

Alterações epigenéticas em raízes de genótipos de arroz submetidos à salinidade

JAQUELINE DA SILVA DOS SANTOS¹; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL²; CHRISLAINE YONARA SCHOENHALS RITTER²; LILIANE SILVEIRA VARNES²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹Graduanda de agronomia, bolsista PIBIC/UFPEl – silvasantos.jake@gmail.com

² PPG em Fisiologia Vegetal – Departamento de Botânica/IB-UFPEl

³ Professor Associado IV do Depto de Botânica/IB- UFPEl – jacirabraga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado em muitas partes do mundo, e utilizado como alimento básico para mais da metade da população mundial. No entanto, diversos fatores abióticos induzem estresses nas plantas afetando negativamente a produtividade da cultura, com fortes impactos sociais e econômicos. O arroz é considerado sensível ao sal, especialmente nas fases vegetativa e reprodutiva, e vários estudos relataram alterações epigenéticas em resposta ao estresse salino (PAIVA, 2018). Apesar dos recentes avanços no conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas aos estresses abióticos, há poucas informações sobre os processos de resposta epigenética, principalmente envolvendo a salinidade em arroz.

Em plantas, a metilação do DNA ocorre em todos os contextos de sequência de resíduos de citosina: CG, CHG e CHH (onde H representa A, T ou C), sendo uma marca epigenética crucial e generalizada nos genomas vegetais. A metilação de novo do DNA é mediada pela via de metilação do DNA dirigida pelo RNA (RdDM), envolvendo pequenos RNAs de interferência (siRNAs), proteínas (por exemplo, RNA POLIMERASE IV, PROTEÍNA TIPO DICER e ARGONAUTE), e enzimas METILASE REARRANJADAS DE DOMÍNIOS (DRMs), que catalisam a metilação do DNA de maneira independente da sequência. A manutenção da metilação do DNA depende do contexto da sequência da citosina e é catalisada por enzimas chamadas DNA metiltransferases. A metilação da citosina no contexto CG é mantida pela METILTRANSFERASE 1 (MET1), que é recrutada no DNA pelas proteínas VARIANTE NA METILAÇÃO, e pela DNA (citosina-5)-metiltransferase 1 (DNMT). A manutenção da metilação de CHG é catalisada por cromometilase DNA metiltransferases (CMTs), enquanto para o contexto de CHH a metilação é mantida por DRM ou CMT, dependendo da região genômica.

A desmetilação do DNA pode ser um processo passivo ou ativo. A desmetilação passiva do DNA resulta da falta de um doador do grupo metil ou da falta de atividade das enzimas metiltransferase durante a replicação do DNA, resultando na falha em manter os níveis de metilação. A desmetilação ativa é um processo mais complexo no qual um grupo 5-metil é removido por meio da ação da enzima DNA glicosilase/liase. No genoma do arroz, seis DNA glicosilases que podem excisar 5-mC em todos os contextos de sequência de citosina foram encontradas: quatro REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1a, ROS1b, ROS1c e ROS1d) e dois DEMETER-LIKE 3 (DML3a e DML3b).

Apesar de pesquisas demonstrando alterações moleculares em plantas de arroz em resposta à salinidade em diversos tecidos e estádios de desenvolvimento

pouco se sabe a respeito sobre regulação epigenética. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo investigar a expressão relativa dos genes que codificam para enzimas envolvidas no processo de metilação/desmetilação, e os níveis globais de metilação do DNA em raízes de diferentes cultivares de arroz submetidas a alta salinidade.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas quatro cultivares de arroz, sendo uma cultivar sensível (BRS 358) e uma tolerante (BRS Bojuru) à salinidade, e mais duas selecionadas devido suas altas produtividades e qualidades dos grãos (BRS Pampa CL e BRS Pampeira). As plantas foram submetidas à salinidade com 150 mM de NaCl no estágio V3 por 11 dias. Após o período de exposição ao sal foram realizadas coletas de material vegetal para análises moleculares.

O RNA total foi extraído de 0,1 g de tecido radicular usando o kit TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, EUA) e foram tratados com DNase I (Invitrogen™, Carlsbad, EUA) para eliminar qualquer traço de DNA genômico. A qualidade, quantidade e pureza do RNA total foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% e espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad™).

A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada utilizando o BioRad CFX (Hercules, EUA) e o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™, USA) que contém o fluoróforo BRYT Green® Dye. A quantificação relativa da expressão dos genes foi obtida conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001), e os genes *UBQ10* e *UBC-E2* foram utilizados como genes de referência. Para o desenho dos *primers* específicos para os genes envolvidos no processo de metilação/desmetilação foi utilizado programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), os quais foram avaliados quanto à especificidade (*melting curve*) e eficiência (1,8-2,2).

O DNA genômico total foi extraído de tecidos radiculares pelo método CTAB (Murray e Thompson, 1980) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare™). A quantificação dos níveis globais de metilação do DNA foi obtida com um ensaio baseado em ELISA usando o kit comercial 5-mC DNA ELISA Kit (Zymo Research™). O procedimento seguiu as instruções do fabricante. Aproximadamente 100 ng de DNA genômico por amostra foram imobilizados em poços com alta afinidade de DNA (placa de 96 poços) e incubados a 37 °C. O DNA metilado foi detectado usando anticorpos diluídos e reagentes otimizados com alta especificidade para 5-mC e então quantificado calorimetricamente. A absorbância foi lida em um leitor de microplaca a 450 nm (Biotek Power Wave XS™) e a porcentagem de metilação do DNA foi calculada em relação a uma curva padrão, fornecida no kit e utilizando a seguinte equação: % 5-mC = $e^{\{(absorbance - y-intercept)/slope\}}$.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), e médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R studio (RSTUDIO TEAM, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metilação de resíduos de citosina é catalisada por uma classe de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (MTases). Os diversos tipos de MTase que existem em eucariotos são conhecidos por estarem envolvidos em dois tipos

básicos de atividades de metilação: metilação de novo e a manutenção da metilação. A metilação de citosinas no DNA ainda não metilado é referida como metilação de novo. Este processo é responsável por estabelecer novos padrões de metililação. Quando um grupo metil é adicionado às citosinas de um DNA hemimetilado após a replicação do DNA, o processo é denominado metilação de manutenção. Para investigar a expressão gênica tecido-específica em cada cultivar, testamos a expressão relativa dos genes envolvidos no processo de metilação/desmetilação em condições de salinidade (Figura 1). Nas raízes, é possível observar uma grande variação na expressão dos genes nas quatro cultivares quando submetidas ao sal em comparação ao controle. Entretanto, nas raízes da cultivar sensível (BRS 358) há uma diminuição da expressão na maioria dos genes. Os genes *MET1-1*, *CMT3* e *DML3a* apresentaram reduções de expressão independente da cultivar analisada, sugerindo uma forte repressão por níveis elevados de salinidade. De maneira oposta, somente *ROS1c* teve aumento nos valores de expressão independente da cultivar analisada.

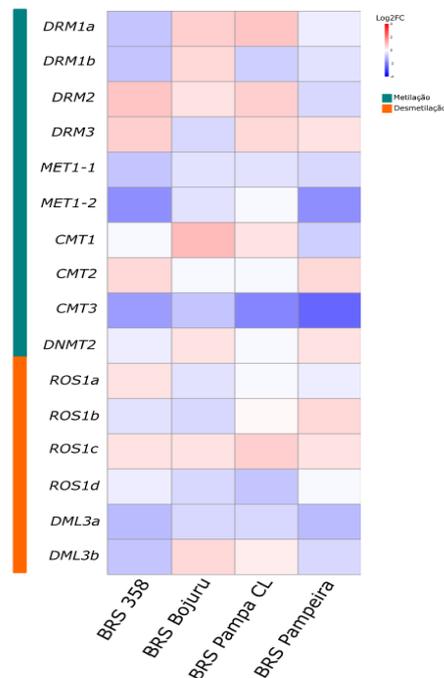


Figura 1- Expressão relativa dos genes envolvidos no processo de metilação/desmetilação em raízes de quatro cultivares de plantas de arroz em estágio V3 submetidas à salinidade (150mM), durante 11 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n = 3). Os valores estão representados por Log2 Fold Change.

A metilação do DNA é uma modificação epigenética que regula os principais processos de desenvolvimento, como por exemplo impressão genômica, expressão gênica e estabilidade dos genomas através da inativação de transposons invasores, retrotransposons e vírus, além de reposta à estresses (Colot e Rossignol, 1999). Portanto, os níveis globais de metilação do DNA foram estimados como porcentagens de citosinas metiladas nas amostras, em relação ao controle positivo metilado.

Os níveis globais de metilação do DNA em raízes (Fig. 2) na ausência de estresse foi maior somente para a cultivar BRS Pampa CL diferindo das demais. Em situações de salinidade, quando comparada as demais cultivares, BRS Pampa

CL apresenta níveis maiores de metilação somente do que BRS Bojuru, entretanto não difere das demais. Ao comparar as situações de controle e salinidade dentro de cada cultivar, somente BRS 358 apresentou diferença significativa, havendo aumento nos níveis de metilação durante a exposição ao sal.

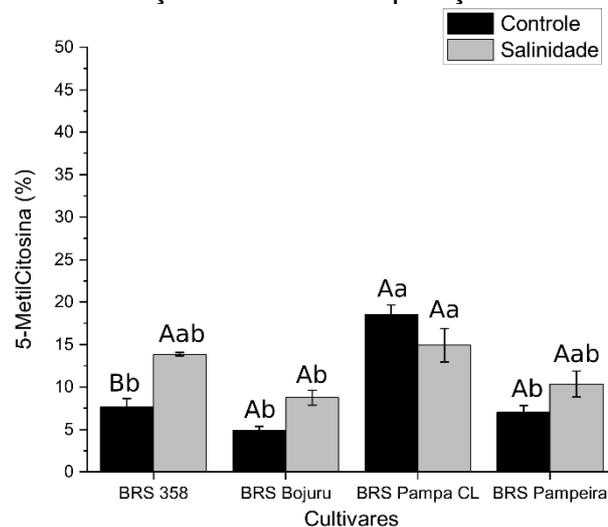


Figura 2 – Níveis globais de metilação do DNA em raízes de quatro cultivares de plantas de arroz em estágio V4 submetidas à salinidade (150mM), durante 11 dias. Os valores são representados pela média de cada tratamento \pm DP (n = 3). As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tratamentos dentro de cada cultivar, e as letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre as cultivares dentro do mesmo tratamento.

4. CONCLUSÕES

Foi observado, nos processos de metilação/desmetilação uma variação tecido específica, bem como alterações em resposta à salinidade para as quatro cultivares analisadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLOT V.; ROSSIGNOL JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. **BioEssays**. v. 21, p. 402–411, 1999.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v.25, p.402-408, 2001.

PAIVA, ANA LUIZA SOBRAL. **Caracterização funcional do gene OsGPX3 que codifica uma glutationa peroxidase mitocondrial em arroz**. 2018. TESE DE DOUTORADO. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, Inc., Boston, MA, 2015. url:<http://www.rstudio.com/>.