Physiological basis of submergence tolerance in rainfed lowland rice ecosystem. **Field Crops Research**, v.64, p.75-90, 1999.

JACKSON M.B.; ARMSTRONG W.; Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant biology**. v.1, p. 274-287, 1999.

JUSTIN, S.H.F.W.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and response to soil flooding. **New Phytologist**, v.106, p. 465-495, 1987.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.49, n.1, p.183-186, 1921.

PINTO, L. F. S.; PAULETTO, E. A.; GOMES, A. da S.; SOUZA, R. O. Caracterização de solos de várzea. In: Gomes, A.S.; Pauletto, E.A. (Eds). Manejo do solo e da água em áreas de várzea. Pelotas: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 1999. Cap.1, p.11-36.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, n.5, p. 247-249, 1973.

SARKAR, R. K.; REDDY, J. N.; SHARMA, S. G.; ISMAIL, A. M. Physiological basis of submergence tolerance in rice and implications for crop improvement. **Current science**, v.91, n. 7, 2006.

SURALTA, R. R.; YAMAUCHI, A. Root growth, aerenchyma development, and oxygen transport in rice genotypes subjected to drought and waterlogging. **Environmental and Experimental Botany**, v.64, p.75–82, 2008.

STEEL, Robert George Douglas; TORRIE, James Hiram. Principles and procedures of statistics – A biometrical approach. 2<sup>a</sup> ed Boston: WCB/McGraw Hill, c1980. 633p

STRIKER G. G. Flooding Stress on Plants: Anatomical, Morphological and Physiological Responses. Botany. Buenos Aires: IFEVA-CONICET, Faculty of Agronomy, University of Buenos Aires, 2012. p. 3-28. PERATA, P.; ALPI, A.; Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, v. 93, p. 1–17, 1993.

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, 2006.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Banos: IRRI, 1976.

ZEIGLER, R. S.; PUCKRIDGE, D. W. Improving sustainable productivity in rice-based rainfed lowland systems of South and South-East Asia. **Geological Journal**, v.35, p. 307–324, 1995.

## 4 - Capítulo III

### Perfil de expressão de genes da família WRKY sob estresse por submergência

#### 4.1 - Introdução

Submergência é um grande problema para as plantas e muitas vezes influencia na queda de produtividade, pois atua na redução dos níveis de oxigênio na rizosfera durante a baixa taxa de difusão do oxigênio molecular na água (HEIDENREICH et al., 2006). Tendo em vista que as plantas são organismos aeróbicos obrigatórios e requerem oxigênio para a respiração mitocondrial bem como para a produção de energia, já que um grande número de reações bioquímicas requerem oxigênio como substrato (GIBBS et al., 2011; TIANA et al., 2012).

As plantas respondem as quedas nas taxas de oxigênio através de mudanças rápidas e específicas em nível de tradução e transcrição (HEIDENREICH et al., 2006). Na célula, essa disparidade entre a oferta e demanda (hipoxia) resulta na ativação da expressão gênica (TIANA et al., 2012) e atua como acionador da transcrição gênica, promovendo o metabolismo aeróbico e ainda assim mantendo o nível da produção de ATP (GIBBS et al., 2011). A regulação da expressão gênica como resposta molecular, frente a baixas taxas de oxigênio envolve diversos fatores de transcrição. Mais de 180 genes que codificam para fatores de transcrição são descritos por serem altamente expressos sob condições de hipoxia em raízes de *Arabidopsis* (LICAUSI, 2011).

Em estudos realizados com *Arabidopsis*, alguns efeitos fenotípicos como alongamento da parte aérea, clorose das folhas e inibição do crescimento foram observados sob condições de hipoxia. Afim de entender estas alterações foram

realizados alguns estudos de microarranjo e nestes encontrados 282 genes responsivos a hipoxia, incluindo a família de genes de fatores de transcrição WRKY. Análises destes perfis de expressão sugerem que a resposta frente a hipoxia ocorre em duas fases distintas, imediata e tardia. A resposta imediata (1, 3 e 8 horas sob o estresse) inclui o aumento da expressão de genes relacionados a fermentação e fatores de transcrição, estes compreendendo os membros da família dedo de zinco C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> e família WRKY. A resposta tardia (24 e 72 horas sob estresse) envolve a repressão de genes que atuam nas vias de metabolismo secundário e de fatores de transcrição expressos, entre eles os mais relatados são as famílias dos elementos responsivos ao etileno (ERF - fatores de transcrição responsivos ao etileno) (HWANG et al. 2011).

Em relação, a quantidade de transcritos referente aos fatores de transcrição, em plântulas de *Arabidopsis* sob o estresse por hipoxia, foi observado que, em geral, o estresse remodela a tradução de diversas famílias de fatores de transcrição. Sendo que, as famílias com aumento mais pronunciado foram os WRKY e ERFs (MUSTROPHA et al.,2009).

No entanto, promotores de genes responsivos à hipoxia, são propensos a compartilhar motivos incomum e podem ser regulados por um conjunto de fatores de transcrição, demonstrando assim a importância na identificação dos elementos regulatórios de ação *cis* nas regiões promotoras, pois estes poderão fornecer um meio de descobrir novos mecanismos de redes de regulação transcricional em resposta a hipoxia (LIU, 2005). Entretanto, outros estudos que demonstrem mecanismo de tolerância a submergência devem ser conduzidos, tendo em vista as lacunas ainda existentes no nosso conhecimento.

Sendo assim, com o intuito de compreender o envolvimento destes genes na resposta ao estresse por hipoxia, este trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão de genes pertencentes a família WRKY sob estresse por hipoxia.

## **4.2 - Material e métodos**

### **4.2.1 - Indução do estresse e obtenção das amostras vegetais**

O experimento foi conduzido no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pertencente ao departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Foram utilizadas no estudo 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/8 horas (luz/escuro) e umidade relativa de 100% por 7 dias, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Posteriormente 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) contendo: 91,4 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 40,3 g L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 71,4 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 88,6 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 324,0 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5 g L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,074 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,934 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,035 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,031 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 7,7 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e 11,9 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico monohidratado, em pH 5,0 ± 0,1. 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. O experimento foi composto por três repetições de cada tratamento para cada cultivar, sendo utilizado delineamento experimental completamente casualizado.

As coletas foram realizadas em cada tratamento, sendo que a parte aérea e raiz foram coletadas separadamente, envolvidas em papel alumínio e, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80°C até a realização da extração de RNA.

#### **4.2 - Extração de RNA total**

Inicialmente foi realizado o tratamento de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos e demais utensílios necessários com água contendo 0,01% de

dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC), para evitar a ação de enzimas que degradam o RNA (RNases).

As extrações de RNA foram realizadas em triplicatas biológicas, para os tecidos de raízes e da parte aérea para todos os genótipos e tratamentos ao qual foram submetidos. Estas amostras foram maceradas separadamente em N<sub>2</sub> líquido e transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. O homogenato foi, então, centrifugado a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado afim de promover a solubilização dos lipídeos. Na sequência os tubos sofreram inversão manual por 15 segundos e após foram incubados a temperatura ambiente por sete minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A precipitação do RNA da fase aquosa foi realizada através da adição, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, de ½ volume de isopropanol e ½ de citrato de Na 0,5M + NaCl 1,2M (armazenados a 4°C), com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de etanol 70% a 4°C e centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O RNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente até a eliminação do excesso de etanol. Posteriormente, o mesmo foi ressuspendido em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, GIBCO BRL).

A pureza e a integridade do RNA total extraído foram mensuradas através de análises de absorvância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 2001).

#### **4.2.3 - Síntese de cDNA**

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™), de acordo com os seguintes passos: em um tubo livre de RNases adicionou-se o volume

previamente calculado de RNA total para uma concentração de 2 µg, 1,0 µL de *DNase I reaction buffer* 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl], completando para um volume total de 10 µl com H<sub>2</sub>O, submeteu-se essa reação a 25°C por 15 minutos. Adicionou-se mais 1,0 µL de EDTA (25 mM; pH 8,0) submetendo-se a 65°C por 10 minutos. Posteriormente colocou-se 1,0 µL de *Oligo DT* (50 µM), 1,0 µL de *DNTP Mix* (10 mM) e submeteu-se a 65°C por 5 minutos, seguido de 1 minutos a 0°C. Adicionou-se então 4,0 µL de *RT Buffer* 5x, 4,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,0 µL de DTT (1,4-Dithiothreitol) (0,1 M), 1,0 µL de *RNAse OUT*<sup>TM</sup> (40 U.µL<sup>-1</sup>) e 1,0 µL de *SuperScript*<sup>TM</sup> III (200 U.µL<sup>-1</sup>) submetendo-se a 50°C por 50 minutos, seguido de mais 5 minutos a 85°C. Por fim adicionou-se 1,0 µL de *RNAse H* (2 U.µl<sup>-1</sup>) submetendo-se a 37°C por 20 minutos, completando a reação de síntese de cDNA. A qualidade dos cDNAs foi avaliada através de uma reação de amplificação com o gene constitutivo *OsUBQ5*.

#### 4.2.4 – Seleção e desenho de inicializadores para qRT-PCR

Estudos anteriores utilizando técnica de microarranjo e buscas em bancos de dados, para amostras de plântulas de arroz da cv. Nipponbare sob estresse por ferro, verificaram que alguns genes responsivos a este estresse, incluindo os genes da família WRKY, possuem diferentes quantidades de elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora. Nestes trabalhos foram encontrados 330 elementos regulatórios de ação *cis* com ocorrência significativa ( $P \leq 0.05$ ) nos promotores de 1.569 genes que apresentaram expressão sob o estresse por ferro. O número de ocorrências dos elementos regulatórios de ação *cis* variou de 1 a 35. Segundo a hipótese levantada no estudo, os genes que possuem de 24 a 35 elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora são classificados como genes de regulação complexa e genes que possuem de 1 a 7 elementos regulatórios de ação *cis* são classificados como genes de regulação simples. Ainda, foi observado neste trabalho que existem de 7 a 19 elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora dos genes pertencentes a família WRKY (FINATTO, 2012).

Sendo assim, foi adotado para este estudo uma nova classificação com base no número de elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora dos

genes. Os genes que possuem de 7 a 11 elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora, foram classificados como genes de regulação simples e supostamente indicando que estes respondam a um ou poucos estresses. Ainda, foram classificados em genes de regulação complexa, aqueles que apresentam de 16 a 19 elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora e que supostamente estes respondam a diversos estresses. E classificados como genes de regulação intermediária, aqueles que possuem de 12 a 15 elementos regulatórios de ação *cis* na região promotora (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação dos genes quanto ao número de elementos regulatórios de ação *cis* e ao processo de regulação. CGF/FAEM/UFPel 2014.

<b>Gene</b>	<b>Nº <i>cis</i> elementos</b>	<b>Tipo de Regulação</b>
<i>OsWRKY11</i>	18	Complexa
<i>OsWRKY23</i>	19	Complexa
<i>OsWRKY17</i>	16	Complexa
<i>OsWRKY19</i>	16	Complexa
<i>OsWRKY97</i>	19	Complexa
<i>OsWRKY1</i>	14	Intermediária
<i>OsWRKY4</i>	12	Intermediária
<i>OsWRKY35</i>	14	Intermediária
<i>OsWRKY73</i>	12	Intermediária
<i>OsWRKY46, WRKY91</i>	12	Intermediária
<i>OsWRKY40</i>	13	Intermediária
<i>OsWRKY28</i>	12	Intermediária
<i>OsWRKY56</i>	9	Simples
<i>OsWRKY71</i>	11	Simples
LOC_Os03g20560	11	Simples
<i>OsWRKY113</i>	7	Simples
<i>OsWRKY62</i>	9	Simples
<i>OsWRKY64</i>	7	Simples

O desenho dos inicializadores para análise de qRT-PCR foi realizado através do programa Applied Biosystems Primer Express<sup>®</sup> respeitando os seguintes parâmetros exigidos pela empresa Applied Biosystems<sup>®</sup>: formação de um amplicon de tamanho variando entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60% e temperatura de anelamento variando entre 60 e 65°C.

Foram analisados os níveis de expressão dos genes pertencentes a família WRKY, envolvidos na resposta ao estresse por hipoxia (Tabela 2) em cinco tratamentos (tempo de coleta): 0h, 6h, 12h, 24h e 48h, e em três genótipos de arroz irrigado. Os dados de expressão do gene “alvo” foram normalizados em relação ao nível de expressão do gene constitutivo do *OsEF-1 $\alpha$*  (fator de alongação 1 alfa), pois este apresentou distribuição de dados constante em todos os tratamentos e todos os genótipos estudados, diferentemente dos outros genes constitutivos validados *OsUBQ5* e *OsNAPB*.

**Tabela 2.** Informações referentes aos genes e suas sequências de nucleotídeos inicializadores utilizados nas análises de expressão dos genes em qRT-PCR. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Chr.
<i>LOC_Os03g20560</i>	CTGGCCTTCAACATCGATCC	GGGCACAATGTGCTCGAAGA	3
<i>OsACT</i>	ATATCCAGCCCCTCGTCTGC	ACCCAGCCTTGACCATACCA	1
<i>OsEF1-<math>\alpha</math></i>	TGGTATGGTGGTGACCTTTG	GTACCCACGCTTCAGATCCT	3
<i>OsNAPB</i>	GGAATGTGGACGGTGACACT	TCAAAATAGAGTCCAGTAGATTTGTCA	6
<i>OsUBQ5</i>	CCTCGGACACCATCGACAAC	TCCCCTCCTTGTCTGGATC	1
<i>OsWRKY1</i>	CTCCGGGAAGAAGGACAAGAG	CCCTTGTCCATGCAACTGG	1
<i>OsWRKY11</i>	AGGACACGGTGGTCAAGCAG	TGTCGTGGCTCGTCACATCC	1
<i>OsWRKY113</i>	CAGCAAGAACGCCACCATGA	TCTTGGCAGGCCCTTCCTTC	6
<i>OsWRKY17</i>	CCGACGGTCACAATTTTCGCT	GCGAGAAAACCACTGGGCTAC	1
<i>OsWRKY19</i>	GAGGAAGTACGGCCAGAAGGA	TAGGCCCTCGGGTATTTGG	5
<i>OsWRKY23</i>	GAGCGACAACGACATCCTGG	TGCCCGTACTTCCTCCATCG	1
<i>OsWRKY28</i>	TCGTGGTGAAGGATGGGTATC	TCGTCACCTTCTGCCCGTAC	6
<i>OsWRKY35</i>	CTTGTGCTCTGTTCCGGCTG	AAATGGGCAATGGCCAAAG	4
<i>OsWRKY4</i>	GGTGGTGAGGAAGCCCAAGA	AGATCAACCTCGCT GCGAGT	3
<i>OsWRKY40</i>	TGCTCAGATGTTGGAGGGCA	TGAGAGACGGCCTTCCTCGA	11
<i>OsWRKY46, WRKY91</i>	TGCAGTCGAGGAAAGCCATT	CGGTTTGGCCATGTGAATTG	11
<i>OsWRKY56</i>	GTGGAGGAAGTACGGGCAGA	CACCTGGGATGTGGGTTGTT	1
<i>OsWRKY62</i>	CGGCGCCACTATAAGAAACG	GGAGGAAGTACGGCGTGACA	9
<i>OsWRKY64</i>	TGGTGATTCGGTGTGCTTG	TGGTGGCCATCGTAGTGTGG	12
<i>OsWRKY71</i>	TGGCTGATCAACCAACGATCA	ATCGTCTTGCTCACGTCCGG	2
<i>OsWRKY73</i>	ATGACGTTGAGCCCTGAAGG	TGCGGTGTCATCCCTAGCAT	6
<i>OsWRKY97</i>	GCAGTCGAGGAAAGCCATTT	CCGTTTTTGGCCATGTGAATT	12

\*Chr-cromossomo

As curvas de eficiência de amplificação para cada par de “inicializadores” dos genes estudados e para os genes constitutivos foram obtidas a partir de uma série de diluições do de um mix das amostras de cDNA, (1:1; 1:5; 1:25; 1:125). Também foram geradas curvas de dissociação para verificar a especificidade dos inicializadores. Essas curvas padrão foram representadas através de um gráfico de regressão linear do valor Ct (*Threshold Cycle*) em comparação ao log das diluições de cDNA, apresentando um valor denominado de *slope*. O *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct. O Ct é o ponto onde a curva de amplificação tem fase de crescimento com ângulo igual ou próximo a 45 graus entre as coordenadas x e y, ou seja ciclo da PCR vs. fluorescência dos *amplicons*, neste ponto a curva é cortada por uma linha (*Threshold*). O valor CT é utilizado tanto para cálculos da eficiência dos inicializadores quanto para estimar as diferenças na quantidade de transcritos em diferentes amostras.

A eficiência de cada conjunto de inicializadores para utilizar em reações de qRT-PCR foi determinado através do cálculo utilizando a fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)}$  descrita por Rasmussen (2001). O valor da eficiência deve ser próximo a 100% (100% ± 10%) e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação), também é gerado a partir da curva padrão e indica o quanto os valores Ct sobrepõem os pontos da reta obtida pelos valores log das diluições. Quanto mais parecidas estiverem as réplicas sobre a reta melhor será a eficiência do inicializador.

Para quantificação em tempo real foi utilizado 12,5 µl do kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science®), 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µl da primeira fita de cDNA (diluída 1:25, selecionada com base nos resultados das análises de validação) e 8,5 µl água para completar o volume final de 25 µl. As amostras foram acondicionadas em placas (96 Well Optic Plates - Applied Biosystems®) e cobertas com adesivo óptico (Optic Adhesives - Applied Biosystems®).

As reações foram realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems®). Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: Desnaturação inicial (95°C, durante 10 minutos); 40 ciclos (Desnaturação 95°C, durante 15 segundos; Anelamento, que variou conforme o primer de 60°C a 62°C, durante 1 minuto;

Extensão 72°C, durante 1 minuto), ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. Por último, a extensão final de 72°C por 5 minutos. A quantificação relativa de cada gene foi feita utilizando o método do Ct comparativo, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). A razão da expressão relativa (R) do gene alvo foi calculada com base na eficiência (E) e no  $\Delta Ct$  (Ct do controle - Ct da amostra analisada), tendo os dados de expressão do gene alvo normalizados em relação ao nível de expressão de gene de referência (normalizador) (PFAFFL, 2001). O experimento em qRT-PCR foi delineado como o descrito por Bustin *et al.*, 2009.

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{(Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{tratamento}})}}{E_{\text{normalizador}}^{(Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{tratamento}})}}$$

$E_{\text{alvo}}$  = eficiência do *primer* do gene alvo

$E_{\text{normalizador}}$  = eficiência do *primer* do gene de referência

**Figura 1.** Figura da fórmula do cálculo referente à eficiência do *primer* utilizado. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

#### 4.2.5 - Análise estatística

Foram realizadas análise de variância e análise de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo programa SAS (SAS 9.3 Statistical Analysis System).

Os dados também foram analisados através de ferramentas do programa Mult Experiment Viewer (TIGR MeV) (SAEED *et al.*, 2003), EASE Expression Analysis Systematic Explorer versão 4.6 de acordo com Hosack *et al.* (2003) e Sigmaplot versão 10.0, ao qual possibilitaram que posteriormente os dados fossem apresentados em forma de gráficos e diagrama de cores.

## 4.3 – Resultados

### 4.3.1 Validação dos inicializadores

Os resultados do experimento referente a validação dos oligonucleotídeos (inicializadores) são apresentados na Tabela 3. A qualidade da curva padrão foi aferida a partir do *slope* da equação de regressão, utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação, assim como do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (DEPREZ et al., 2002).

As eficiências mais ajustadas, entre 1,9 e 2,1, foram evidenciadas para os genes *OsWRKY11* (2,1), *OsWRKY23* (1,9), *OsWRKY56* (2,0), *OsWRKY17* (1,9), *OsWRKY71* (2,1), *OsWRKY4* (2,1), *OsWRKY19* (2,0), *OsWRKY73* (2,1), *OsWRKY62* (1,9), *OsUBQ5* (1,9), *OsEF-1 $\alpha$*  (1,9) e *OsNAPB* (1,9). No entanto, os genes *OsWRKY1* (3,8), *OsWRKY35* (2,2), *OsWRKY113* (5,8), *OsWRKY46/91* (2,4), *OsWRKY97* (2,2), *OsWRKY64* (2,6), *Os03g20560* (2,2) e *OsWRKY28* (2,3) obtiveram valores de eficiência fora dos valores recomendados, indicando possíveis problemas na qualidade dos inicializadores.

Em relação aos valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), estes foram todos superiores a 88% indicando que os resultados obtidos apresentam confiabilidade. Coeficientes de determinação indicam que a quantidade de amplicons que cada inicializador produz nas diferentes diluições do cDNA sofre redução conforme a redução da concentração inicial de cDNA (diluições).

**Tabela 3.** Resultados do experimento de validação dos genes *OsWRKY11*, *OsWRKY23*, *OsWRKY56*, *OsWRKY17*, *OsWRKY71*, *OsWRKY4*, *OsWRKY19*, *OsWRKY73*, *OsWRKY62*, *UBQ5*, *EF-1 $\alpha$* , *NAPB*, *OsWRKY1*, *OsWRKY35*, *OsWRKY113*, *OsWRKY46/91*, *OsWRKY40*, *OsWRKY97*, *OsWRKY64*, *Os03g20560* e *OsWRKY28* realizados a partir de diluições seriadas de cDNA de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

<b>Gene</b>	<b>Slope</b>	<b>Eficiência</b>	<b>Eficiência %</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<i>OsWRKY1</i>	-1.70	3.8*	287**	0.995
<i>OsWRKY11</i>	-3.13	2.1	109	0.969
<i>OsWRKY23</i>	-3.71	1.9	86	0.930
<i>OsWRKY56</i>	-3.44	2.0	95	0.981
<i>OsWRKY17</i>	-3.75	1.9	85	0.949
<i>OsWRKY71</i>	-2.94	2.1	119	0.876
<i>OsWRKY4</i>	-3.23	2.1	104	0.935
<i>OsWRKY35</i>	-2.83	2.2*	126**	0.988
<i>OsWRKY19</i>	-3.34	2.0	99	0.909
<i>OsWRKY73</i>	-2.97	2.1	117	0.958
<i>OsWRKY113</i>	-1.31	5.8*	480**	0.981
<i>OsWRKY62</i>	-3.64	1.9	88	0.978
<i>OsWRKY46/WRKY91</i>	-2.61	2.4*	142**	0.991
<i>OsWRKY97</i>	-2.85	2.2*	124**	0.957
<i>OsWRKY64</i>	-2.40	2.6*	161**	0.991
<i>Os03g20560</i>	-2.89	2.2*	122**	0.960
<i>OsWRKY28</i>	-2.73	2.3*	132**	0.935
<i>OsUBQ5</i>	-3.392	1.9	97	0.971
<i>OsEF-1<math>\alpha</math></i>	-3.372	1.9	98	0.963
<i>OsNAPB</i>	-3.538	1,9	92	0.958
<i>OsACT</i>	-2.026	3,12*	212**	0.970

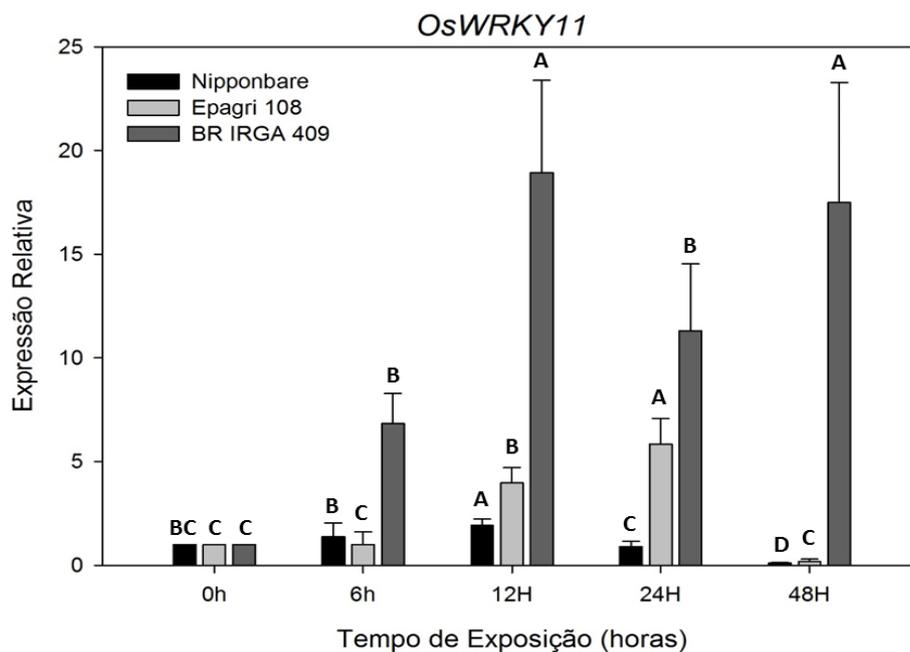
\* eficiência inferior e/ou superior ao recomendado; \*\* eficiência em porcentagem inferior e/ou superior ao recomendado.

Porém, levando em consideração os valores de eficiência dos inicializadores, apenas foram utilizados para a análise de quantificação relativa os inicializadores com os valores mais ajustados. Sendo assim, o experimento de quantificação relativa foi realizado com os genes: *OsWRKY11*, *OsWRKY23*, *OsWRKY56*, *OsWRKY17*, *OsWRKY71*, *OsWRKY4*, *OsWRKY19*, *OsWRKY73*, *OsWRKY62*, *OsUBQ5*, *OsEF-1 $\alpha$*  e *OsNAPB*.

#### 4.3.2 - Perfil de expressão dos genes da família WRKY na parte aérea de cultivares de arroz submetidas ao estresse por submergência.

Nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 podem ser observados os gráficos referentes às alterações nos níveis de transcrições dos genes WRKY sob estresse por hipoxia na parte aérea, desde 0h até 48h de submergência. Os perfis de expressão ao longo do período sob hipoxia para cada classe de genes (tipo de regulação) são descritos abaixo.

Para a classe dos genes de regulação complexa, *OsWRKY11*, *OsWRKY23*, *OsWRKY17* e *OsWRKY19* (Figuras 2, 3, 4 e 5 respectivamente), foi possível perceber, com base nos resultados obtidos, que o gene *OsWRKY11* (Figura 2) apresentou maior expressão relativa na cultivar BR IRGA 409 quando comparada as demais cultivares analisadas nos tratamentos.

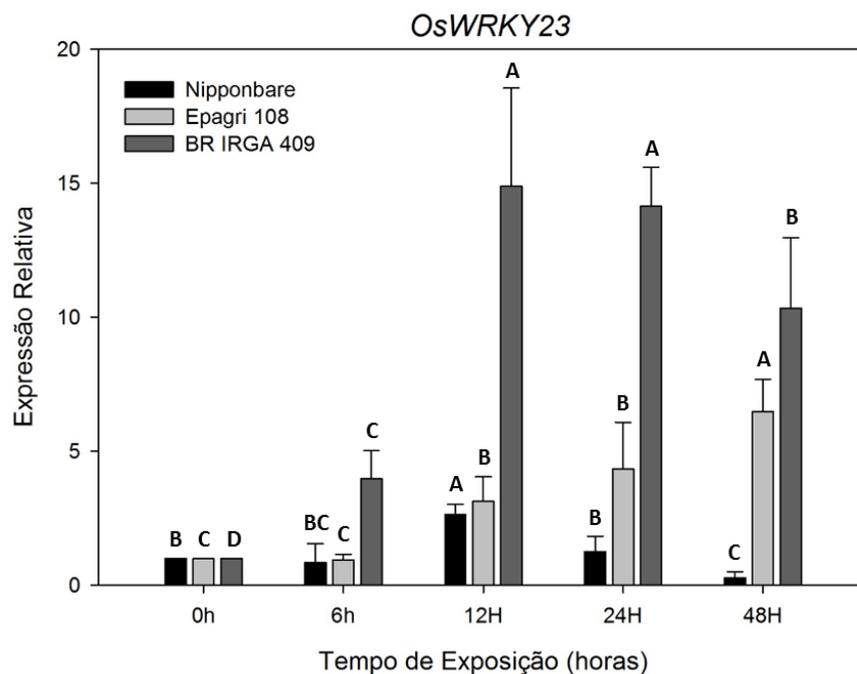


**Figura 2.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY11*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submergência (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Ainda pode-se ressaltar que para esta cultivar, os níveis de transcritos foram maiores nos tratamentos de 12h e 48h sob o estresse por hipoxia. Para a cultivar Epagri 108 foi possível verificar um maior pico de expressão deste gene, quando esta

foi submetida ao tratamento de 24h sob hipoxia. Para a cultivar Nipponbare apesar de apresentar diferenças na expressão relativa deste gene entre os tratamentos, pode-se dizer que o aumento no número de transcritos foram significativamente menores em relação aos encontrados para as outras cultivares.

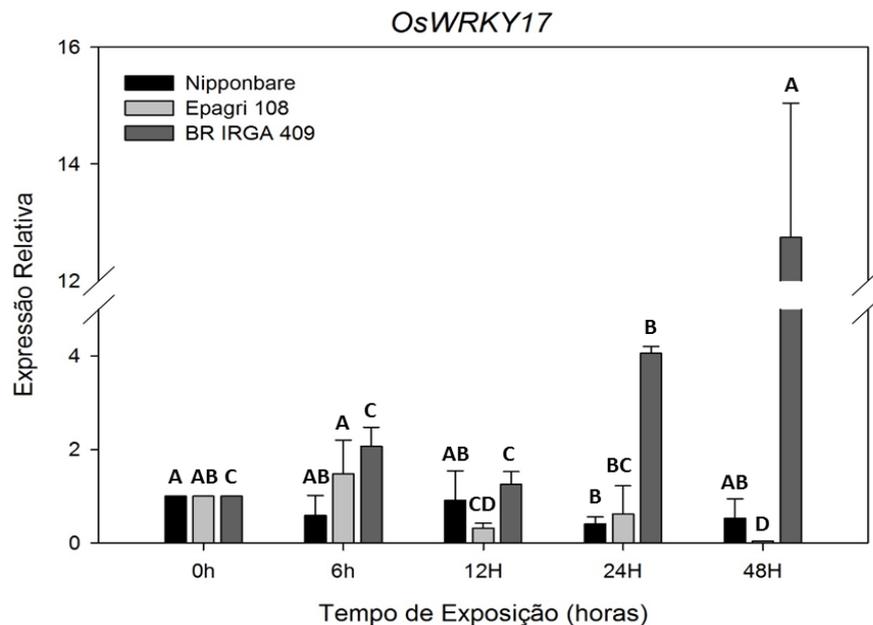
Ao analisarmos o gene *OsWRKY23* (Figura 3) observamos que este obteve um comportamento semelhante ao gene *OsWRKY11* onde, os maiores níveis de expressão relativa são observados na cultivar BR IRGA 409, e ocorreu um aumento no número de transcritos nos tratamentos de 12h e 24h de submersão, mantendo um valor consideravelmente alto na expressão relativa quando analisamos o tratamento de 48h sob hipoxia. O perfil de expressão deste gene para a cultivar Epagri 108, apresentou valores de expressão relativa maiores quando esta foi submetida a 48h de estresse. Já para a cultivar Nipponbare é notável o comportamento similar para ambos os genes *OsWRKY23* e *OsWRKY11*, apresentando um baixo número de transcritos.



**Figura 3.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY23* analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Ao observarmos o perfil de expressão do gene *OsWRKY17* (Figura 4), novamente percebemos um maior número de transcritos para a cultivar BR IRGA 409

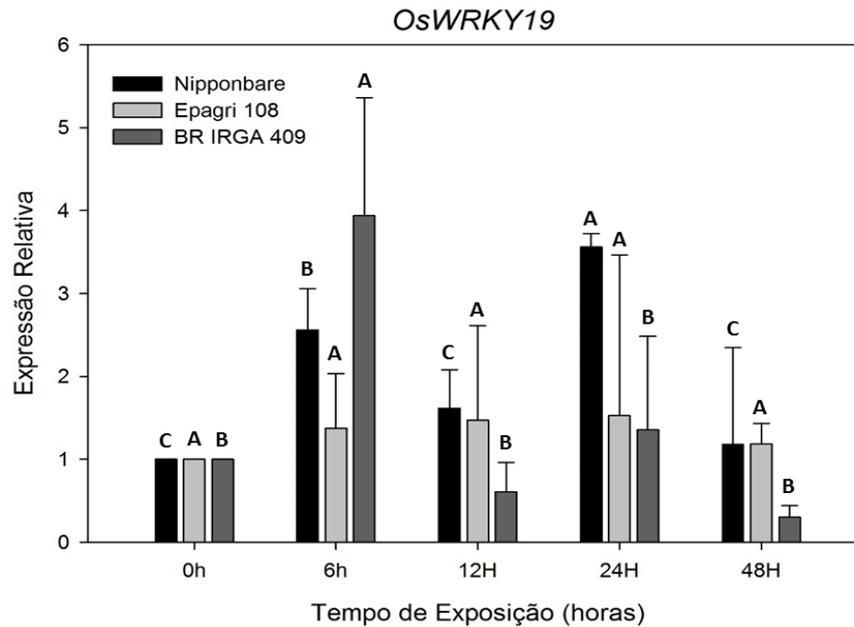
principalmente quando submetida ao tratamento de 24h de submersão. Em relação as cultivares Epagri 108 e Nipponbare a expressão relativa deste gene se manteve discreta em todos os tratamentos estudados.



**Figura 4.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY17*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Em relação a resposta do gene *OsWRKY19* (Figura 5), este apresentou um perfil de expressão relativa distinto dos genes *OsWRKY11*, *OsWRKY23* e *OsWRKY17*, principalmente quando observado seu comportamento para a cultivar Nipponbare pois, este se destaca pelo alto número de transcritos, no tratamento de 24h sob hipoxia. Verificando o perfil deste gene na cultivar BR IRGA 409, apresentou alterações significativas nos níveis de transcritos, bem como foi observado para os outros genes de regulação complexa, destacando um maior pico de expressão deste gene no tratamento de 6h sob hipoxia e posteriormente um decréscimo nos tratamentos subsequentes.

Além disso, o comportamento deste gene foi inexpressivo para a cultivar Epagri 108 visto que este não apresentou alterações significativas no número de transcritos entre os tratamentos.

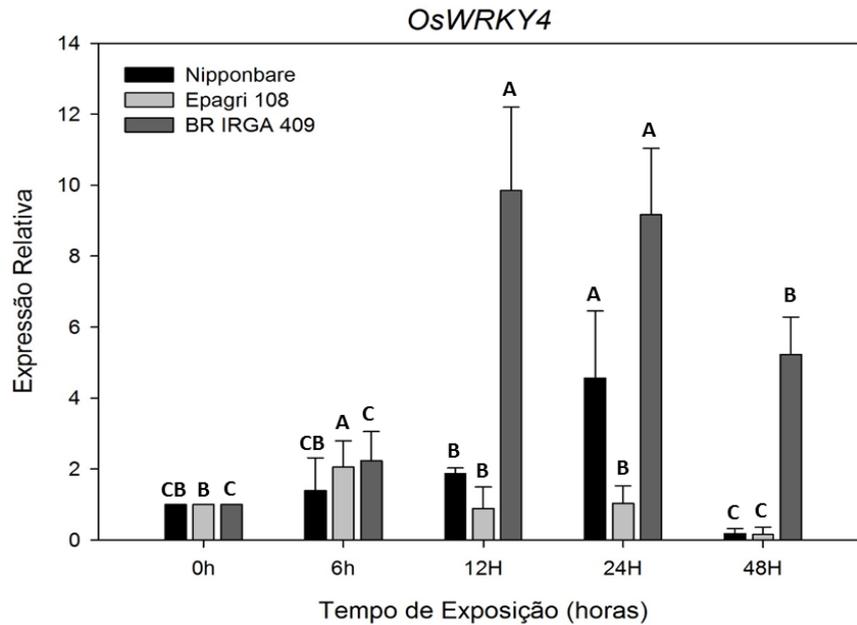


**Figura 5.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY19*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Sendo assim, em relação aos resultados obtidos para este grupo de genes de regulação complexa, foi possível destacar os maiores níveis de expressão relativa destes genes para a cultivar BR IRGA 409, principalmente quando submetida aos diferentes tratamentos de estresse por hipoxia.

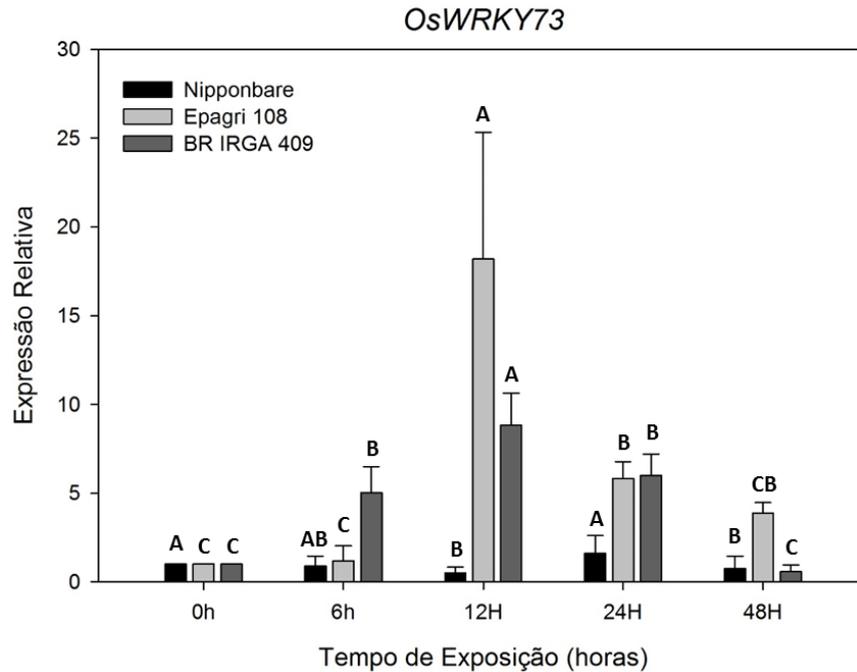
Quanto ao comportamento dos genes de expressão intermediária, podemos analisar na Figura 6 o perfil de expressão do gene *OsWRKY4*. Foi possível observar que este apresenta um comportamento bastante similar ao observado para os genes de regulação complexa, principalmente quando comparado ao gene *OsWRKY23*, visto que este apresentou um maior número de transcritos para a cultivar BR IRGA 409 principalmente para os tratamentos de 12h e 24h sob hipoxia. Quando verificamos o nível de expressão gênica do *OsWRKY4* na cultivar Nipponbare, esta apresentou um aumento gradativo na expressão relativa deste gene até 24h após a submersão, com um decréscimo quando submetida a 48h de estresse, diferentemente do comportamento observado para os genes de regulação complexa, ao qual o decréscimo na expressão para a maioria dos genes nesta cultivar ocorre a 24h de submersão. Para a cultivar Epagri 108 pode-se observar que este gene não

apresentou alterações expressivas entre os tratamentos, salientando apenas para a supressão deste gene quando a planta foi submetida ao estresse por 48h de hipoxia.



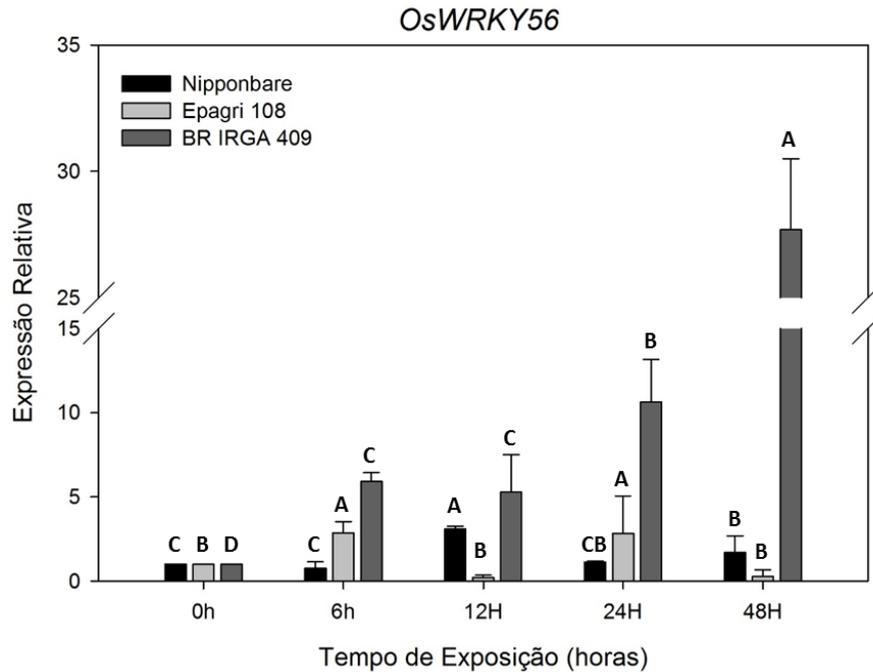
**Figura 6.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de *regulação* intermediária *OsWRKKY4*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submergência (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Analisando os dados de expressão relativa para o outro gene de *regulação* intermediária, *OsWRKY73* (Figura 7), foi identificado que houve um aumento significativo, de até 20x no número de transcritos deste gene para a cultivar Epagri 108 principalmente no tratamento de 12h sob hipoxia, o mesmo perfil de expressão deste gene pode ser observado para a cultivar BR IRGA 409, porém este aumento não foi muito expressivo, quando comparado a Epagri 108, pois no mesmo tratamento de 12h de estresse este gene aumentou em cerca de 10x o número de transcritos. Os níveis de expressão para a cultivar Nipponbare não apresentaram destaques entre os tratamentos.



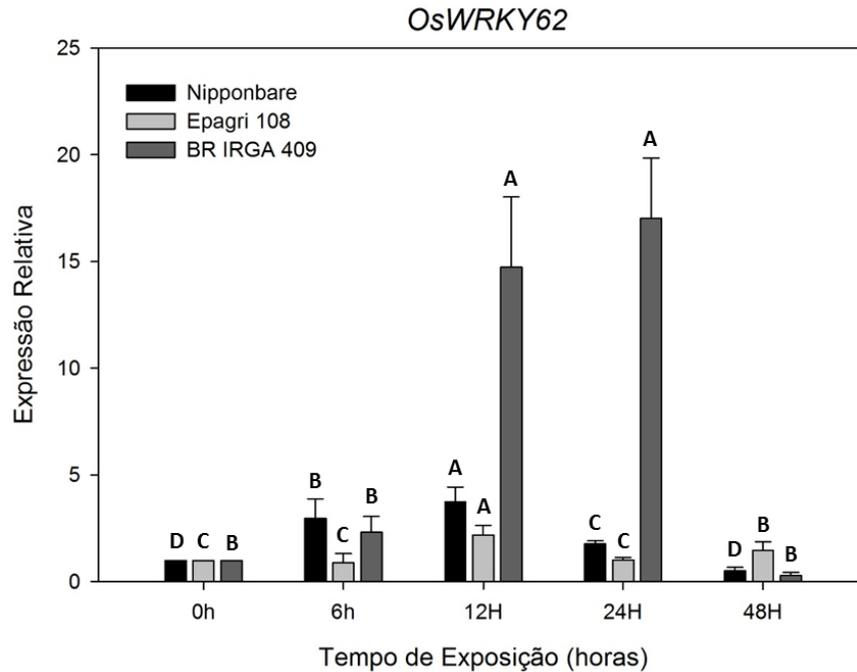
**Figura 7.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de *regulação* intermediária *OsWRKY73*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Observando os genes de regulação simples, começando pela análise do perfil de expressão do gene *OsWRKY56* (Figura 8), nota-se um número de transcritos mais elevado na cultivar BR IRGA 409, quando comparada as demais. Contudo o grande destaque na expressão deste gene foi quando a cultivar BR IRGA 409 foi submetida ao tratamento de 48h de hipoxia, onde esta aumentou em aproximadamente 30x o número de transcritos, sendo que para este mesmo tratamento as demais cultivares obtiveram valores similares ao tratamento controle.



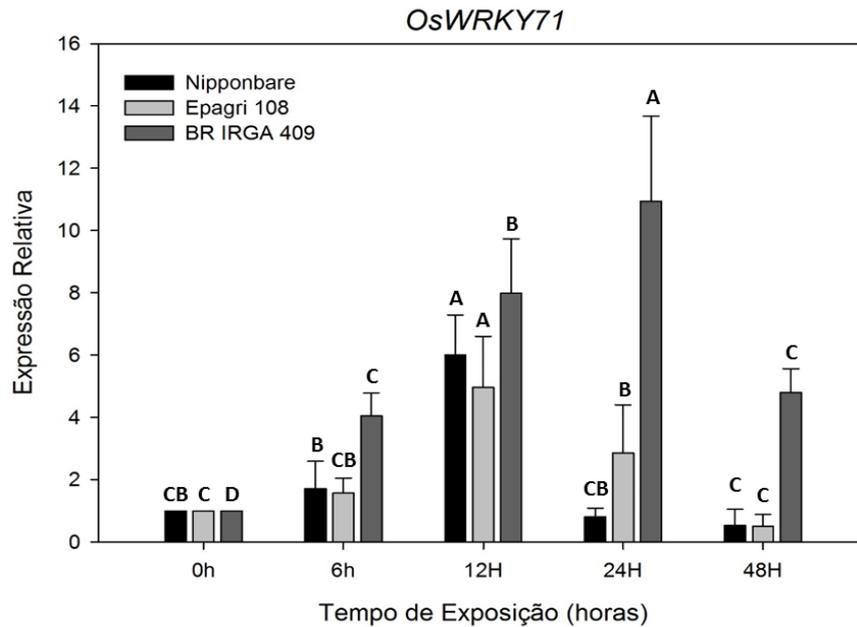
**Figura 8.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação simples *OsWRKY56*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Analisando o gene *OsWRKY62* (Figura 9), pode-se verificar que novamente o comportamento no perfil de expressão deste gene é de grande destaque na cultivar BR IRGA 409. Notavelmente houve um acréscimo progressivo no número de transcritos, evidenciando um maior número nos tratamentos de 12h e 24h de submersão, onde a expressão relativa deste gene é cerca de 15x e 17x maior, respectivamente, do que o grupo controle. As cultivares Nipponbare e Epagri 108 apresentaram oscilações discretas e similares ao tratamento controle no número de transcritos, bem como o observado para o gene de regulação simples *OsWRKY56*, anteriormente citado.



**Figura 9.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação simples *OsWRKY62*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Pode-se perceber através do comportamento do gene *OsWRKY71* (Figura 10) que este demonstrou maiores valores de expressão relativa na cultivar BR IRGA 409, sendo que este gene apresenta um progressivo aumento no número de transcritos desde o tratamento controle até o tratamento de 24h sob hipoxia, logo após, no tratamento de 48h, ocorre um decréscimo se igualando ao número de transcritos no tratamento de 6h. As cultivares Nipponbare e Epagri 108 mais uma vez apresentaram comportamento similar, tendo um aumento no número de transcritos no tratamento de 12h sob hipoxia. Demonstrando uma subexpressão, no tratamento de 48h, para a cultivar Nipponbare, já que os valores de expressão relativa foram inferiores aos valores do tratamento controle.



**Figura 10.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de *regulação* simples *OsWRKY71*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

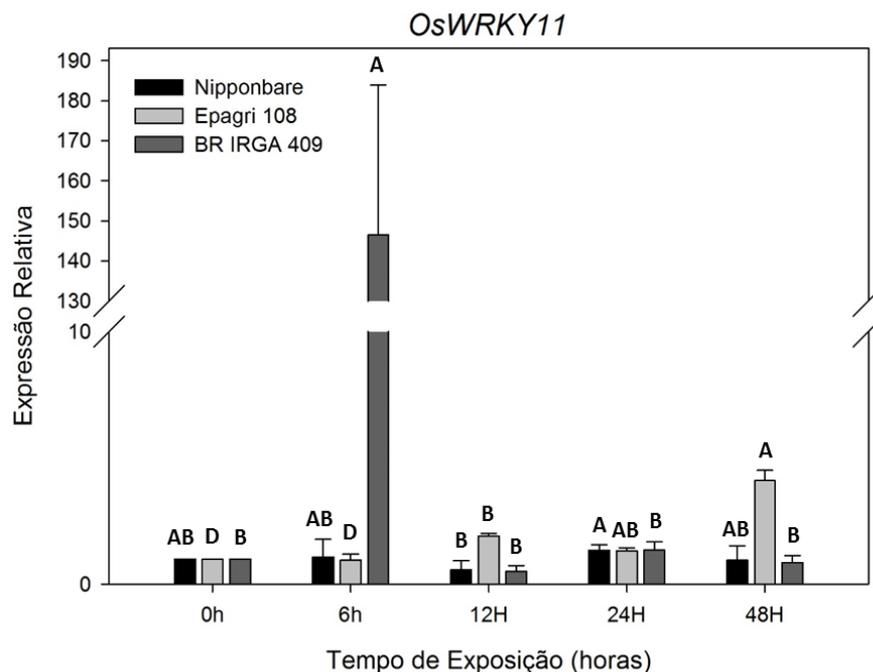
#### 4.3.3 - Perfil de expressão dos genes da família WRKY no tecido radicular de cultivares de arroz submetidas ao estresse por submersão.

Afim de analisarmos o comportamento dos nove genes estudados no tecido radicular, as figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 apresentam os gráficos referentes as alterações da expressão relativa dos genes de regulação complexa, intermediária e simples, desde o tratamento controle (0h) até 48h de submersão em plântulas de arroz. Os perfis de expressão ao longo do período de estresse sob hipóxia para cada classe de genes (tipo de regulação) são descritos abaixo.

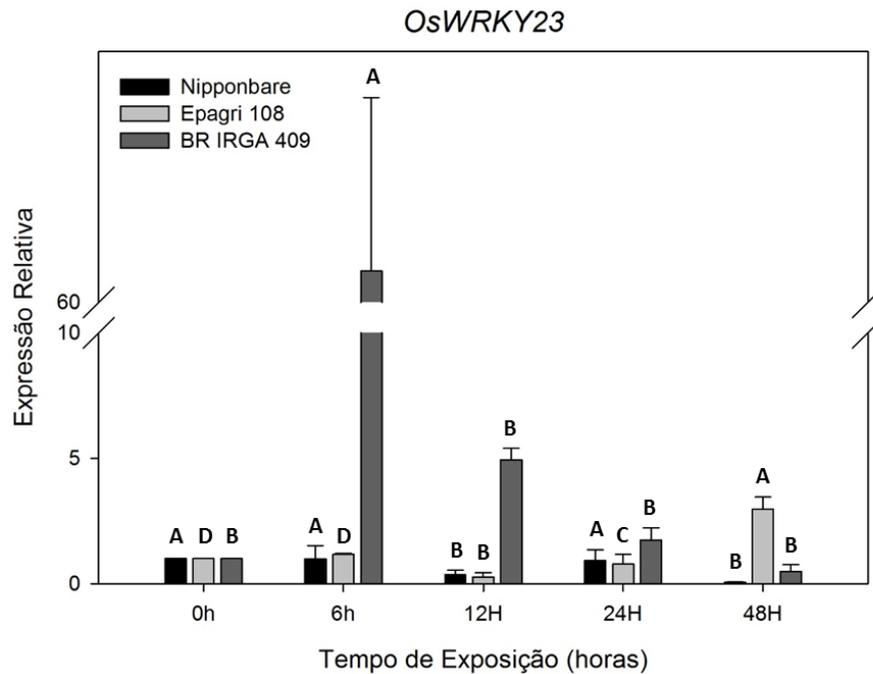
Os genes de regulação complexa *OsWRKY11*, *OsWRKY23*, *OsWRKY17* e *OsWRKY19* são apresentados nas figuras 11, 12, 13 e 14 respectivamente. Em uma análise geral, os genes de regulação complexa se comportaram de maneira similar no tecido radicular. Destacando o comportamento destes genes no tratamento de 6h sob hipóxia para a cultivar BR IRGA 409, onde apresentou um maior número de transcritos, sendo que para o gene *OsWRKY11* este aumento foi em torno de 140x maior quando comparado ao tratamento controle (Figura 11). Nos tratamentos subsequentes demonstrou oscilações na expressão relativa porém sempre com

valores próximos aos valores no tratamento controle. Para os genes *OsWRKY23*, *OsWRKY17* e *OsWRKY19* observamos o mesmo comportamento porém, o número de transcritos para o tratamento de 6h foi cerca de 60x maior que o tratamento controle para o gene *OsWRKY23* (Figura 12), 45x mais para o gene *OsWRKY17* (Figura 13) e 20x mais para o gene *OsWRKY19* (Figura 14).

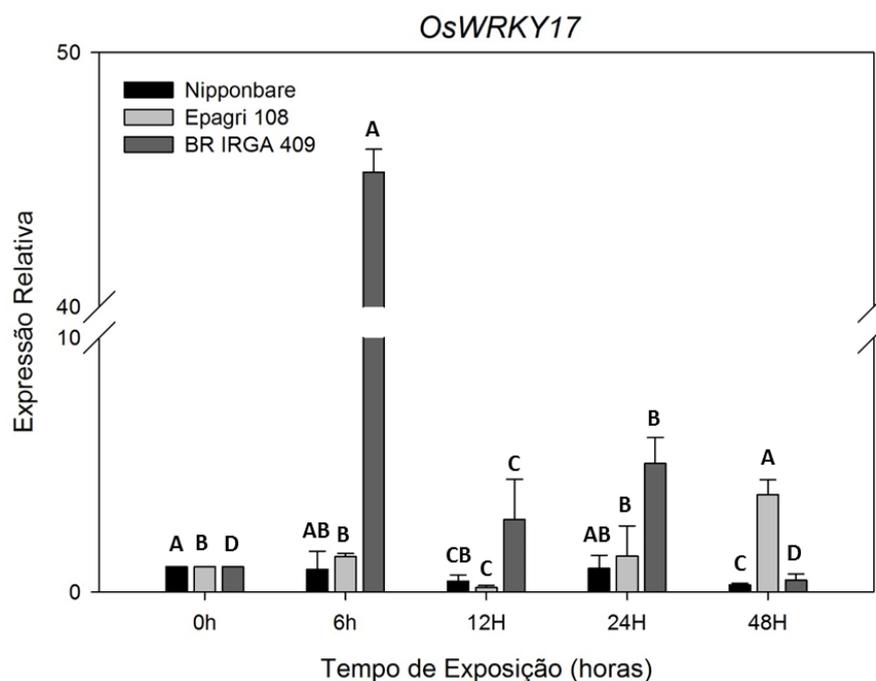
Outro destaque comum ao perfil de expressão dos genes de regulação complexa é para a cultivar Epagri 108 que, apresentou maiores valores de transcritos quando a plântula foi submersa por 48h, exceto para o gene *OsWRKY19* onde foi possível notar uma subexpressão deste gene, bem como para os demais genótipos estudados. A cultivar Nipponbare não apresentou maiores diferenças na expressão relativa dos genes de regulação complexa nos diferentes tratamentos.



**Figura 11.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY11*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

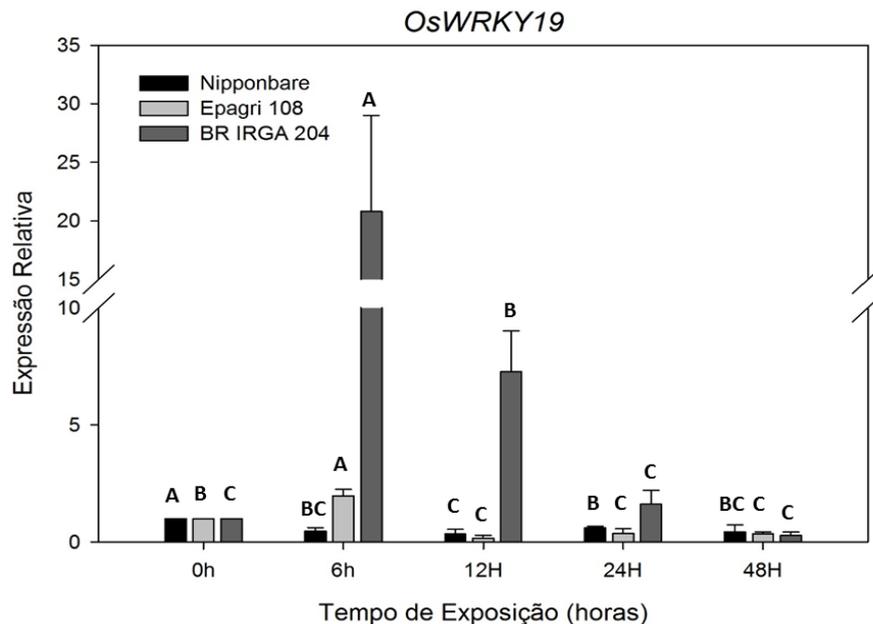


**Figura 12.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY23*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.



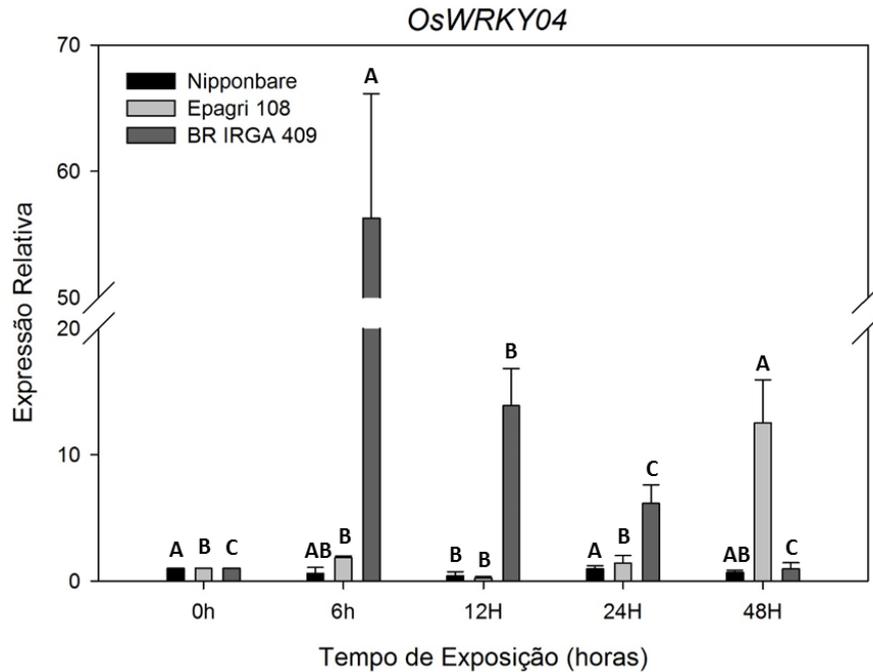
**Figura 13.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY17*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística

significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.



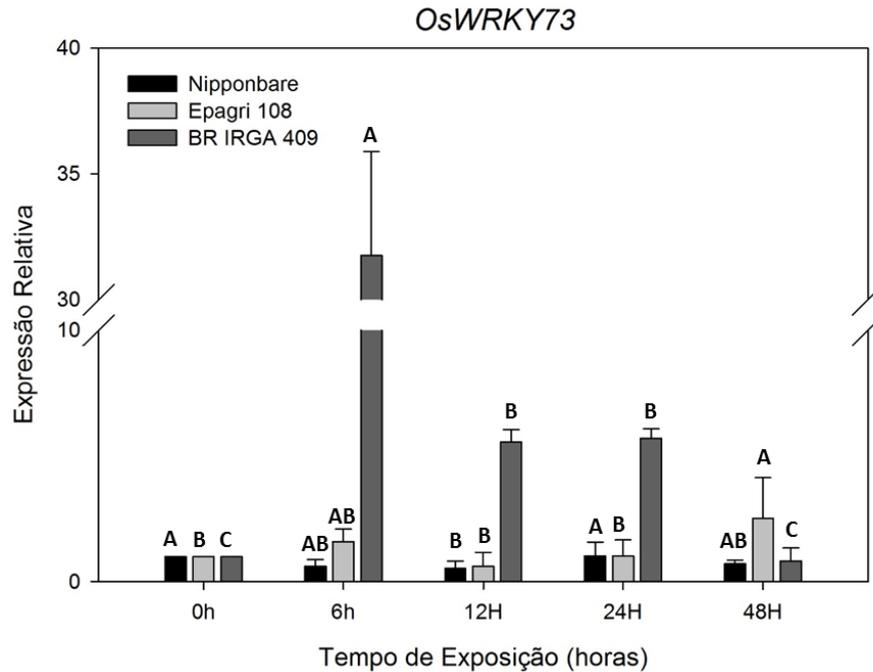
**Figura 14.** Gráfico com o perfil de expressão do gene de regulação complexa *OsWRKY19*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submergência (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Em relação aos genes de regulação intermediária, foi observado para o gene *OsWRKY4* (Figura 15) que o grande destaque está na expressão relativa deste gene para a cultivar Epagri 108 no tratamento de 48h sob hipoxia, onde o número de transcritos foi de aproximadamente 12x maior do que o tratamento controle demonstrando, a elevada expressão deste gene. Da mesma forma que para os demais genes, a cultivar BR IRGA 409 apresentou altos valores no número de transcritos sendo no tratamento de 6h cerca de 56x maior do que no tratamento controle. Este comportamento confere com o comportamento dos genes de regulação complexa. Ainda, o número de transcritos na cultivar BR IRGA 409 manteve-se alto no tratamento de 12h (14x maior) bem como no tratamento de 6h (6x maior). Este gene não apresentou maiores diferenças para a cultivar Nipponbare, apenas pode-se verificar diferença estatística no tratamento de 12h, onde o número de transcritos foi mais baixo em relação aos outros tratamentos, indicando uma subexpressão deste gene.



**Figura 15.** Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação intermediária *OsWRKY4*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submergência (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

Analisando o outro gene de regulação intermediária, foi observado que, o gene *OsWRKY73* (Figura 16) apresentou, no tratamento de 6h sob hipoxia para a cultivar BR IRGA 409, o número de transcritos superior ao número de transcritos do tratamento controle em mais de 30x. Este gene não demonstrou maiores diferenças entre os tratamentos para as cultivares Epagri 108 e Nipponbare.

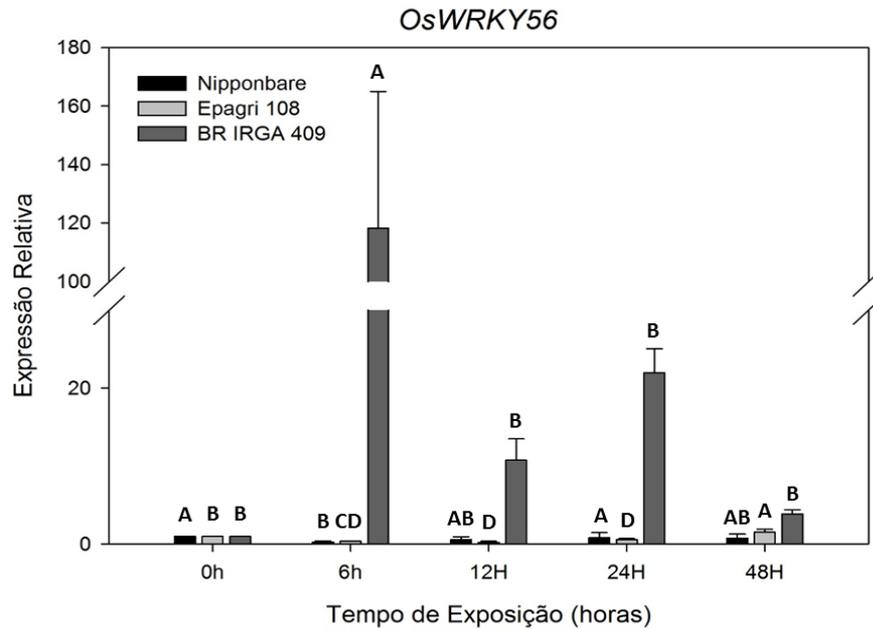


**Figura 16.** Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação intermediária *OsWRKY73*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

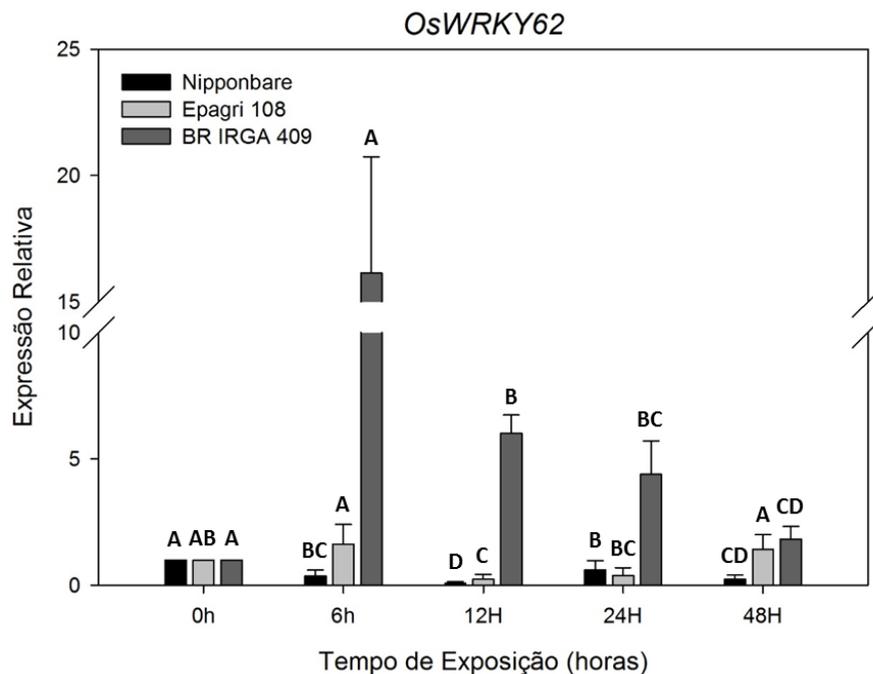
Quanto a expressão dos genes de regulação simples, *OsWRKY56*, *OsWRKY62* e *OsWRKY71* estes são apresentados a seguir nas figuras 17, 18 e 19. Da mesma forma que os demais genes dos grupos de regulação complexa e intermediária, estes genes apresentaram altos níveis de expressão na cultivar BR IRGA 409. Para o gene *OsWRKY56* este apresentou em torno de 118x mais transcritos do que o tratamento controle (Figura 17), o gene *OsWRKY62* demonstrou 16x mais transcritos do que o tratamento controle (Figura 18) e o gene *OsWRKY71* teve uma expressão relativa 36x maior neste tratamento quando comparado com o tratamento controle (Figura 19).

Ao analisarmos o tratamento de 24h percebemos uma elevada expressão do gene *OsWRKY56* para a cultivar BR IRGA 409, sendo 22x maior quando comparada com o tratamento controle. Os genes *OsWRKY62* e *OsWRKY71* se comportaram da mesma forma para este tratamento na cultivar BR IRGA 409. Em relação a cultivar Epagri 108, foi notório o aumento no número de transcritos do gene *OsWRKY71*, no tratamento de 48h sob hipoxia. Este comportamento não foi observado para os demais genes de regulação simples. Os genes de regulação simples apresentaram um baixo

número de transcritos, indicando um perfil de expressão similar, para a cultivar Nipponbare.

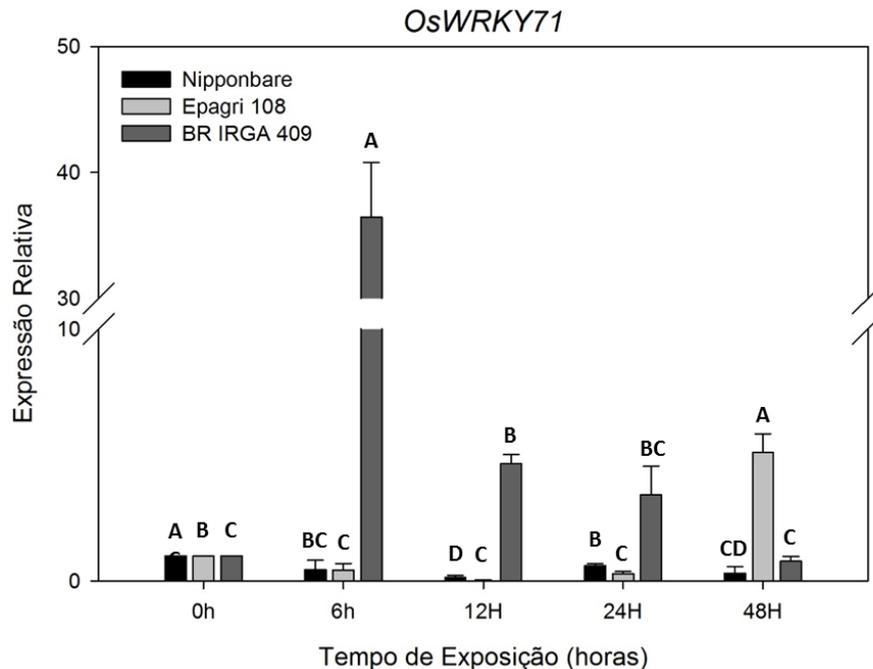


**Figura 17.** Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação simples *OsWRKY56*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submergência (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.



**Figura 18.** Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação simples *OsWRKY62*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos

de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.



**Figura 19.** Gráfico com o perfil de expressão dos genes de regulação simples *OsWRKY71*, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submersão (6h, 12h, 24h e 48h), nas raízes de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

#### 4.4 - Discussão

Estudos utilizando transformação genética em plântulas de arroz sob estresse por seca e calor, tem demonstrado que quando o gene *OsWRKY11* está sob controle do promotor HSP101 (heat shock inducible), este apresenta superexpressão, tornando a planta tolerante a esses estresses (WU et al., 2009).

Verificando os trabalhos referentes a resposta do gene *OsWRKY23* em arroz, pesquisas afirmam que a expressão deste gene se dá exclusivamente no tecido radicular e em folhas senescentes e não em folhas jovens. Afirmando ainda que este gene está envolvido no processo de senescência, pois, os estudos realizados demonstraram a indução deste gene quando as plantas no escuro induziram a senescência, bem como também foram obtidas respostas quanto ao estresse biótico por *Pyricularia oryzae* Cav (JING et al., 2009).

Ainda expondo plântulas de arroz a vários estresses abióticos (frio, seca e salinidade) e tratamentos com fitormônio, foi verificado alto nível de expressão do gene *OsWRKY23* para o estresse de salinidade e tratamento com ácido abscísico acreditando-se que desta forma este gene está envolvido na resposta a estresse abiótico e tratamento por hormônio. E, para o gene *OsWRKY17*, pode-se perceber que este não apresentou nenhuma alteração no perfil de expressão quando as plântulas de arroz foram submetidas aos estresses, porém foi subexpresso durante os tratamentos com os fitormônios ácido abscísico e auxina (RAMAMOORTHY et al, 2008).

Outros estudos sobre estresses bióticos em arroz, utilizando a técnica de microarranjo, 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 *OsWRKY23*, 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. Também foi descrito que o gene *OsWRKY19* possa estar envolvido na resposta a estresse biótico. O gene *Rxo1* induz a expressão do gene do arroz *OsWRKY19* que realiza funções nas vias basais de defesa da planta, principalmente associado as rotas do ácido salicílico (ZHOU et al, 2010).

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).

Já quando 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. Não houveram 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).

Em relação ao gene *OsWRKY56*, estudos baseados na técnica de microarranjo verificaram o perfil de expressão de alguns genes, em panícula de arroz sob estresse por calor, e verificou-se que o gene *OsWRKY56* manteve altos níveis de expressão

durante todos os tratamentos, sugerindo que este possa estar desempenhando um importante papel na tolerância a esse estresse (ZHANG et al, 2012).

Análises de expressão de fatores de transcrição WRKY, revelaram que o gene *OsWRKY62*, apresentou altos níveis de expressão em folhas de arroz infectadas com *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (Xoo) e tratadas com ácido salicílico, que é molécula de sinalização de defesa. Os autores sugerem que este gene possa estar envolvido na defesa do arroz, em nível transcricional, em resposta ao patógeno (RYU et al, 2006). Outro estudo, este envolvendo a técnica de transformação genética, também verificou a relação deste gene a respostas imunes frente a este mesmo estresse biótico (PENG et al, 2010).

Ainda, a relação do gene *OsWRKY62* com estresse biótico é descrita em outro estudo, onde o gene do arroz *Xa21*, o qual confere resistência a Xoo, se liga ao *OsWRKY62*, atuando como um mediador fundamental para a defesa basal e raça-específica (PENG et al, 2008). Já, em relação a estresse abiótico, estudos em folhas de plântulas de arroz verificaram a relação entre o gene *OsSPX1*, o qual promove tolerância em *Arabidopsis* e tabaco a estresse por baixas temperaturas, e diversos outros genes como: *OsPHO2*, *GSTs*, *P450s* e os WRKYs, sendo verificado que os genes *OsWRKY62* e *OsWRKY71* atuam em conjunto frente ao estresse por frio e estresse oxidativo em arroz (PENG et al, 2010).

Além disso, alguns genes de *Arabidopsis* *AtWRKY18*, *AtWRKY40* e *AtWRKY60* homólogos aos genes de arroz *OsWRKY71*, *OsWRKY72* e *OsWRKY62* respectivamente, (SHARMA et al, 2013) apresentam papéis importantes frente a estresses bióticos e abióticos. Estudos realizados com estes genes de *Arabidopsis* apresentaram como resultados que, estes interagem em conjunto para regular diversos estresses. Mutantes duplos *wrky18wrky40*, *wrky18wrky60* e mutantes triplos *wrky18wrky40wrky60* apresentaram resistência a *Pseudomonas syringae* porém, apresentaram sensibilidade a *Botrytis cinerea*. Ainda neste mesmo estudo, foi verificado que o gene *AtWRKY60*, homólogo do gene *OsWRKY62*, contribuiu com aumento na tolerância a salinidade e estresse osmótico (CHEN e al., 2010).

Ramamoorthy et al. 2008, desenvolveram estudos onde submeteram plântulas de arroz a diferentes estresses abióticos, bióticos e hormonais. Através de análises em qRT-PCR foram obtidos perfis de expressão para diversos genes *OsWRKY*, incluindo o perfil do gene *OsWRKY62*, o qual apresentou altos níveis de expressão sob os tratamentos com fitormônios, exceto quando submetido ao tratamento com

metil jasmonato. Para os tratamentos com estresses abióticos, este gene apenas apresentou diferença no perfil de expressão frente ao estresse por frio, o qual foi subexpresso. No entanto, os dados apresentados por Ramamoorthy et al. 2008 entram em conflito com os resultados obtidos por Chen et al., 2010 que relatam o envolvimento e incremento da tolerância do gene *OsWRKY62* sob estresse por salinidade. Demonstrando assim, a grande importância e necessidade de novos estudos sobre o perfil de expressão deste gene, *OsWRKY62*, em diversos estresses abióticos.

Na literatura não há relatos sobre o envolvimento do gene *OsWRKY71* com o estresse por hipoxia porém, foram encontrados maiores níveis de expressão para este gene, em outros estresses. Ainda, alguns autores relatam o envolvimento deste gene na resposta a estresses bióticos em arroz transgênico, onde verificou-se que altos níveis de transcritos conferem resistência a infecção por bactérias e que este também participa em resposta de defesas, as quais estão envolvidos o etileno e o ácido jasmônico (LIU et al, 2007). Peng et. al 2010 e Xie et al, 2006 também relataram o envolvimento do gene *OsWRKY71* relacionado a defesa da planta, onde a ativação transcricional deste gene é associado a interações com proteínas regulatórias. Essa interação com proteínas pode exibir diferentes funções na regulação da expressão do gene. Ainda, mudanças que afetam o complexo proteico causada por mutações, superexpressão ou estresse abiótico, podem afetar a expressão do gene e conseqüentemente a resposta de defesa da planta. Além disso, o gene *OsWRKY71* codifica para um repressor transcricional de ácido giberélico nas células da aleurona (ZHANG et al., 2004).

Este efeito sobre as células da aleurona também foi encontrado em estudos com o gene *HvWRKY38*, em cevada, homólogo ao gene *OsWRKY71*, que induz pelo menos cinco elementos regulatórios de ação *cis* no promotor do gene *Amy32b α-amilase* o qual governa a expressão do ácido giberélico. Estes genes interagem com repressores e ativadores que regulam a expressão da giberilina mediada pelo gene *Amy32b α-amilase* nas células da aleurona (ZOU et al., 2008).

Em relação ao envolvimento a estresses abióticos há poucos trabalhos, porém, estudos com este mesmo gene de cevada *HvWRKY38*, verificaram que este é expresso em condições de frio e de seca (MARÉ et al., 2004). Outro trabalho envolvendo transformação genética de *Paspalum notatum* Flugge com o gene

*HvWRKY38*, verificou tolerância a seca nas plantas transformadas quando comparado ao tipo selvagem (não transformado) (XIONG et al, 2010).

O gene de *Arabidopsis AtWRKY46*, ortólogo ao gene *OsWRKY71* de arroz (BERRI et al, 2009), apresentou envolvimento na sinalização em resposta a estresse biótico e também participação na rota de sinalização do ácido salicílico. Indicando que este possivelmente regula a resistência basal a *Pseudomonas syringae* (HU et al, 2012).

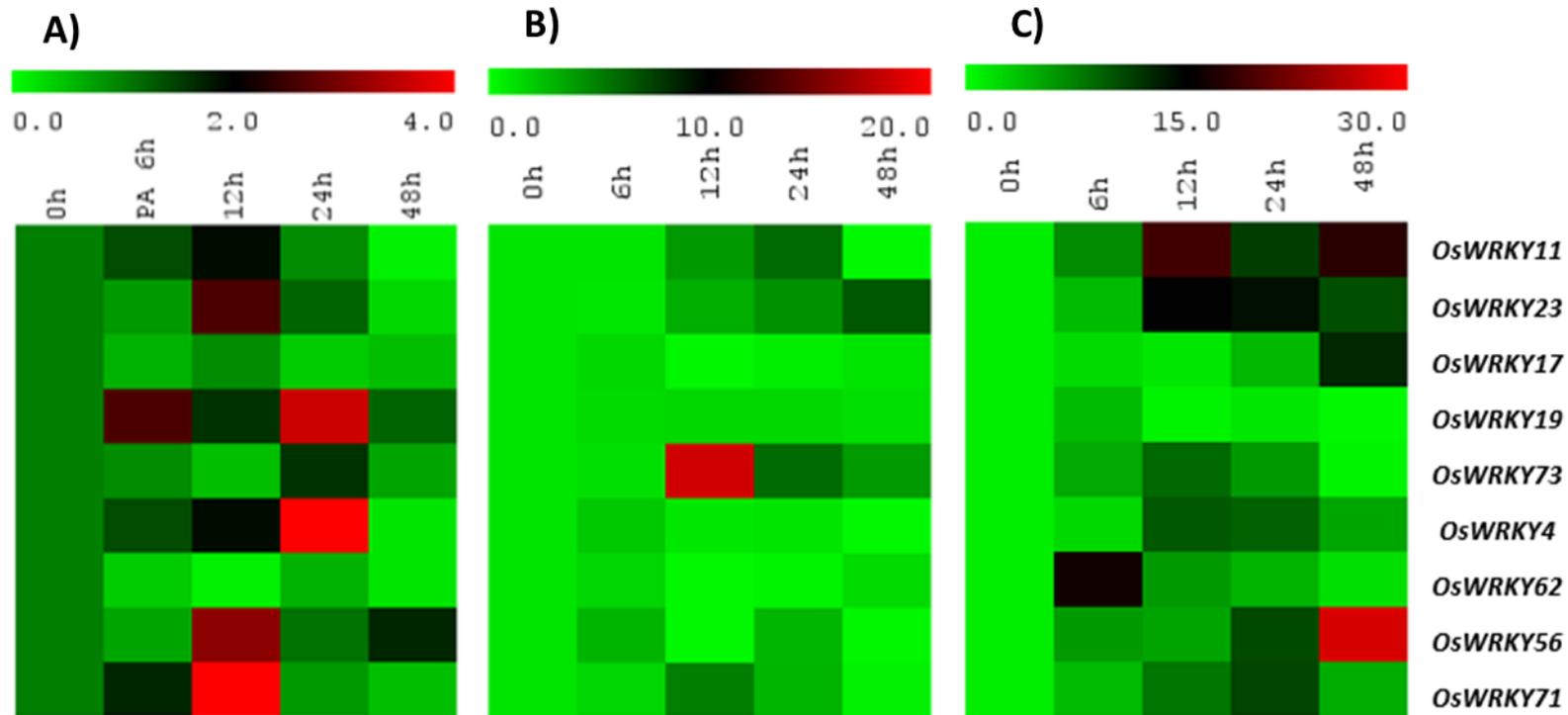
Enfim, para um melhor entendimento foi realizada uma análise conjunta para verificar o nível de alteração do perfil de expressão dos genes estudados, os mesmos foram divididos em alterações discretas (até 2x maior que o tratamento controle), moderadas (de 2x até 10x maior do que o tratamento controle) e altas (< 10x do que o tratamento controle). Com base nos resultados obtidos na parte aérea (Figura 20) verificamos, de modo geral, que para a cultivar Nipponbare, três dos quatro genes WRKY de regulação complexa estudados apresentaram discretas alterações na expressão relativa, obtendo valores de expressão igual ou até 2x maior do que o tratamento controle. O quarto gene WRKY, de regulação complexa, apresentou alterações moderadas na expressão relativa, sendo aproximadamente 4x maior do que o tratamento controle. Os genes de regulação intermediária apresentaram moderadas alterações, cerca de 4x maior do que o tratamento controle. Os genes de regulação simples apresentaram comportamento similar aos genes de regulação complexa frente ao estresse por hipoxia, dois genes apresentaram alterações discretas na expressão relativa e um deles demonstrou um comportamento moderado, sendo 6x maior que o tratamento controle.

Em relação a cultivar Epagri 108, metade dos genes de regulação complexa apresentaram discretas alterações na expressão relativa enquanto que a outra metade se apresentou alterações moderadas, atingindo aproximadamente 7x a expressão relativa do tratamento controle. Os genes de regulação intermediária apresentaram altas e discretas alterações, com uma expressão relativa de aproximadamente 18x e 2x maior do que a expressão do tratamento controle. Entre os genes de regulação simples, um deles apresentou alterações discretas na expressão relativa sendo que os demais, demonstraram moderadas alterações, chegando a apresentar quantidades de transcritos 5x maior do que o tratamento controle.

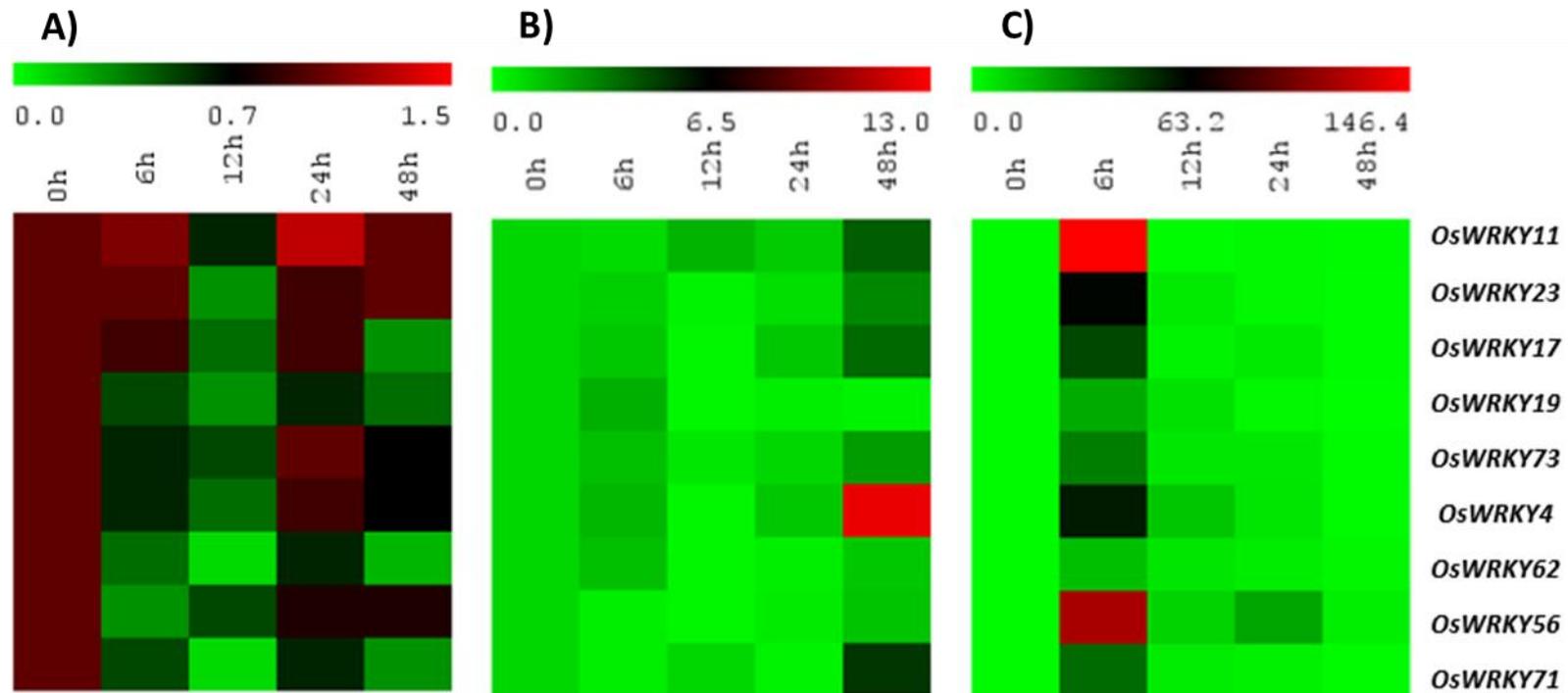
A cultivar BR IRGA 409, caracterizada por apresentar suscetibilidade a outros estresses abióticos, apresentou valores de transcritos mais elevados do que as demais cultivares estudadas. Três dos quatro genes de regulação complexa, apresentaram altas alterações na quantidade de transcritos (19x). O outro gene de regulação complexa apresentou moderadas alterações na expressão relativa, sendo ele expresso aproximadamente 4x mais do que o tratamento controle. Os genes de regulação intermediária apresentaram moderadas alterações na expressão relativa, atingindo aproximadamente 10x mais quantidades de transcritos quando comparado ao tratamento controle. Já em relação aos genes de regulação simples, todos apresentaram altas alterações na expressão relativa, apresentando quantidades de transcritos entre 10x e 32x do que o tratamento controle.

No tecido radicular (Figura 21), os genes de regulação complexa, regulação intermediária e regulação simples, para a cultivar Nipponbare, apresentaram discretas alterações na expressão relativa frente ao estresse por hipoxia. Porém, para a cultivar Epagri 108, três dos quatro genes de regulação complexa demonstraram moderadas alterações na expressão relativa, atingindo aproximadamente 4x a quantidade de transcritos quando comparado ao tratamento controle. O outro gene apresentou discretas alterações na expressão relativa atingindo 2x mais quantidades de transcritos. Os genes de regulação intermediária para esta cultivar atingiram alterações moderadas e altas na quantidades de transcritos, diferentemente da cultivar Nipponbare, atingindo aproximadamente 12x mais do que o tratamento controle. Já, para dois genes de regulação simples alterações moderadas foram encontradas, obtendo 5x mais quantidade de transcritos, enquanto que o outro gene de regulação simples apresentou discretas alterações na expressão relativa.

A cultivar BR IRGA 409, diferentemente das cultivares Nipponbare e Epagri 108, e de forma semelhante ao ocorrido na parte aérea, em todos os genes estudados, incluindo regulação complexa, intermediária e simples apresentaram expressivas alterações na quantidade de transcritos. Os valores atingiram cerca de 146x mais quantidade no número de transcritos para genes de regulação complexa e aproximadamente 118x para genes de regulação simples.



**Figura 20.** Perfil de expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse por hipoxia, analisados em cinco tratamentos (0h, 6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado (A) cultivar Nipponbare, (B) cultivar Epagri 108 e (C) cultivar BR IRGA 409, através da técnica de qRT-PCR e representado por escalas que variam de 1 – 146.4, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2014.



**Figura 21.** Perfil de expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse por hipoxia, analisados em cinco tratamentos (0h, 6h, 12h, 24h e 48h), no tecido radicular de três genótipos de arroz irrigado (A) cultivar Nipponbare, (B) cultivar Epagri 108 e (C) cultivar BR IRGA 409, através da técnica de qRT-PCR e representado por escalas que variam de 1 – 146.4, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2014.

#### 4.6 – Conclusões

Genes WRKY respondem ao estresse por hipoxia em plântulas de arroz irrigado.

Não há diferença entre a resposta do perfil de expressão dos genes de regulação simples e complexa em plântulas de arroz sob estresse por hipoxia.

#### 4.7 - 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.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.

CHEN, H.; LAI, Z.; SHI, J.; XIAO, Y.; CHEN, Z.; XU, X. Roles of *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. **BMC Plant Biology**, v.10, n.281, 2010.

DEPREZ, R.H.L. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p. 63-69, 2002.

FINATTO, Taciane. **Transcriptomic analysis of genes and LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) in response to iron toxicity**. 2012. 190 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

GIBBS, D. J.; LEE, S. C.; ISA, N. M.; GRAMUGLIA, S.; FUKAO, T.; BASSEL, G. W.; CORREIA, C. S.; CORBINEAU, F.; THEODOULOU, F. L.; BAILEY-SERRES, J.; HOLDSWORTH, M. J. Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. **Nature**, v. 479, p.415-417, 2011.

HEIDENREICH, B.; BIEBER, E.; SANDERMANN, H.; ERNST, D. Identification of a new member of the WRKY family in tobacco. **Acta Physiologie Plantarum**, v. 8, n. 2, p.117-125, 2006.

HOSACK, D. A.; DENNIS, G. JR.; SHERMAN, B.T.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biology**, v.4, 2003.

HU, Y.; DONG, Q.; YU, D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 against pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v.185, n.186, p:288-297, 2012.

HWANG, J. H.; LEE, M. O.; CHOY, Y.; HA-LEE, Y.; HONG, C. B.; LEE, D. Expression profile analysis of hypoxia responses in *Arabidopsis* roots and shoots. **Journal of Plant Biology**, v.54, p:373–383, 2011.

JAIN, M.; NJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real- time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646–651. 2006.

JING, S.; ZHOU, X.; SONG, Y.; YU, D. Heterologous expression of OsWRKY23 gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v.58, p:181–190, 2009.

LICAUSI, F. Regulation of the molecular response to oxygen limitations in plants. **New Phytologist**, v.190, p:550–555, 2011.

LIU, F.; VANTOAI, T.; MOY, L. P.; BOCK, G.; LINFORD, L. D.; QUACKENBUSH, J. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.137, p: 1115–1129, 2005.

LIU, X.; BAI, X.; WANG, X.; CHU, C. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p: 969–979, 2007.

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.

MARÉ, C.; MAZZUCOTELLI, E.; CROSATTI, C.; FRANCA, E.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, L. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. **Plant Molecular Biology**, v.55, p:399–416, 2004.

MUSTROPHA, A.; ZANETTIA, M. E.; JANGA, C. J. H.; HOLTAN, H. E.; REPETTIB, P. P.; GALBRAITH, D. W.; GIRKEA, T.; BAILEY-SERRES, J. Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n.44, p:18843-18848, 2009.

PENG, Y.; BARTLEY, L. E.; CHEN, X.; DARDICK, C.; CHERN, M.; RUAN, R.; CANLAS, P. E.; RONALD, P. C. OsWRKY62 is a negative regulator of basal and Xa21-mediated defense against *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in rice. **Molecular Plant**, v.1, n.3, p:446–458, 2008.

PENG, Y.; BARTLEY, L. E.; CANLAS, P.; RONALD, P.C. OsWRKY 11a Transcription Factors Modulate Rice Innate Immunity. **Rice**, v.3, p:36–42, 2010.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n. 9, p.2002-2007, 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.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds). Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. **Springer Press**, Heidelberg, 2001.

RYU, H.; HAN, M.; LEE, S.; CHO, J.; RYOO, N.; HEU, S.; LEE, Y.; BHOO, S. H.; WANG, G.; HAHN, T.; JEON, J. A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. **Plant Cell Reports**, v.25, p: 836–847, 2006.

SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, 374. 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual, 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2001.

SHARMA, R.; VLEESSCHAUWERA, D.; SHARMA, M. K.; RONALD, P. C. Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice. **Molecular Plant**, v.6, n.2, p:250–260, 2013.

TIANA, M.; VILLAR, D.; PÉREZ-GUIJARRO, E.; GÓMEZ-MALDONADO, L.; MOLTO, E.; FERNÁNDEZ-MIÑA, A.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L.; MONTOLIU, L.; DEL PESO, L. A role for insulator elements in the regulation of gene expression response to hypoxia. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 5, p.1916–1927, 2012.

XIE, Z.; ZHANG, Z.L.; ZOU, X.; YANG, G.; KOMATSU, S.; SHEN, Q.J. Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant Journal**, v.46, p:231–242, 2006.

XIONG, X.; JAMES, V. A.; ZHANG, H.; ALTPETER, F. Constitutive expression of the barley HWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). **Molecular Breeding**, v.25, p:419–432, 2010.

WU, X.; SHIROTO, Y.; KISHITANI, S.; ITO, Y.; TORIYAMA, K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. **Plant Cell Reports**, v.28, p:21–30, 2009.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Baños: IRRI, 1976.

ZHANG, Z.L.; XIE, Z.; ZOU, X.; CASARETTO, J.; HO T. H.; SHEN, Q.J.; A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. **Plant Physiology**, v.134, p:1500–1513, 2004.

ZHANG, X.; LI, J.; LIU, A.; ZOU, A.; ZHOU, X.; XIANG, J.; RERKSIRI, W.; PENG, Y.; XIONG, X.; CHEN, X. Expression Profile in Rice Panicle: Insights into Heat Response Mechanism at Reproductive Stage. **PLOS ONE**, v.7, n.11, 2012.

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.

ZOU, X.; NEUMAN, D.; SHEN, Q. J. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells. **Plant Physiology**, v.148, p: 176–186, 2008.

## 5- Considerações finais

Tendo em vista que a raiz é um dos principais órgãos vegetais a sofrer alterações estruturais em resposta ao estresse por hipoxia, foi observado neste trabalho que a cultivar BR IRGA 409 e a cultivar Nipponbare apresentaram um comportamento similar, onde foi possível observar um decréscimo no número de raízes e teor de matéria seca de raiz, diferentemente da cultivar Epagri 108. Em relação ao desenvolvimento de aerênquima, outro mecanismo adaptativo considerado importante sob hipoxia, a cultivar BR IRGA 409 apresentou um menor desenvolvimento de aerênquima no tratamento de 48h do que as demais cultivares estudadas.

Para o estudo de expressão relativa de genes da família *WRKY*, na parte aérea os genes de regulação complexa, intermediária e simples apresentaram maior expressão na cultivar BR IRGA 409 principalmente nos tratamentos de 24 e 48h de submersão. Apenas o gene de regulação intermediária *OsWRKY73* apresentou maior expressão na cultivar Epagri 108 no tratamento de 12h sob submersão. No tecido radicular todos os genes apresentaram maiores níveis de expressão na cultivar BR IRGA 409 principalmente no tratamento de 6h de submersão. De forma interessante, no estudo de Finatto, 2012 os genes *WRKY* estudados apresentaram elevadas expressões na cultivar Nipponbare, porém em condições de estresse por toxidez por ferro. Já, no experimento descrito, a maior expressão destes genes foi na cultivar BR IRGA 409 caracterizada por ser sensível ao estresse por toxidez por ferro, sugerindo uma sobreposição nas vias metabólicas de resposta a hipoxia e excesso de ferro.