

EXPRESSÃO DIFERENCIAL E VARIAÇÃO ALÉLICA DE GENES ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA À SECA EM TRIGO

Jorge Fernando Pereira¹, Antonio Nhani Junior¹, Patrícia Palaoro², Márcia
Angelina Liné²

¹Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo - RS.
E-mail: jorge.pereira@embrapa.br

²Universidade de Passo Fundo, Rodovia BR 285, CEP 99052-900, Passo
Fundo - RS, Brasil.

Atualmente, quatro regiões homogêneas de adaptação para o trigo, denominadas de 1 a 4, são reconhecidas no território brasileiro apresentando peculiaridades geográficas e climatológicas entre si como, por exemplo, os níveis de precipitação pluvial e temperaturas (Scheeren et al., 2008). Os estados do sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) estão contidos principalmente nas regiões 1 (úmida e fria) e 2 (úmida e moderadamente fria) e são responsáveis por mais de 90% da produção nacional de trigo. Nas outras duas regiões de adaptação, em grande parte inseridas no bioma Cerrado, as condições são quente e moderadamente seca (região 3) e quente e seca (região 4). Nessas regiões, o trigo pode ser cultivado sob condições de sequeiro com cerca de 4 milhões de hectares disponíveis para tal prática (Mingoti et al., 2014). Entretanto, apesar do trigo de sequeiro poder aumentar significativamente a produção no Cerrado, a baixa produtividade tem sido um obstáculo para esse objetivo.

Neste contexto, é interessante explorar abordagens diferentes para atacar os elementos que restringem o aumento da produtividade do trigo de sequeiro no Cerrado. Os fatores abióticos que limitam a produção de trigo no Cerrado são a acidez do solo, o calor e a seca após a floração (Scheeren et al., 2008). A seca também pode ser importante nas fases iniciais, até à fase de perfilhamento, devido a ocorrência de períodos de seca conhecido como veranicos (Ribeiro Junior et al., 2006). Independentemente da fase de desenvolvimento, a seca é,

em condições gerais, um dos fatores mais prejudiciais para a produtividade das culturas. A resposta da planta em relação à falta de água no ambiente é considerada complexa e alterações na expressão de genes relacionados com o reconhecimento do estresse, a regulação e a sinalização ajustam o metabolismo da célula para a esta condição na tentativa de proteger a função celular. Existe variabilidade para a tolerância à seca entre os genótipos de trigo e vários loci e caracteres fisiológicos já foram relatados como importantes para o trigo cultivado em ambientes propensos à seca (Richards et al., 2010). Recentemente, nosso grupo utilizou uma técnica de sequenciamento de nova geração e identificou 4.422 genes diferencialmente expressos sob condições de seca na cultivar MGS1 Aliança, que é indicada para cultivo no Cerrado (Poersch-Bortolon et al., 2013). Assim, compreender os principais alvos a serem explorados, dentre esta grande quantidade de genes, é necessário para auxiliar programas de melhoramento a aumentar o rendimento do trigo em regiões propensas à seca. A caracterização mais detalhada destes genes tem o potencial de fornecer informações importantes para futuro uso de marcadores moleculares e/ou obtenção de plantas transgênicas.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar, em cultivares de trigo adaptadas às regiões sul e central do Brasil, a expressão e a variabilidade alélica de dez genes associados à resposta à seca. Estes genes, sendo cinco de raiz e cinco de folha, foram selecionados dentre os 4.422 transcritos previamente identificados na cultivar MGS1 Aliança.

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de RT-PCR quantitativo utilizando-se tecido foliar e radicular das cultivares BR 18-Terena, MGS1 Aliança e MGS3 Brilhante. As mesmas foram cultivadas em casa de vegetação em baldes de 6,5 kg, com cinco plantas por balde, contendo mistura de solo, areia e vermiculita (1:1:1). As plantas foram irrigadas a cada 2-3 dias sendo realizados três tratamentos: controle, onde as plantas foram cultivadas a 90% da capacidade de campo; seca no perfilhamento, onde as plantas foram cultivadas por duas semanas a 90% da capacidade de campo seguido de três semanas sem irrigação; e seca no espigamento, onde as plantas foram cultivadas a 90% da capacidade de campo e, no momento do surgimento da

primeira espiga, a irrigação foi suspensa por duas semanas. O conteúdo relativo de água nas folhas das plantas controle foi de aproximadamente 98% enquanto, na seca, variou de 51 a 62%. Os tecidos radiculares e foliares foram coletados, o RNA total foi extraído e, após a síntese do cDNA, as reações de amplificação foram conduzidas no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) com software v2.0.6. Dez genes foram avaliados (Tabela 1) sendo a expressão destes genes comparada com a expressão de uma ATPase (Paolacci et al., 2009). Os mesmos primers utilizados para a análise de expressão também foram utilizados para amplificação do DNA total e subsequente sequenciamento dos amplicons cujos tamanhos variavam de 85 a 219 pb. Para este experimento, além das três cultivares anteriormente citadas, também foram avaliadas as cultivares BRS Umbu, BR 23 e BRS 177. Para tanto, os fragmentos de PCR foram diretamente sequenciados com uso do Kit Big Dye Terminator versão 3.1 e do sequenciador ABI 3130 Sequence Analyzer. As sequências foram analisadas no software Sequencing Analysis versão 5.1.1.

O sequenciamento revelou polimorfismos de base única (SNPs) nos genes das diferentes cultivares que são recomendadas para diferentes regiões homogêneas de adaptação (regiões 1 e 2 para BRS Umbu, BR 23 e BRS 177 e região 4 para BR 18-Terena, MGS1 Aliança e MGS3 Brilhante). Entretanto, os polimorfismos encontrados não puderam ser correlacionados com as regiões de adaptação (fria e úmida ou quente e seca) indicadas para o cultivo dos materiais. Mesmo assim, todos os genes analisados apresentaram expressão estatisticamente superior em condições de estresse por seca indicando sua importância para a resposta celular associada ao estresse hídrico. A importância dos genes foi confirmada em dois estádios de desenvolvimento (perfilhamento e espigamento) da cultivar MGS1 Aliança. Os genes também se mostraram diferencialmente expressos em todas as cultivares avaliadas, uma vez que a expressão em condições de estresse foi superior em relação às condições controle mas, neste caso, a avaliação foi realizada apenas no perfilhamento. O perfil da expressão durante o perfilhamento, de quatro genes dos dez genes avaliados, é apresentado na Figura 1.

Em conclusão, apesar das variações nas sequências dos genes não poderem ser utilizadas como marcadores associados às diferentes regiões de adaptação, os genes analisados são importantes para a resposta à seca em trigo. Esta importância foi confirmada tanto em diferentes fases de desenvolvimento como em diferentes cultivares. Uma maior compreensão das rotas metabólicas associadas à tolerância à seca pode melhor embasar as escolhas feitas em programas de melhoramento que objetivam obter cultivares melhor adaptadas à seca. Além disso, uma vez clonados, os genes aqui avaliados podem ser utilizados para futura obtenção de plantas transgênicas de trigo potencialmente mais tolerantes à seca.

Referências bibliográficas

- POERSCH-BORTOLON LB, PEREIRA JF, NHANI JUNIOR A, et al. (2013) **Transcriptome analysis of wheat under drought**. Anais do IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Bento Gonçalves, RS.
- PAOLACCI AR, TANZARELLA OA, PORCEDDU E, et al. (2009) **Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat**. BMC Molecular Biology 10:11.
- RIBEIRO JUNIOR WQ, RAMOS MLG, VASCONCELOS U, et al. (2006) **Fenotipagem para tolerância à seca visando o melhoramento genético do trigo no cerrado**. Embrapa Trigo, Circular Técnica Online 27, 17 p.
- RICHARDS RA, REBETZKE GJ, WATT M, et al. (2010). **Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment**. Functional Plant Biology 37:85-97.
- SCHEEREN PL, CAIERÃO E, SILVA MS, et al. (2008) **Challenges to wheat production in Brazil**. In: REYNOLDS MP, PIETRAGALLA J, BRAUN HJ (Eds) International symposium on wheat yield potential: challenges to international wheat breeding. Mexico, D.F.: CIMMYT, pp 167-170.

Tabela 1. Genes analisados neste trabalho.

Tecido	Identificação do gene	Função
Raiz	R13	Fator de transcrição (LEA)
Raiz	R22	Desconhecida
Raiz	R24	Processo de síntese de prolina
Raiz	R28	Resposta ao estresse oxidativo
Raiz	R34	Desconhecida
Folha	L1	Desconhecida
Folha	L10	Fator de transcrição (LEA)
Folha	L15	Fosfatase envolvida na sinalização do ácido abscísico
Folha	L16	Desconhecida
Folha	L25	Processo de síntese de prolina

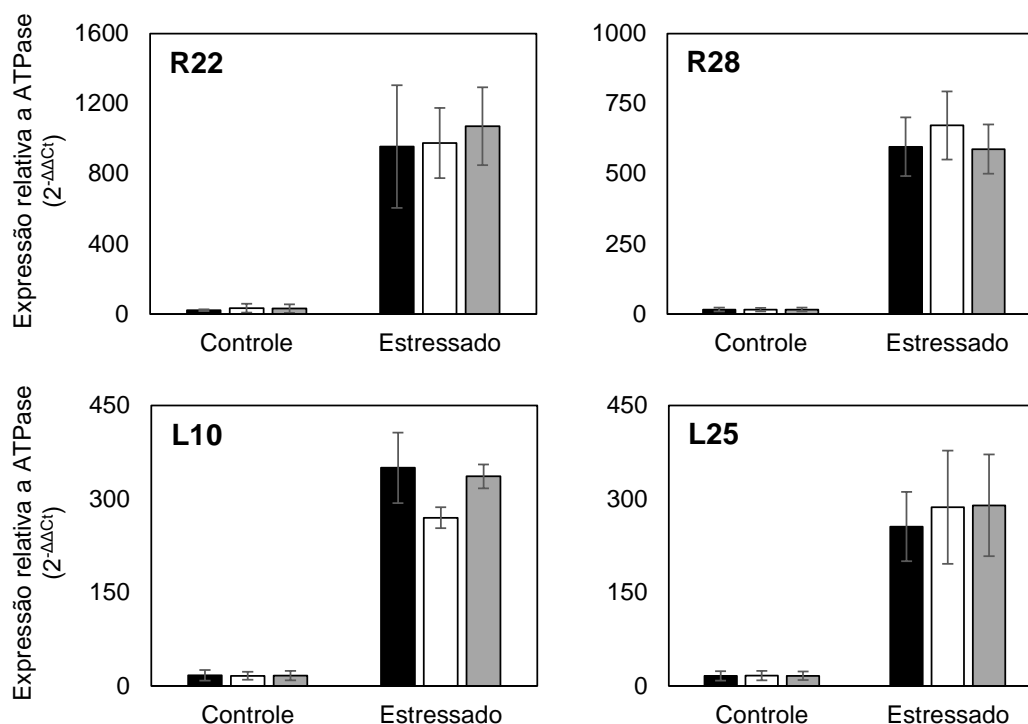


Figura 1. Análise da expressão de genes associados com a resposta à seca em trigo. As amplificações por RT-PCR quantitativo foram realizadas com duplicata biológica e triplicata técnica. A expressão relativa foi calculada pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Barras pretas, brancas e cinzas representam a expressão dos genes nas cultivares BR 18-Terena, MGS1 Aliança e MGS3 Brilhante, respectivamente. R22, R28, L10 e L25 referem-se à identificação dos genes conforme a Tabela 1.