

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Dissertação

**Regulação Transcricional e Epigenética de *ERFs* em Arroz
Sob Estresse Abiótico**

Railson Schreinert dos Santos

Pelotas, 2012

RAILSON SCHREINERT DOS SANTOS
Engenheiro Agrônomo

**Regulação Transcricional e Epigenética de *ERFs* em
Arroz Sob Estresse Abiótico**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências
(área do conhecimento:
Biotecnologia).

Orientador: Antonio Costa de Oliveira, Ph D.
Co-Orientadores: Cesar Valmor Rombaldi, Ph D.
Luciano Carlos da Maia, Dr.

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S237r Santos, Railson Schreinert dos

Regulação transcricional e epigenética de ERFs em arroz sob estresse abiótico / Railson Schreinert dos Santos ; orientador Antonio Costa de Oliveira; co-orientador Cesar Valmor Rombaldi e Luciano Carlos da Maia - Pelotas, 2012.- 98f. : il..- Dissertação (Mestrado).área de conhecimento em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Metilação 2.Estresse Abiótico 3.qPCR 4.Promotores
I.Oliveira, Antonio Costa de(orientador) II.Título.

CDD 633.18

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Costa de Oliveira (Orientador) – DF/ UFPEL

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi (Co-Orientador) – DCTA/ UFPEL

Prof. Dr. Luciano Carlos da Maia (Co-Orientador) – DF/ UFPEL

Prof^a. Dr^a. Caroline Marques Castro – EMBRAPA

Dedico à minha mãe, Vera Lúcia Schreinert, ao meu pai, Luiz Adilson dos Santos e a minha irmã Ivaneli Schreinert dos Santos.

Agradecimentos

Agradeço...

A DEUS que sempre permitiu que boas pessoas participassem da minha vida e me iluminou, mesmo quando não sabia que caminho seguir.

À Camila Pegoraro e Mariana Madruga Krüger, grandes amigas e colegas que me ajudaram muito em todas as etapas dos experimentos aqui descritos.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, que permitiu a realização deste trabalho, e à Capes pela concessão da bolsa de estudo.

À todos os colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, os quais me auxiliaram a dar os primeiros passos nessa área e, certamente, são responsáveis por parte deste trabalho.

Aos Professores Antonio Costa de Oliveira, Cesar Valmor Rombaldi e Luciano Carlos da Maia, pela amizade e orientação nessa caminhada até aqui.

À Professora Caroline Marques Castro pela participação na minha banca de defesa.

Aos amigos de dentro e fora do CGF, que estiveram presentes na minha vida e me deram motivos para continuar.

Acima de tudo, aos meus pais Luiz Adilson dos Santos e Vera Lucia Schreinert, à minha irmã Ivaneli Schreinert dos Santos e toda minha família, os quais sempre foram uma fonte incondicional de carinho e apoio e que merecem muito mais do que eu jamais serei capaz de oferecer.

Meu muito obrigado.

Resumo

SANTOS, Railson Schreinert dos. **Regulação Transcricional e Epigenética de *ERFs* em Arroz Sob Estresse Abiótico**. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes no mundo, sendo muito cultivado em ecossistemas de várzea, os quais apresentam uma característica comum: condições de deficiência de drenagem. A falta de oxigênio, devido à submergência das plântulas, e a toxidez por excesso de ferro são dois dos maiores estresses abióticos dentre os quais as plantas de arroz são submetidas. Recentemente percebeu-se a importância de alguns fatores de transcrição responsivos ao etileno (*ERFs*) na resposta vegetal à diferentes estresses, em especial à deficiência de oxigênio. Considerando-se o exposto efetuaram-se basicamente dois estudos visando avaliar a expressão de *ERFs* em diferentes estresses. Em um primeiro estudo sete genes foram selecionados a partir de resultados anteriores obtidos de análise no *Genevestigator* e estes tiveram sua expressão transcricional avaliada por PCR quantitativa (*qPCR*) em plântulas de arroz sob deficiência de oxigênio e excesso de ferro. No segundo estudo treze *ERFs*, os quais não apresentavam informações disponíveis na literatura, também tiveram seus níveis de expressão transcricional avaliados em plântulas sob condições de estresse por hipoxia e anoxia, também através de *qPCR* em uma cv. sensível à inundação (Bonança) e uma tolerante (Nipponbare). Como conclusões gerais se ressalta, novamente, a importância dos *ERFs* na resposta vegetal frente a estresses ambientais. A função específica de cada um destes genes ainda necessita ser estudada. Uma análise *in silico* nos promotores destes genes indica a metilação como possível forma de regulação transcricional. Mais estudos sobre a função destes *ERFs* e sobre o papel da metilação na resposta de arroz a estresses deverão ser feitas.

Palavras-chave: Metilação. Estresse Abiótico. *qPCR*. Promotores.

Abstract

SANTOS, Railson Schreinert dos. **Transcriptional and Epigenetic Regulation of *ERFs* in Rice Under Abiotic Stress**. 2012. 98s. Dissertation (Master Degree in Biotechnology). Federal University of Pelotas.

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important cereals in the world being cultivated in lowland ecosystems, which have a common characteristic: lack of drainage conditions. The lack of oxygen, due to submergence of seedlings, and iron toxicity are two of the major abiotic stresses which rice plants are subjected. Recently it was realized the importance of some ethylene responsive transcription factors (*ERFs*) in plant response to different stresses, especially to oxygen depletion. Considering it, two studies were made in order to evaluate the expression of *ERFs* under different stresses. In a first study seven genes were selected, based on previous results obtained from *Genevestigator* analysis, and had their transcriptional expression evaluated through quantitative PCR (qPCR) in rice seedlings under oxygen depletion and iron overload. In the second study thirteen *ERFs*, which had no information available in the literature, also had their transcriptional levels evaluated in seedlings under conditions of hypoxia and anoxia through qPCR in a cultivar susceptible to flooding (Bonança) and a tolerant one (Nipponbare). As general conclusions it was once more emphasized the importance of *ERF* genes on plant response to environmental stresses. The specific function of each of these genes is yet to be studied. *In silico* analysis suggests the methylation of promoters as a possible way to regulate them. More studies about the function of these *ERFs* and about the role of methylation in plant stress response should be done.

Keywords: Methylation. Abiotic Stress. qPCR. Promoters.

Lista de Figuras

- Figura 1 Via de biossíntese do etileno. Adaptado de Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008..... 26
- Figura 2 Sinalização do etileno, adaptado de Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008. O etileno é percebido por ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4. Na ausência do hormônio, os receptores agem como reguladores negativos do etileno, através da ativação da quinase CTR1 regularia negativamente a cascata da MAPK, a qual regula positivamente a sinalização do etileno. A cascata MAPKativa EIN2. As EIN3 e as EILs entram em ação. EBF1 e EBF2 mediam a quebra das EIN3. A expressão de EBF1/2 é regulada uma exorribonuclease, a EIN5. A expressão de EIN5 é aumentada pelo etileno e, sua proteína correspondente, provavelmente atua na sinalização de etileno pela degradação do mRNA de EBF1/2. Dímeros EIN3 estão aptos a se ligarem ao elemento de resposta primária ao etileno (*PERE*) no promotor da ERF1. ERF1 é parte da família de genes EREBP e estão aptos a se ligarem ao elemento de resposta secundária ao etileno (*SERE*), uma *GCC box*, na região promotora de genes regulados por etileno e, assim, controlando a sua expressão. 28
- Figura 3 Desenho da placa utilizada para a *qPCR*: T: número do tratamento (1 = controle 0h); P: número do *primer* (N = normalizador/GAPDH). 44
- Figura 4 Expressão transcricional em folhas de plântulas de arroz submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio - Gráfico *heat map* construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por PCR em tempo real. 49
- Figura 5 Expressão transcricional em folhas de plântulas de arroz submetidas ao estresse por excesso de ferro (2.000 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) -

	Gráfico <i>heat map</i> construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por <i>qPCR</i>	50
Figura 6	Filograma construído a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos referidos genes.	52
Figura 7	Nível de expressão dos sete <i>ERFs</i> estudados no primeiro experimento em diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento no <i>Genevestigator</i>	53
Figura 8	Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos <i>ERFs</i> em estudo.	56
Figura 9	Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos domínios dos <i>ERFs</i> em estudo.	56
Figura 10	Filograma construído a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios dos referidos genes.	56
Figura 11	Filograma construído a partir do alinhamento dos nucleotídeos da região promotora de cada gene (-1500 a +100 pbs).	57
Figura 12	Análise de motivos conservados na região promotora (-1.500 a +100 pbs) para o grupo de três genes fortemente reprimidos em deficiência de oxigênio.	58
Figura 13	Análise de motivos conservados na região promotora (-1.500 a +100 pbs) para o grupo de quatro genes pouco regulados ou induzidos em deficiência de oxigênio.	58
Figura 14	Análise de motivos conservados na região promotora (-1.500 a +100 pbs) para o grupo de sete genes estudados no Capítulo 2. .	59
Figura 15	Filograma construído a partir de análise do alinhamento dos nucleotídeos da região promotora de cada gene (-500 a +100 pbs).	59

Figura 16	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os08g36920 (AK062882)</i>	63
Figura 17	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os03g08490 (AK106987)</i>	63
Figura 18	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os09g28440 (AK067195)</i>	64
Figura 19	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os09g13940 (AK100575)</i>	64
Figura 20	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os03g22170 (AK111414)</i>	65
Figura 21	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os09g11480 (AK106057)</i>	65
Figura 22	Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene <i>LOC_Os04g46400 (AK107119)</i>	66
Figura 23	Análise a expressão transcricional dos cinco genes modificadores da cromatina em plântulas de arroz germinadas em condições de aero e anaerobiose.	70
Figura 24	Análise a expressão transcricional dos cinco genes modificadores da cromatina em plântulas de arroz germinadas em condições de aero e anaerobiose, as quais, neste caso, têm semelhante tempo de vida.....	71
Figura 25	Expressão transcricional em folhas de plântulas da cv. Nipponbare submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio - Gráfico <i>heat map</i> construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por PCR em tempo real.....	73
Figura 26	Expressão transcricional em folhas de plântulas da cv. Bonança submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio - Gráfico <i>heat</i>	

map construído com base nos valores de quantificação relativa
obtidos a partir da análise por PCR em tempo real..... 76

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados no experimento 1, os quais foram desenhados a partir das sequências obtidas do <i>RAP-DB</i> , pelo programa <i>Vector NTI Advance</i> TM 11.	42
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados no experimento 2, os quais foram desenhados a partir das sequências obtidas do <i>RAP-DB</i> , pelo programa <i>Vector NTI Advance</i> TM 11.	43
Tabela 3	Interpretação da coloração dos resíduos de aminoácidos nos alinhamentos de proteínas, de acordo com o <i>ClustalW</i> versão 2.0.	45
Tabela 4	Sete genes <i>ERFs</i> que apresentaram perfil de expressão diferenciado no <i>Genevestigator</i> (www.genevestigator.ethz.ch) e que foram, então, selecionados para análise por <i>qPCR</i>	48
Tabela 5	Interpretação da forma de expressão dos diferentes genes em estudo: + : significa indução; - : significa supressão; +/- : significa comportamento variável.	51
Tabela 6	Análise de ilhas CpG/CpNpG na região promotora (-1.500 a +100 pbs) dos sete genes estudados no Capítulo 2	61
Tabela 7	Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos três genes fortemente reprimidos em deficiência de hipoxia, utilizando a região de -1.500 a +100 pbs do gene. Sítios comuns aos genes reprimidos, mas não comum aos sete genes analisados como um todo são marcados por *.	67
Tabela 8	Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos sete genes avaliados no estudo, utilizando a região de -1.500 a +100 pbs do gene.	67
Tabela 9	Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos quatro genes com expressão variável ou altamente expresso em deficiência de hipoxia, utilizando a região de -1.500 a +100 pbs do gene.	68

Tabela 10	Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos três genes fortemente reprimidos em deficiência de hipoxia, utilizando a região de -500 a +100 pbs do gene.	68
Tabela 11	Cinco genes anotados como possíveis modificadores da cromatina e que têm perfil de expressão disponível no <i>Genevestigator</i>	69
Tabela 12	Os treze genes de <i>ERFs</i> selecionados, os quais não apresentam expressão nos bancos de dados do <i>Genevestigator</i> (http://www.genevestigator.ethz.ch).	72

Lista de Abreviaturas

ABA	- Ácido Abscísico
ACC	- Ácido 1-Aminociclopropano-1-Carboxílico
ADH	- ÁLCOOL DESIDROGENASE
<i>Amplicon</i>	- Produto da amplificação in vitro de um fragmento de DNA
PDC	- PIRUVATO DECARBOXILASE
CDS	- Região codificadora, do inglês <i>Coding Sequence</i>
cDNA	- DNA complementar, do inglês <i>complementary DNA</i>
°C	- Graus Celsius
CGF	- Centro de Genômica e Fitomelhoramento.
CT	- Limiar de detecção, do inglês <i>Cycle Threshold</i>
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico.
DNAse	- Desoxirribonuclease que catalisa a degradação do DNA em pequenos compostos.
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<i>EMBL</i>	- Laboratório de Biologia Molecular Europeu, do inglês <i>European Molecular Biology Laboratory</i> .
<i>ERF</i>	- Fatores Responsivos ao Etileno, do inglês <i>Ethylene Response Factors</i>
FAEM	- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.
<i>FL-cDNA</i>	- Sequência de cDNA completa, do inglês <i>Full Length cDNA</i>
GAPDH	- GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE
<i>MEME</i>	- <i>Multiple Em for Motif Elicitation</i>
<i>MeV</i>	- <i>Multi Experiment Viewer</i>
min	- Minutos
µL	- Microlitros
mL	- Mililitros
mM	- Milimolar
mRNA	- RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>

<i>NCBI</i>	- Centro Nacional e Informação em Biotecnologia, do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NJ</i>	- <i>Neighbor-Joining</i>
<i>PAM</i>	- <i>Point Accepted Mutation</i>
pb	- Pares de base
<i>PCR</i>	- Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> .
<i>qPCR</i>	- Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa, do inglês <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .
<i>Pfam</i>	- <i>Protein Families Database</i>
<i>PlantPAN</i>	- <i>Plant Promoter Analysis Navigator</i>
<i>Primers</i>	- Iniciadores para reação de PCR
<i>RAP-DB</i>	Bando de Dados do Projeto de Anotação do Genoma do Arroz do inglês <i>The Rice Annotation Project Database</i>
QR	- Quantificação Relativa
RNA	- Ácido Ribonucleico
RNase	- Ribonuclease que catalisa a degradação do RNA em pequenos compostos.
RNase OUT TM	- Inibidor recombinante da RNase
<i>ROS</i>	- Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
<i>RT</i>	- Transcriptase Reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase</i>
s	- Segundos
<i>TIGR</i>	- Banco de Dados e Recursos da Universidade de Michigan, do inglês <i>The MSU Rice Genome Annotation Project Database and Resource</i>
UV	- Ultra-Violeta
x g	- Aceleração da gravidade

Sumário

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
Sumário	xvi
1 Introdução	18
2 Objetivos	20
2.1 Hipóteses	20
2.1.1 Experimento I - <i>Ethylene Response Factors</i> – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro	20
2.1.2 Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsivos ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro	20
2.2 Objetivos Gerais	20
2.3 Objetivos Específicos	21
2.3.1 Experimento I - <i>Ethylene Response Factors</i> – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro	21
2.3.2 Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsivos ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro	21
3 Revisão da Literatura	22
3.1 A História e a Importância Científica e Econômica do Arroz	22
3.1.1 Origem e Evolução do Arroz	22
3.1.2 O Papel do Arroz Como Espécie Modelo	22
3.1.3 O Arroz no Planeta	23
3.2 O Estresse Vegetal	23
3.3 Etileno, Crescimento e Desenvolvimento Vegetal	24
3.3.1 Etileno: Síntese e Sinalização	25

3.3.2	O Estresse e a Síntese de Etileno	29
3.4	Estresse Por Deficiência de Oxigênio e o Arroz	31
3.5	O Estresse Devido à Toxidez Por Ferro e o Arroz	32
3.5.1	A Importância da Regulação Gênica na Adaptação Vegetal ao Estresse e o Especial Interesse por <i>ERFs</i> em Condições de Deficiência de Oxigênio	32
3.6	O Estresse e as Modificações Epigenéticas	35
4	Material e Métodos.....	38
4.1	Descrição Geral dos Experimentos.....	38
4.2	Material Vegetal	38
4.2.1	Deficiência de Oxigênio	38
4.2.2	Toxidez por Ferro	39
4.3	Quantificação da Expressão Transcricional	40
4.3.1	Extração de RNA	40
4.3.2	Síntese do cDNA	41
4.3.3	Desenho dos Primers para <i>qPCR</i>	41
4.3.4	Quantificação Relativa por <i>qPCR</i>	44
4.4	Análise da Expressão Transcricional Pelo <i>Genevestigator</i>	45
4.5	Análise da Similaridade de Proteínas pelo Alinhamento de Aminoácidos	45
4.6	Análise dos Promotores dos Genes.....	45
4.6.1	Alinhamento de Promotores	46
4.6.2	Identificação de Motivos Conservados nos Promotores	46
4.6.3	Investigação da Ocorrência Sítios de Ligação para Fatores de Transcrição e Ilhas CpG/CpNpG.....	46
5	Resultados e Discussão.....	48
5.1	Experimento I - <i>Ethylene Response Factors</i> – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro 48	
5.1.1	Deficiência de Oxigênio - Comparação Anoxia x Hipoxia.....	48
5.1.2	Estresse por Ferro	50
5.1.3	Toxidez de Ferro x Deficiência de Oxigênio	50
5.1.4	Estudo da similaridade das <i>CDSs</i> e de promotores nos sete <i>ERFs</i> em estudo	51

5.1.5	Análise da expressão transcricional de genes modificadores da cromatina pelo <i>Genevestigator</i>	69
5.2	Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsáveis ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro.....	71
6	Conclusões	78
6.1	Conclusões Específicas	78
6.1.1	Experimento I - <i>Ethylene Response Factors</i> – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro.....	78
6.1.2	Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsáveis ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro	78
7	Perspectivas.....	80
	Referências Bibliográficas	81

1 Introdução

Os estresses bióticos e abióticos são grandes responsáveis pela limitação da produtividade e da qualidade da produção agrícola. Dentro deste aspecto sabe-se que o arroz sofre com diversos estresses, entre eles a possibilidade de estresse por submergência das plantas em seus estádios iniciais. Além disso, devido ao seu modo de cultivo, outro estresse comum é o de toxidez por ferro, o qual pode reduzir a produtividade da cultura.

A identificação de genes responsivos a diferentes estresses bióticos e abióticos é fundamental para a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas. Uma rede regulatória complexa está envolvida na indução de genes em resposta a estresses. Dentre os genes que estão relacionados à resposta e tolerância a estresses ambientais, destacam-se os genes pertencentes a família *ERF* (*Ethylene Response Factors*).

Os *ERFs* são fatores de transcrição que contêm um domínio de ligação o qual tem mostrado ligar-se especificamente às regiões *GCC box* presentes em promotores de diversos genes de resposta ao etileno para, assim, modular sua transcrição. Atualmente uma larga variedade de estudos têm sido realizados relacionando *ERFs* com a tolerância a diferentes estresses ambientais. Estes estudos costumam ainda considerar a importância da regulação transcricional destes em resposta aos estresses.

Um estudo computacional em bancos de dados prevendo 137 *ERFs* foi realizado em arroz, entretanto muitos destes genes carecem de informação e novos estudos visando encontrar uma possível relação destes genes com os referidos estresses devem se realizados (Nakano et al., 2006).

A importância de estudos sobre o papel específico de cada *ERF* na ativação de genes e consequente resposta fenotípica das plantas a determinadas condições também deve ser melhor estudada. O estudo computacional das sequências de *ERFs*, realizado por estes autores, visou também facilitar o estudo destas funções, o que denota a importância de estudos de bioinformática na orientação de pesquisas futuras.

Além disso, tem-se dado importância ao estudo destes fatores de transcrição na comparação entre diferentes genótipos sob condições de estresse (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). Sabendo-se da importância da comparação da regulação transcricional entre cultivares com diferentes capacidades de tolerância a condições adversas (GAO et al., 2009), espera-se que estudos mais aprofundados possam resultar em informações interessantes sobre genes que, por ter uma regulação diferenciada, confirmem maior capacidade adaptativa.

2 Objetivos

2.1 Hipóteses

2.1.1 Experimento I - *Ethylene Response Factors* – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro

ERFs podem ter regulação transcricional similar em plantas sob estresse por hipoxia e toxidez por ferro.

2.1.2 Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsivos ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro

Cultivares de arroz com diferentes níveis de tolerância à submergência possivelmente tenham seus *ERFs* regulados de forma diferente, e tal diferença pode ter relação adaptativa com o estresse em questão.

2.2 Objetivos Gerais

Considerando-se o que foi exposto, este trabalho teve como objetivos:

Comparar a expressão de *ERFs* em dois estresses: deficiência de oxigênio e excesso de ferro.

Buscar informações sobre fatores que possivelmente influenciem a transcrição de *ERFs* através do uso de ferramentas *in silico*.

Buscar informações sobre a possível função das proteínas codificadas pelos genes analisados também através do uso de ferramentas *in silico*.

Comparar a similaridade de expressão de *ERFs*, os quais não têm nenhum perfil de expressão disponível na literatura, em duas diferentes cultivares de arroz com diferentes níveis de sensibilidade ao encharcamento.

2.3 Objetivos Específicos

2.3.1 Experimento I - *Ethylene Response Factors* – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro

Avaliar o padrão de similaridade de expressão de sete *ERFs*, em estresse por anoxia, hipoxia e toxidez por ferro, através do uso de PCR quantitativa (*qPCR*).

Comparar regiões promotoras dos *ERFs* que tiveram expressão transcricional analisada por *qPCR* em deficiência de oxigênio e toxidez por ferro, procurando motivos específicos em grupos de genes de expressão semelhante. Tais motivos podem determinar modificações epigenéticas ou possibilitar ligação de fatores de transcrição, os quais têm efeito nos níveis de transcrição gênica.

Comparar a região codificadora de proteínas *ERFs* por alinhamentos, buscando informações sobre suas funções.

2.3.2 Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsáveis ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro

Avaliar, por *qPCR*, o nível de transcritos de treze genes *ERFs*, os quais não possuem perfil de expressão disponível nos bancos de dados do *Genevestigator*.

Identificar genes possivelmente envolvidos com a tolerância diferencial de duas diferentes cultivares de arroz sob encharcamento.

3 Revisão da Literatura

3.1 A História e a Importância Científica e Econômica do Arroz

3.1.1 Origem e Evolução do Arroz

Diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia, mais precisamente a região compreendida entre a Índia e Mianmar (antiga Birmânia), em virtude da grande diversidade de formas cultivadas de arroz ali encontradas (GRIST, 1978; PEREIRA, 2002), como seu centro de origem, sendo que duas formas silvestres são apontadas como precursoras do arroz cultivado. A espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, originou o *Oryza sativa* L. enquanto o *Oryza barthii*, A. Chev., derivado da África Ocidental, originou o *Oryza glaberrima* Steud. (EMBRAPA, 2010).

3.1.2 O Papel do Arroz Como Espécie Modelo

Três subespécies de *O. sativa* estão descritas atualmente, sendo *indica* e *japonica* as mais cultivadas, seguidas pela terceira subespécie conhecida como *javanica* ou *japonica tropical* (LONDO et al., 2006).

O arroz (*O. sativa*) subsp. *japonica* cv. Nipponbare teve seu genoma completamente sequenciado no ano de 2005 por instituições internacionais que constituíram o *Projeto Internacional de Sequenciamento do Genoma do Arroz* (IRGSP- *International Rice Genome Sequencing Project*).

Tendo protocolos de transformação genética relativamente eficientes, mapas genéticos e físicos de alta densidade e alto grau de sintonia com outros cereais, o arroz, o qual tem um pequeno genoma de aproximadamente 390 Mb, é, atualmente, considerado o organismo modelo para gramíneas (plantas da família Poaceae) as quais tem genomas geralmente maiores, como é o caso do milho (*Zea mays* L.) (2.500 Mb), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (5.500 Mb) e trigo (*Triticum* spp.) (16.000 Mb).

3.1.3 O Arroz no Planeta

O arroz é um cereal de grande importância para mais da metade da população mundial. Na última década, tanto o consumo como a produção de arroz aumentaram de forma bastante significativa, e, em 2010/2011, estima-se que 451,58 milhões de toneladas tenham sido produzidas em todo o mundo (IRGA, 2011).

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz e sua produção é oriunda de dois sistemas de cultivo: irrigado e de sequeiro. Os solos cultivados com arroz irrigado na Região Subtropical do Brasil, mais especificamente nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC), são encontrados, principalmente, nos ecossistemas de várzea, apresentando uma característica comum: condições de deficiência de drenagem (planossolos e gleissolos). Os solos de várzea podem ser considerados favoráveis para o cultivo do arroz irrigado por reduzir as perdas de água e de nutrientes (EMBRAPA, 2005).

Mais de 30% da área de arroz asiático e 40% da área de arroz africano são produzidos também em locais inundados, mas a falta de controle sobre o nível da água pode levar a problemas como a submersão temporária das plântulas (VOESENEK; BAILEY-SERRES, 2009) onde a água pode chegar a 50 cm de altura, um fenômeno conhecido por *flash flood* (CATLING, 1992).

Ainda, em virtude da inundação do solo, como requer o sistema, os teores de ferro (Fe^{2+}), provenientes de material de origem rico no mineral (BRASIL, 1973), frequentemente se elevam na solução do solo alcançando níveis potencialmente tóxicos (BECANA et al., 1998).

3.2 O Estresse Vegetal

Dentre os estresses aos quais as plantas sofrem encontram-se os estresses bióticos, causados por organismos vivos, e os abióticos, os quais são definidos por condições ambientais adversas. Entre os estresses abióticos mais estudados, estão: a exposição à radiação ultra-violeta (UV), a temperaturas extremas, variações hídricas e salinas, reduções das taxas de oxigênio bem como

a exposição à níveis tóxicos de determinados nutrientes. Para se adaptar a tais estresses as plântulas empregam diferentes estratégias, entre elas a modificação na síntese de hormônios (ENGELBERTH; ENGELBERTH, 2009).

3.3 Etileno, Crescimento e Desenvolvimento Vegetal

O etileno (C_2H_4), o mais simples alceno (hidrocarboneto insaturado, com fórmula C_nH_{2n}) existente, atua como um fitohormônio gasoso. Apesar de já ter sido reportado anteriormente por Girardin (1864) e Crocker; Knight (1908), que plantas cultivadas próximas a lâmpadas a gás apresentavam sintomas de injúria, considera-se que a molécula responsável por estas modificações, só tenha sido descoberta como um fitormônio em 1901, pelo russo Dimitry Neljubov, a partir da observação de plântulas de ervilha as quais também apresentavam modificações anatômicas ao serem cultivadas no escuro em presença de um gás do carvão do ambiente de laboratório (CHAVES; MELLO-FARIAS, 2006; McMANUS; GRIERSON, 2012).

Os efeitos do etileno podem ser transitórios, ou de longa duração, sendo importante destacar, ainda, que esse hormônio pode também controlar sua própria regulação, de forma não totalmente esclarecida (TANG et al., 2008), por autoinibição ou autocatálise. A autocatálise da produção de etileno é algo comum, por exemplo, em frutas em processo de amadurecimento e senescência (YANG; HOFFMAN, 1984), já a autoinibição foi descrita, por exemplo, em orquídeas polinizadas (BUI; O'NEILL, 1998), em abóboras (NAKAJIMA et al., 1990), assim como em *Arabidopsis thaliana* (HARPHAM et al., 1996).

O etileno, diferentemente do que se pensava anteriormente, atua ainda regulando diversos processos relacionados ao ciclo vegetativo das plantas, sendo que sua ação varia de espécie para espécie (KONINGS; JACKSON, 1979). Dentro desse aspecto, modificações, como a repressão do crescimento radicular, já haviam sido descritas em 1901, por Neljubov. Entretanto, outras modificações causadas pelo etileno, podem ser citadas, como a repressão do crescimento caulinar e de folhas (KIEBER et al., 1993), além do estímulo à emergência destas

(SMALLE et al., 1997-a). Além disso, assumindo um duplo papel, o etileno pode tanto aumentar o tamanho do caule (VANDENBUSSCHE et al., 2003; PIERIK et al., 2004), como modificar a orientação das folhas, em *arabidopsis* (MILLENAAR et al., 2005; VANDENBUSSCHE et al., 2005), permitindo que a planta evite o sombreamento e, consequentemente, otimize as condições fotossintéticas.

Com relação à emergência, o etileno age também na formação e determinação da intensidade da curvatura apical das plântulas, a qual é necessária para evitar o estresse mecânico durante as etapas iniciais do crescimento vegetal (VANDENBUSSCHE; VAN DER STRAETEN, 2004).

Em dicotiledôneas, o etileno exerce um duplo papel na regulação do tamanho do hipocótilo. Em plântulas cultivadas no escuro, como uma das características obtidas na já citada *tríplice resposta* das plantas ao etileno, ocorre uma repressão do crescimento (GUZMAN; ECKER, 1990). Já, sob luz, a adição de uma pequena quantidade de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), o qual é precursor do etileno, em meio com poucos nutrientes, pode promover o estímulo do crescimento das plântulas (SMALLE et al., 1997-b).

A concentração de etileno presente no ambiente também influencia as respostas de determinados genes, sendo que alguns destes se expressam sob ação de altas concentrações, enquanto outros se expressam sob influência de menores concentrações de etileno (DE PAEPE et al., 2004-a; DE PAEPE et al., 2004-b).

Uma extensa revisão sobre o papel do etileno no crescimento e desenvolvimento vegetal, ressalta a importância, já comentada, da interação do etileno com outros hormônios, bem como a necessidade de maiores pesquisas visando identificar fatores que modulam respostas etileno específicas (DUGARDEYN; VAN DER STRAETEN, 2008).

3.3.1 Etileno: Síntese e Sinalização

3.3.1.1 Síntese

Yang e Hoffman, nos anos 80, comprovaram a via biossintética do etileno, a partir da metionina e relacionaram a presença de ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) livre nos tecidos com o aumento da produção de etileno. A via de biossíntese do etileno (Figura 1) é, hoje, bem definida, iniciando com a conversão de metionina em S-adenosilmetionina (SAM), que é, posteriormente, transformada, pela ACC sintase, em ACC que, só então, é convertido, pela ACC oxidase, em etileno (Figura 1).

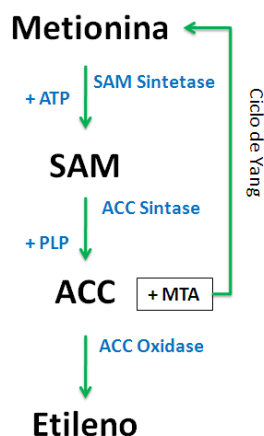


Figura 1 Via de biossíntese do etileno. Adaptado de Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008.

Todos os tipos de tecidos e, provavelmente, todas as células das plantas superiores produzem e liberam etileno (OSBORNE, 1989). A quantidade de etileno produzida é, ainda, variável com o tecido e com o estágio de desenvolvimento do vegetal (FACHINELLO; KERSTEN, 1996).

3.3.1.2 Sinalização

Diferentemente do que já se pensou, os receptores de etileno não se encontram na membrana plasmática, mas sim no retículo endoplasmático (CHEN et al., 2002, GAO et al., 2003). Como mostrado na Figura 2, em arabidopsis, o etileno é percebido por 5 receptores (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4), similares a reguladores bacterianos (CHANG; STADLER, 2001). Na ausência do hormônio, os receptores agem como reguladores negativos do etileno, através da ativação

da quinase CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1) (DE PAEPE; VAN DER STRAETEN, 2005; HUA; MEYEROWITZ, 1998). A CTR1, além de fazer parte, parece ser uma reguladora negativa da cascata ocasionada pela MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE), (KIEBER et al., 1993), a qual regula positivamente a sinalização do etileno. A cascata MAPK ativa EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE), outro regulador positivo de etileno (HALL; BLEECKER, 2003). Logo as EIN3 e as EILs (proteínas EIN3-LIKE) entram em ação, sendo que as EIN3 são constitutivamente sintetizadas e degradadas em uma via dependente de ubiquitina. EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN) e EBF2 medeiam essa quebra (GAGNE et al., 2004; GUO; ECKER, 2003). A expressão de EBF1/2 é regulada por uma exorribonuclease, a EIN5. A expressão de EIN5 é aumentada pelo etileno e sua proteína correspondente provavelmente atua na sinalização do etileno pela degradação do mRNA de EBF1/2 (OLMEDO et al., 2006; POTUSCHAK et al., 2006). Dímeros EIN3 estão aptos a se ligarem à PERE (PRIMARY ETHYLENE RESPONSE ELEMENT, elemento de resposta primária ao etileno) no promotor de ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1) (SOLANO et al., 1998). ERF1 é parte da família de genes EREBP (ETHYLENE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEINS) e está apto a se ligar ao SERE (SECONDARY ETHYLENE RESPONSE ELEMENT, elemento de resposta secundária ao etileno), uma *GCC box*, na região promotora de genes regulados por etileno (FUJIMOTO et al., 2000), e, assim, controlando a sua expressão.

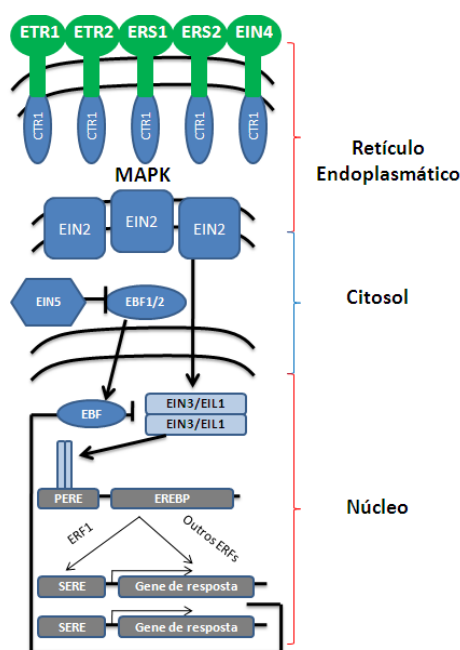


Figura 2 Sinalização do etileno, adaptado de Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008. O etileno é percebido por ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4. Na ausência do hormônio, os receptores agem como reguladores negativos do etileno, através da ativação da quinase CTR1 regularia negativamente a cascata da MAPK, a qual regula positivamente a sinalização do etileno. A cascata MAPKativa EIN2. As EIN3 e as EILs entram em ação. EBF1 e EBF2 mediam a quebra das EIN3. A expressão de EBF1/2 é regulada uma exorribonuclease, a EIN5. A expressão de EIN5 é aumentada pelo etileno e, sua proteína correspondente, provavelmente atua na sinalização de etileno pela degradação do mRNA de EBF1/2. Dímeros EIN3 estão aptos a se ligarem ao elemento de resposta primária ao etileno (*PERE*) no promotor da *ERF1*. *ERF1* é parte da família de genes *EREBP* e estão aptos a se ligarem ao elemento de resposta secundária ao etileno (*SERE*), uma *GCC box*, na região promotora de genes regulados por etileno e, assim, controlando a sua expressão.

Os *ERFs* pertencem à superfamília de fatores de transcrição AP2/EREBP (APETALA 2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN) e estes, como descrito anteriormente, funcionam como fatores de atuação *trans* (*trans-acting factors*), na última etapa da transdução de sinal. Os *ERFs* contêm um

domínio de ligação altamente conservado (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995), que age somente no DNA alvo (ALLEN et al., 1998). Muitos *ERFs* têm mostrado se ligar especificamente às já mencionadas *GCC box*, que possuem um domínio GCCGCC muito conservado, para modular a transcrição de uma ampla variedade de fatores responsivos ao etileno, indicando que uma cascata transcricional está envolvida na sinalização de etileno (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995; BÜTTNER; SINGH, 1997; ZHOU et al., 1997; SOLANO et al., 1998; GU et al., 2002).

É importante destacar ainda que, enquanto alguns *ERFs* funcionam como ativadores da transcrição *GCC Box*-dependente, outros atuam como repressores ativos que reprimem até mesmo a *trans*-ativação de outros fatores de transcrição (FUJIMOTO et al., 2000).

Recentemente, foi feito um estudo computacional em bancos de dados prevendo 122 genes de *ERFs* em arábidaopsis (NAKANO et al., 2006), dos quais alguns já foram caracterizados (SAKUMA et al., 2002). Já, em arroz, Nakano et al. (2006) previram 137 *ERFs*, os quais foram subdivididos em 15 grupos e também carecem de informação.

3.3.2 O Estresse e a Síntese de Etileno

É amplamente conhecido que a produção de etileno pode ser aumentada por uma série de estresses bióticos ou abióticos. Perturbações ambientais como, por exemplo, seca (EL BELTAGY; HALL, 1974), salinidade (EL BELTAGY et al., 1979), ferimentos (GOESCHL et al., 1966) e encharcamento (KAWASE, 1972; EL BELTAGY; HALL, 1974) podem acarretar um aumento dos níveis de etileno. Dentro deste aspecto é possível, ainda, demonstrar que as respostas ao incremento da síntese de etileno, ocasionado pelo estresse, têm relação adaptativa, auxiliando na sobrevivência do vegetal em condições adversas.

Este aumento na produção de etileno devido à estresses ambientais ou bióticos, é comumente chamado por um termo cunhado por Abeles (1972): etileno de estresse, ou *stress ethylene* (ABELES, 1972; BABA, 1978; TINGEY et al., 1978; LIEBERMAN, 1979; PEISER; YANG, 1979; STAN; SCHICKER, 1982; MEHLHORN; WELLBURN, 1987).

Plantas submetidas a condições de estresse, frequentemente exibem sintomas de exposição ao etileno. Essa relação comumente resulta da indução da ACC sintase, levando ao aumento no conteúdo de ACC (MATHOOKO et al., 1998; WANG; ARTECA, 1992; MULLINS et al., 1999; YU; YANG, 1980; KENDE; BOLLER, 1981).

Muitos dos efeitos do estresse no desenvolvimento são idênticos ou muito similares àqueles induzidos pela aplicação de etileno (HALL; SMITH, 1995). Essas relações complexas entre estresse e sintomas semelhantes ao do etileno são designadas como *síndrome do estresse por etileno* (MORGAN; DREW, 1997; CHITARRA; CHITARRA, 2005). A ACC sintase existe como uma família multigênica, cujos muitos membros individuais são diferencialmente regulados por vários estresses. A ACC sintase existe em múltiplas isoformas, as quais apresentam baixa similaridade, exceto nos seus domínios catalíticos. Estes diferentes grupos descritos (NAKAJIMA, et al., 1990; NAKAGAWA, et al., 1991; ZAREMBINSKI; THEOLOGIS, 1993) podem ser induzidos de diferentes maneiras, ou seja, estímulos de naturezas diferentes. Os resultados destes estudos com a ACC sintase ajudam a explicar o motivo pelo qual o estresse afeta a biossíntese de etileno com certa especificidade.

Além disso, outras enzimas relacionadas à rota de biossíntese do etileno, como a ACC oxidase (MORGAN; DREW, 1997; KIM et al., 1998), AdoMet sintetase, enzimas no ciclo de metionina de Yang e enzimas que conjugam ACC também podem ser reguladas por estresses (MORGAN; DREW, 1997).

Dentro do atual contexto é importante levantar outra questão: é conhecido (SMITH; RUSSELL, 1969) que o encharcamento, ou compactação do solo pode levar a um aumento da concentração de etileno na atmosfera deste. A possibilidade de que a água ajude, ainda, a manter o etileno junto às plantas submetidas à submergência ficou mais clara desde que foi reconhecido que o etileno é modestamente solúvel em água (aproximadamente 126 mL dissolve em 1L de água a 20°C) (McAULIFF, 1966) e se difunde quase 10.000 vezes mais lentamente na água que no ar (BURG; BURG, 1965).

3.4 Estresse Por Deficiência de Oxigênio e o Arroz

A falta de oxigênio devido às condições como a submergência é um dos maiores estresses abióticos dentre os quais as plantas são submetidas. Tal aeração deficiente costuma reduzir a produtividade das culturas pois, devido à limitada disponibilidade de oxigênio para a fosforilação oxidativa, ocorre uma crise energética, ou seja, uma diminuição na quantidade de ATP produzida, (GIBBS; GREENWAY, 2003; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008) trazendo diversas consequências para o metabolismo celular primário com reflexos no secundário (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004).

Ainda assim, a maioria dos tecidos vegetais pode tolerar a deficiência de oxigênio por períodos curtos antes de sofrer danos irreversíveis (KENNEDY et al., 1992). Assim, para suportar este estresse, plantas expostas a baixas taxas de oxigênio empregam várias adaptações morfológicas e metabólicas.

Um exemplo de adaptação, que se pode citar, são as enzimas que catalisam a glicólise e a fermentação, as quais são induzidas em situações de déficit de oxigênio (UMEDA; UCHIMIYA, 1994; LORETI et al., 2005), convertendo o sistema de produção de energia da respiração para a fermentação.

Entre as adaptações morfológicas bem conhecidas às condições de hipoxia em arroz estão a indução de aerênquima, raízes adventícias e alongação da parte aérea (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). Além disso, estudos sobre ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH) em arroz, têm demonstrado a importância da alongação dos coleóptilos sob condições de anaerobiose (SAIKA et al., 2006). De qualquer forma, os mecanismos moleculares de resposta à hipoxia, são pouco entendidos (OTSUKA et al., 2010) e mais estudos devem ser feitos.

Sob condições de deficiência de oxigênio, o etileno está envolvido na iniciação de um grande número de respostas que ajudam as plantas a evitar este estresse. Tratando-se, mais especificamente do arroz, pode-se citar, de forma geral, a aceleração da alongação das células nos entrenós, quando plântulas jovens estão submersas, como uma adaptação benéfica. Essa adaptação ocorre

devido ao fato de o etileno provavelmente tornar as células mais sensíveis às giberelinas (MORGAN; DREW, 1997). Entretanto, uma redução nessa resposta de alongação pode também ser uma estratégia benéfica de sobrevivência.

3.5 O Estresse Devido à Toxidez Por Ferro e o Arroz

A toxidez por ferro é um dos mais importantes estresses abióticos a limitar a produção de arroz irrigado mundialmente (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARDA, 2001) podendo levar a perdas consideráveis na produção as quais podem representar até 100% de redução no rendimento, dependendo do nível de toxidez e da tolerância dos cultivares de arroz (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; SAHRAWAT, 2004). De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras, as reduções na produtividade podem chegar a 80%. No Rio Grande do Sul, segundo o Instituto Rio-Grandense do Arroz, a redução pode alcançar até 20% (IRGA, 2004).

O efeito tóxico causado pelo excesso de Fe^{2+} pode se manifestar em uma ampla diversidade de ambientes (BECKER; ASCH, 2005), o que torna essencial um entendimento mais aprofundado de todos os mecanismos de homeostase do metal envolvendo os processos fisiológicos da planta (GROSS et al., 2003; COLANGELO; GUERINOT, 2006).

Sabendo-se que o estresse por excesso de ferro também causa um aumento na produção de etileno (YAMAUCHI; PENG, 1995) é possível se concluir que este também apresente relação adaptativa a este estresse.

3.5.1 A Importância da Regulação Gênica na Adaptação Vegetal ao Estresse e o Especial Interesse por *ERFs* em Condições de Deficiência de Oxigênio

O arroz é uma das poucas espécies que pode germinar e crescer em solos permanentemente encharcados (PERATA; ALPI, 1993; ALPI; BEEVERS, 1983). Enquanto a germinação sob anoxia é consequência de uma adaptação metabólica pouco entendida, a formação de aerêquima e a prevenção da perda radial de

oxigênio depende de uma rápida elongação da plântula para superar o alto nível da água (PERATA; VOESENEK, 2007). De qualquer forma, quando completamente submersas a maioria das cultivares de arroz morrem dentro de uma semana (XU et al., 2006).

Algumas cultivares de arroz como a *FR13A* (*Flood Resistant 13A*) podem sobreviver até duas semanas submersas, devido, em grande parte (35-69% da variação), ao *locus* conhecido como *Submergence1* (*Sub1*), de 200kb, localizado no cromossomo 9 (XU; MACKILL, 1996). Xu et al. (2006) revelaram que a região *Sub1* codifica três fatores de transcrição (*Sub1A*, *Sub1B* e *Sub1C*) pertencentes ao subgrupo B-2 de fatores de resposta ao etileno, os quais possivelmente se interrelacionam.

A tolerância à submersão em arroz, conferida pelo alelo *Sub1A-1*, no *locus* de *ethylene-response-factor-like* (*Sub1*) do cromossomo 9 (FUKAO et al., 2006; XU et al., 2006) desperta interesse especial sobre a família de *ERFs* para estudos de sua expressão transcricional em plântulas sob deficiência de oxigênio (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007).

Os genes do *locus Sub1* controlam processos de desenvolvimento altamente conservados, sendo regulados por hormônios que determinam a elongação das plântulas quando estas estão submersas. Assim *Sub1A* e *Sub1C* são fortemente regulados pela submergência (PERATA; VOESENEK, 2007), um estresse que provoca aumento da produção de etileno. A germinação de sementes de arroz sob completa anoxia não parece ser explicada em termos de genes *Sub1*, já que o etileno, o requisito básico para expressão de *Sub1A*, não é produzido sob anoxia, de qualquer forma, as cultivares *M202* e *Nipponbare*, as quais não possuem o gene *Sub1A* (FUKAO et al., 2006; XU et al., 2006) germinam igualmente bem sob anoxia (PERATA, dados não publicados). Isso enfatiza a importância da pesquisa em alagamento que inclui espécies, acessos e cultivares, tanto tolerantes como intolerantes, adotando estudos “ômicos” sobre fisiologia e desenvolvimento. Estudos sobre expressão gênica de plantas expostas a baixos níveis de oxigênio revelaram a indução (*upregulation*) de genes que codificam fatores de transcrição, componentes de transdução de sinal, hemoglobina não

simbiótica, biossíntese de etileno, metabolismo de nitrogênio e perda da firmeza da parede celular (VOESENEK, et al. 2006). Baixos níveis de oxigênio induzem, com seletividade, a síntese de proteínas conhecidas como polipeptídeos anaeróbicos, os quais, em maioria, são enzimas envolvidas na glicólise e vias de fermentação (SACHS et al., 1980; HUANG et al., 2005).

Apesar de saber da existência de formas de adaptação através da regulação em níveis de RNA e proteínas, nosso conhecimento do mecanismo existente entre e dentro das espécies para tolerância a submergência é, ainda, limitado. Assim, ainda que seja conhecido muito sobre vários mecanismos individuais de tolerância, é muito difícil definir uma causa exata para a morte dos tecidos. Tem sido sugerido que a sobrevivência é uma ação de balanço que resulta, por exemplo, do manejo do consumo de carboidratos e da prevenção de estresse oxidativo (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004), como é o que parece ocorrer com cultivares portadoras do alelo *Sub1A-1*.

Fazendo-se uma comparação com a cv. *M202* (haplotype *Sub1B-2*, *Sub1C-2*), a cv. *M202* (*Sub1A*)¹ foi mais tolerante à submergência, sendo que nesta os níveis de amido e carboidratos solúveis decresceram mais lentamente, os níveis de mRNA codificantes para α -amilases e sacarose sintases foram menores, a atividade de PIRUVATO DESCARBOXILASE (PDC) e ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH) foi aumentada, a produção de etileno foi menor e a transcrição de expansinas foi suprimida. Todos esses acontecimentos fisiológicos são consistentes com a estratégia de “quiescência” para sobreviver por mais tempo à submergência via conservação dos carboidratos, repressão da elongação celular e aumento da capacidade fermentativa (FUKAO et al., 2006).

Maiores estudos sobre regulação transcricional de fatores de transcrição que tenham influência sobre essa regulação devem ainda ser conduzidos. Entre os fatores que determinam a regulação transcricional de genes estão ainda presença de regiões de ligação para fatores de transcrição e regiões que determinam modificações na cromatina.

¹ Cultivar *M202* que sofreu introgressão do gene *Sub1A*, mais especificamente do seu alelo *Sub1A-1*.

3.6 O Estresse e as Modificações Epigenéticas

As plantas são organismos imóveis e, por isso, mais expostas aos estresses ambientais (UMEZAWA et al., 2006). Devido a isto elas desenvolveram sofisticados métodos (anatômicos, morfológicos, celulares, bioquímicos e moleculares) para se adaptar ao estresse e sobreviver (BOYER, 1982). Essas estratégias incluem alterações fisiológicas em rotas metabólicas e, como já foi mencionado, modificações na expressão gênica as quais podem ser herdadas (BOYKO; KOVALCHUK, 2008; GRATIVOL et al., 2012).

As mutações criam mudanças nas sequências de DNA que podem resultar em alterações fisiológicas e estas alterações podem ser passadas às gerações seguintes (KALISZ; PURUGGANAN, 2004). Entretanto, em plantas, o estado da cromatina pode ser modificado de forma reversível através da inserção de grupos metil nas citosinas por DNA metiltransferases e também pela acetilação e metilação da porção N-terminal de histonas para remodelamento da cromatina (BOYKO; KOVALCHUK, 2008; PENG; ZHANG, 2009).

Estas modificações, as quais alteram a atividade do DNA sem modificar as sequências de nucleotídeos, são chamadas mudanças epigenéticas (MADLUNG; COMAI, 2004), um termo já anteriormente utilizado por Conrad Hal Waddington, em 1942, para descrever a forma como os genes interagem com o que os cerca.

A variação epigenética pode estar, ou não, ligada à variação genética podendo ainda ser influenciada pelo ambiente, em um mecanismo no qual este pode modelar o material hereditário (RICHARDS, 2006; RICHARDS, et al. 2010).

Estudos que mostram que plantas transmitem seus epialelos (HOLLICK et al., 1995; STOKES et al., 2002), levam a crer que modificações epigenéticas podem ser ainda um novo nível para a herança. Desta forma é possível, inclusive, que tais modificações possam aumentar o potencial evolutivo de organismos em resposta ao estresse abiótico (BOSSDORF et al., 2008).

O DNA nuclear tem importantes níveis de organização responsáveis por perpetuar a informação genética por gerações. Essa organização é dada pela

estrutura da cromatina, que é composta por nucleossomos (LEWIN, 2007), numa organização que permite a acomodação do material genético no núcleo bem como regulação da atividade gênica.

Mudanças no nível transcricional estão acompanhadas por mudanças na cromatina que, por sua vez, são acompanhadas por marcas epigenéticas. Essas marcas representam as citadas mudanças herdáveis reversíveis.

Diversos tipos de mudanças foram reportadas como marcas epigenéticas, principalmente metilação de DNA, modificações nas histonas e pequenos RNAs. Dentro deste aspecto a metilação do DNA é um dos mais estudados processos epigenéticos já que resulta em modificação covalente herdável disparada por estímulos externos. Já a modificação histônica mais amplamente estudada é a acetilação/desacetilação, e sabe-se que DNA metilado é capaz de recrutar histona desacetilases (HDAC), as quais podem promover a repressão da transcrição (JONES et al., 1998).

A metilação do DNA é uma modificação que ocorre no quinto carbono do anel citosina. Tanto em plantas como em animais a citosina é primeiramente metilada nos dinucleotídeos CpG, mas, em plantas, a metilação pode ocorrer em mais dois complexos, totalizando três: CpG, CpNpG e CpHpH (GEHRING; HENIKOFF, 2007; CHEN et al., 2010; LAW; JACOBSEN, 2010) - onde N pode ser A, C, G ou T; e H pode ser A, C, ou T. Enquanto isso, a desmetilação pode ocorrer de forma passiva, perdendo-se na divisão celular, ao substituir citosinas metiladas por citosinas não metiladas, ou de forma ativa, com a remoção de grupos metil por DNA glicosilases (DME, DML2, DML3 e ROS1) (TARIQ; PASZKOWSKI, 2004).

Em arroz, a metilação CpG é característica de regiões gênicas, enquanto que a metilação não CpG é abundante em elementos transponíveis (ZEMACH et al., 2010). A metilação na porção 5' do gene (promotor e parte da região transcrita) e na porção 3' (incluindo parte da região transcrita e sequências flanqueadoras 3') podem inibir a expressão gênica (ZHANG et al., 2006; GEHRING; HENIKOFF, 2007; ZILBERMAN et al., 2007).

Como já comentado, sabe-se que a regulação da expressão de genes é um importante processo na adaptação vegetal ao estresse. Transposons têm

regulação diretamente determinada pela metilação e podem ter papel importante na resposta das plantas ao estresse. Estresses abióticos podem causar tanto hipermetilação quanto hipometilação (KOVARČIK et al., 1997; DYACHENKO et al., 2006; CHOI; SANO, 2007; BOYKO et al., 2007), podendo ativar elementos transponíveis (STEWART et al., 2000) de importância na adaptação ao estresse.

4 Material e Métodos

4.1 Descrição Geral dos Experimentos

Para atender os objetivos anteriormente citados, em um primeiro experimento, procurou-se realizar a quantificação transcricional de sete genes *ERFs*, previamente selecionados em trabalho anterior (PEGORARO et al., dados não publicados), em plântulas de arroz da cv. Nipponbare submetidas a estresse por deficiência de oxigênio (hipoxia e anoxia). Posteriormente realizou-se um novo teste destes *ERFs* em estresse por toxidez por ferro para se analisar uma possível relação entre as respostas aos diferentes estresses. Procederam-se, então análises comparativas entre estes genes através do uso de ferramentas computacionais (*in silico*) buscando-se identificar fatores que determinem a resposta destes genes às condições de estresse por deficiência de oxigênio, mais especificamente. Alinhamentos entre proteínas também foram feitos objetivando-se a obtenção de informações sobre a possível ativação de genes semelhantes em determinados tempos e estresses.

Em um segundo experimento submeteram-se plântulas de arroz das cvs. Nipponbare e Bonança aos mesmos estresses por deficiência de oxigênio previamente citados, e foram analisados treze genes *ERFs* por *qPCR*.

Dada esta primeira descrição geral, a seguir é feita a descrição dos métodos utilizados para os dois experimentos em conjunto, assim evitando a repetição de metodologias comuns aos dois experimentos.

4.2 Material Vegetal

4.2.1 Deficiência de Oxigênio

Para os experimentos em que plântulas foram submetidas à deficiência de oxigênio, sementes de arroz, das cvs. Nipponbare (experimentos 1 e 2) e Bonança (experimento 2) foram desinfestadas, com solução de 1% de hipoclorito de sódio,

durante 24 horas, sendo, em seguida, semeadas em papel germinador embebido com 2,5 vezes seu peso em água ultra-pura estéril. Os rolos de papel germinador foram colocados em câmara germinadora, a 25°C, durante o período de 15 dias.

Decorrido este tempo, as plântulas foram, após coleta do controle (tempo zero), submetidas aos diferentes tratamentos. Para isso foram separados três grupos de 15 plântulas, sendo que cada grupo formava uma replicata biológica, tais grupos foram colocados, individualmente, em recipientes de vidro de 580 mL vedados com tampas metálicas. Nas tampas dos recipientes nos quais as plantas foram submetidas à anoxia foram feitos dois pequenos orifícios, um para entrada de nitrogênio gasoso (N₂), o qual foi injetado durante 2 minutos, e outro para saída de ar presente dentro dos recipientes. Para o estresse por hipoxia por submergência as plântulas foram colocadas nos mesmos referidos recipientes e então completamente cobertas com água ultra-pura.

4.2.2 Toxidez por Ferro

Para realização do experimento 1, sementes de arroz da cv. Nipponbare passaram por um processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 min, após foram lavadas três vezes em água destilada, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador umedecido com água destilada. Posteriormente estas sementes foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 25°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 15 dias.

Plântulas uniformes foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente com capacidade para 1,5 L contendo solução nutritiva de Camargo e Oliveira (1981) modificada: Ca(NO₃)₂ 4 µM; MgSO₄ 2 µM; KNO₃ 4 µM; (NH₄)₂SO₄ 0,435 µM; KH₂PO₄ 0,5 µM; MnSO₄ 2 µM; CuSO₄ 0,3 µM; ZnSO₄ 0,8 µM; NaCl 30 µM; Fe-EDTA 10 µM; Na₂MoSO₄ 0,10 µM; H₃BO₃ 10 µM em pH 5,0 ± 0,1. Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água à temperatura ambiente e fotoperíodo de 16 horas durante 14 dias. Foram utilizados três diferentes recipientes, sendo que cada recipiente correspondia a uma replicata biológica. Após coleta das amostras controle (0 hora), as plântulas transferidas para os recipientes contendo tratamento de Fe com Na₂EDTA

(2.000 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O mais Na₂EDTA em valor equimolar) (DALTON et al., 1983) em pH 4,0 ± 0,1. Após a transferência/início do estresse as coletas foram feitas em 6, 12, 18 e 24 horas, removendo-se a parte aérea a qual foi envolvida em papel alumínio e, rapidamente, congelada com nitrogênio líquido.

4.3 Quantificação da Expressão Transcricional

4.3.1 Extração de RNA

As extrações de RNA feitas nos experimentos 1 e 2 foram realizadas através da utilização do reagente *PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™)*. Para isso macerou-se 0,1 g de tecido foliar com nitrogênio líquido transferindo-se para um microtubo (1,5 mL). Acrescentou-se 500 µL de *Pure Link™* mantendo-se o tubo na horizontal por 5 min a temperatura ambiente (~25°C).

Executou-se a limpeza da solução através de uma centrifugação de 2 min a 12.000 x g (~25°C). Transferiu-se o sobrenadante para um tubo livre de RNases e se adicionou 0,1 mL de NaCl (5 M) ao extrato claro e mais 0,3 mL de clorofórmio, misturando-se por inverções do tubo. Centrifugou-se a amostra a 4°C por 10 min a 12.000 x g para separar as fases, transferiu-se 400 µL fase aquosa superior para um tubo livre de RNases e se adicionou ao tubo 400 µL isopropanol, deixando-se a temperatura ambiente (~25°C) por 10 min, antes de executar mais uma centrifugação (12.000 x g) a 4°C por 10 min.

Verteu-se o sobrenadante, e adicionou-se 1 mL de etanol 75% ao precipitado, logo executando-se mais uma centrifugação à temperatura ambiente (~25°C) por 1 min a 12.000 x g. Verteu-se o etanol cuidadosamente, retirando-se qualquer resíduo com uma micropipeta, e se adicionou 25 µL de água livre de RNases para ressuspender o RNA.

A quantidade de RNA foi medida espectroscopicamente e através de eletroforese em gel de agarose (2%). Os extratos foram mantidos a -70°C até o momento da síntese de cDNA.

4.3.2 Síntese do cDNA

Para síntese de cDNA o RNA Total foi tratado com *DNase I* (*Invitrogen*TM) e cada amostra foi transcrita reversamente utilizando-se o kit comercial *SuperScript*TM *III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (*Invitrogen*TM) de acordo com os seguintes passos: em um tubo livre de RNases adicionou-se 2,0 µL de extrato de RNA previamente diluído, 1,0 µL *DNase I* (1 U.µL⁻¹), 1,0 µL de *DNase I reaction buffer* 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl], 6,0 µL H₂O e submeteu-se a mistura a 25°C por 15 min. Adicionou-se mais 1,0 µL de EDTA (25 mM; pH 8,0) e manteve-se a 65°C por 10 min. 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 min, seguido de 1 min a 0°C. Adicionou-se então 4,0 µL de *RT Buffer* 5x, 4,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de DTT (1,4-Dithiothreitol) (0,1 M), 1,0 µL de *RNAse OUT*TM (40 U.µL⁻¹) e 1,0 µL de *SuperScript*TM *III* (200 U.µL⁻¹) submetendo-se a 50°C por 50 min, seguido de mais 5 min a 85°C. Por fim adicionou-se 1,0 µL de *RNAse H* (2 U.µL⁻¹) submetendo-se a 37°C por 20 min, completando a reação de síntese de cDNA.

A qualidade dos cDNAs foi avaliada através de uma reação de amplificação com o gene constitutivo *GAPDH*.

4.3.3 Desenho dos Primers para *qPCR*

O desenho dos *primers* para *qPCR* dos experimentos 1 e 2 (Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente), foi feito através do uso do programa *Vector NTI Advance*TM 11 (*Invitrogen*TM), respeitando-se os seguintes parâmetros exigidos pela empresa *Applied Biosystems*[®]: formação de um *amplicon* de tamanho variando entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60%, finais 3' com menos de três bases C e G nos últimos cinco nucleotídeos e temperatura de anelamento variando entre 60 e 65°C.

Experimento 1

Tabela 1 *Primers* utilizados no experimento 1, os quais foram desenhados a partir das sequências obtidas do *RAP-DB*, pelo programa *Vector NTI Advance*TM 11.

<i>FL-cDNA</i>	Nome Genérico	Sequências dos <i>primers</i>
<i>AK062882</i>	<i>OsERF#104</i>	F: GCCAGCAGCGAGAGAACACAAA R: TACTCCTGGTTGCCTCCCATGG
<i>AK106987</i>	<i>OsERF#069</i>	F: CGGCGTCATTGACAGTGACAA R: CGAACTGGTCGCCGAACAAGAA
<i>AK067195</i>	<i>OsERF#102</i>	F: GCTGTCTCGGGTGCGACTTCTT R: AGCAGCATAATCCGTCGCCATT
<i>AK100575</i>	<i>OsERF#109</i>	F: CGAGAAGGAACCGACGAGCAAA R: GCGGCCTCCTCCTCACTGTAA
<i>AK111414</i>	<i>OsERF#066</i>	F: ACGGCGGTGGAGTACAGCGTTA R: ACGGCGCTGAACTCGTAAGCAA
<i>AK106057</i>	<i>OsERF#063</i>	F: GTGTGGAGGAGCACTGATCCCG R: CGCCACCACGCTTCTTCTTCTT
<i>AK107119</i>	<i>OsERF#033</i>	F: CCTCCTCCGTCTCCGTCTCCTT R: CGTGTTTGGGCTTGGAGCTCTT
<i>AK064960</i>	<i>GAPDH</i>	F: AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT R: CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT

Experimento 2

Tabela 2 *Primers* utilizados no experimento 2, os quais foram desenhados a partir das sequências obtidas do *RAP-DB*, pelo programa *Vector NTI Advance*TM 11.

<i>FL-cDNA</i>	Nome Genérico	Sequências dos <i>primers</i>
<i>AK105991</i>	<i>OsERF#049</i>	F: GCACACACCAGATCGCATCCTC R: GGTTTCGAGCGCTTTCATGAGCT
<i>AK108830</i>	<i>OsERF#035</i>	F: GGCAAGTGGGTGTCGGAGATCA R: CAGCCAGATGCGCGACTTCTTC
<i>AK067313</i>	<i>OsERF#040</i>	F: TGCTCCGTGCAAGTGAGGAAGA R: CAGCGATTGAATCAGGGCCATC
<i>AK099221</i>	<i>OsERF#042</i>	F: GGGGAAAGGAGGACCGGAGAAT R: ACCCACTTGCCCCAGGTACGTT
<i>AK101949</i>	<i>OsERF#062</i>	F: GCGGCAAGAGCAAGAGCAAGAG R: GCGTCGTCTGAAGTCGGAGTCAT
<i>AK109360</i>	<i>OsERF#065</i>	F: CCATTCTCGGCGACCTTCACTT R: CGTCGCCACCATCTCTACCCTT
<i>AK069833</i>	<i>OsERF#071</i>	F: GCCATCCTCTCCGACCTCATCC R: CTCCTCGCGCCCTTGTTCTTCT
<i>AK104576</i>	<i>OsERF#072</i>	F: GGTGTCCGTGTTTGGCTTGGA R: CTTGCGGGCTTCAGCGTCATAT
<i>AK072749</i>	<i>OsERF#073</i>	F: ACGGTCAGCATGTCGTTGTTGC R: GCCGTGGACGCACTTGTCCTA
<i>AK109390</i>	<i>OsERF#083</i>	F: CCGCCTCTCAGCCCATCGATAT R: GATGGAGTGGTGGCTTGGGCTT
<i>AK241281</i>	<i>OsERF#087</i>	F: ATGATGCAGCCACCGTACACGT R: GGCGGCAAGCTGCTATGGATAT
<i>AK241246</i>	<i>OsERF#095</i>	F: AGTTCTCGACGGCCTTCGCTTT R: TACCCGTCACATGCATGCGCTA
<i>AK109226</i>	<i>OsERF#107</i>	F: GCGGCGCAGATCCTGGACTT; R: AGAGACCCCGACGAGCCGCT
<i>AK064960</i>	<i>GAPDH</i>	F: AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT R: CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT

4.3.3.1 Validação dos *Primers*

As curvas de dissociação foram avaliadas e somente *primers* com picos únicos e eficiência entre 1,95 e 2,05 foram utilizados. A *qPCR* foi realizada em aparelho 7500 Fast RealTime PCR System (Applied Biosystems[®]), utilizando SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems[®]).

4.3.4 Quantificação Relativa por *qPCR*

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 μL , contendo 2 μM de cada *primer*, 12,5 μL de SYBR® *Green PCR Master Mix*, 1 μL de cDNA (diluído 25 vezes) e água em quantidade suficiente para completar o referido volume. As amostras foram colocadas em 96 *Well Optic Plates* (*Applied Biosystems*®) e cobertas com *Optic Adhesives* (*Applied Biosystems*®). As condições de termociclagem foram como se segue: 50°C durante 20 min; Desnaturação inicial (95°C, durante 10 min); 40 ciclos (Desnaturação 95°C, durante 15 seg; Anelamento 60°C, durante 1 min; Extensão 72°C, durante 1 min); Extensão final (72°C, durante 5 min). A quantificação relativa de cada gene foi feita utilizando o método *Cycle Threshold (CT)* comparativo, como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Para cada cDNA, o gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007) para quantificação do acúmulo de transcritos (na mesma diluição mencionada anteriormente). O *CT* foi calculado na reação de PCR exponencial, e dele obteve-se o nível de expressão relativa (QR – Quantificação Relativa) pela fórmula $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados foram expressos como quantidade de mRNA em um diagrama de cores construído pelo programa *Multi Experiment Viewer (MeV)* (SAEED et al., 2003). A quantidade de mRNA das amostras “0h” (de estresse por ferro) e “Controle” (0h de estresse por hipoxia/anoxia) serviram como amostras calibradoras para determinar os níveis relativos de RNA em cada experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1-PN	T1-PN	T1-PN	T2-PN	T2-PN	T2-PN	T3-PN	T3-PN	T3-PN	T4-PN	T4-PN	T4-PN
B	T5-PN	T5-PN	T5-PN	T1-P1	T1-P1	T1-P1	T2-P1	T2-P1	T2-P1	T3-P1	T3-P1	T3-P1
C	T4-P20	T4-P20	T4-P20	T5-P20	T5-P20	T5-P1	T1-P2	T1-P2	T1-P2	T2-P2	T2-P2	T2-P2
D	T3-P2	T3-P2	T3-P2	T4-P2	T4-P2	T4-P2	T5-P2	T5-P2	T5-P2	T1-P3	T1-P3	T1-P3
E	T2-P3	T2-P3	T2-P3	T3-P3	T3-P3	T3-P3	T4-P3	T4-P3	T4-P3	T5-P3	T5-P3	T5-P3
F	T1-P4	T1-P4	T1-P4	T2-P4	T2-P4	T2-P4	T3-P4	T3-P4	T3-P4	T4-P4	T4-P4	T4-P4
G	T5-P4	T5-P4	T5-P4	T1-P5	T1-P5	T1-P5	T2-P5	T2-P5	T2-P5	T3-P5	T3-P5	T3-P5
H	T4-P5	T4-P5	T4-P5	T5-P5	T5-P5	T5-P5						

Figura 3 Desenho da placa utilizada para a *qPCR*: T: número do tratamento (1 = controle 0h); P: número do *primer* (N = normalizador/*GAPDH*).

4.4 Análise da Expressão Transcricional Pelo Genevestigator

Para a discussão dos resultados obtidos por *qPCR* e análise de promotores, no experimento 1, realizaram-se análises de expressão gênica através da ferramenta de análise do *Genevestigator* (ZIMMERMAN et al., 2008) para genes putativamente envolvidos com modificações da cromatina.

4.5 Análise da Similaridade de Proteínas pelo Alinhamento de Aminoácidos

O alinhamento de aminoácidos das proteínas codificadas pelos sete *ERFs* analisados no primeiro estudo foi feito pelo *ClustalW* versão 2.0 (LARKIN et al., 2007). Os parâmetros de entrada utilizados foram: *Program: ClustalW2; Alignment Method: slow; Sequence type: protein; KTUP: 1; Window: 5; Score: percent; Top Diagonals: 5; Pairgap: 3; Protein Weight Matrix: pam; DNA Weight Matrix: iub; Gap open: 10; Gap extend: 0.1; Protein Weight Matrix: pam; DNA Weight Matrix: iub; Gap open: 10; End gap: false; Gap extend: 0.2; Gap distance: 5; Iteration type: none; Number Iterations: 1; Clustering: NJ; Alignment format: aln1; Output order: aligned.*

Tabela 3 Interpretação da coloração dos resíduos de aminoácidos nos alinhamentos de proteínas, de acordo com o *ClustalW* versão 2.0.

Resíduos	Cor	Descrição
AVFPMILW	Vermelho	Pequeno (pequeno + hidrofóbico (incluindo aromático – Y))
DE	Azul	Acido
RK	Magenta	Básico – H
STYHCNGQ	Verde	Hidroxil + sulfidril + amina + G
Outros	Cinza	Amino/iminoácidos não usuais, etc

4.6 Análise dos Promotores dos Genes

A análise da região promotora dos genes do experimento 1 foi feita através de diferentes recursos computacionais (*in silico*). Cada etapa objetivou entender

melhor o papel de determinada região na modificação da expressão transcricional de cada *ERF*. Tais análises são descritas nos sub-itens a seguir.

4.6.1 Alinhamento de Promotores

Primeiramente, para analisar a semelhança dos promotores e realizar o desenho de um filograma identificando a similaridade entre estes genes, realizou-se o alinhamento dos promotores com sequências de -1.500 a +100 pbs do gene, através do *ClustalW* versão 2.0 (LARKIN et al., 2007). Por vezes a região analisada foi modificada para -500 a +100 pbs, considerando a possibilidade desta ser a maior responsável pela regulação diferencial detectada. Os parâmetros de entrada utilizados foram: *Program: ClustalW2; Alignment Method: slow; Sequence type: DNA; KTUP: 1; Window: 5 ;Score: percent; Top Diagonals: 5 ;Pairgap: 3; Protein Weight Matrix: gonnet; DNA Weight Matrix: iub; Gap open: 10; Gap extend: 0.1; Protein Weight Matrix: gonnet; DNA Weight Matrix: iub; Gap open: 10; End gap: false; Gap extend: 0.2; Gap distance: 5; Iteration type: none; Number Iterations: 1; Clustering: NJ; Alignment format: aln1; Output order: aligned.*

4.6.2 Identificação de Motivos Conservados nos Promotores

Posteriormente foi feita a análise de motivos conservados presentes nas regiões promotoras utilizando o *MEME* (*Multiple Em for Motif Elicitation*) (http://meme.sdsc.edu/meme4_4_0/intro.html) version 4.4.0, utilizando-se as condições padrão da ferramenta.

4.6.3 Investigação da Ocorrência Sítios de Ligação para Fatores de Transcrição e Ilhas CpG/CpNpG

A ferramenta de “Análise de Grupos Gênicos” do *PlantPAN* (CHANG et al., 2008) foi utilizada para análise da coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos diferentes grupos de genes analisados, sendo que o tamanho da região promotora variou de acordo com a análise. Já para análise

da ocorrência de ilhas CpG/CpNpG foi utilizada a ferramenta de “Análise de Promotores” do mesmo programa na região de -1.500 a +100 pbs do sítio de início da transcrição.

5 Resultados e Discussão

5.1 Experimento I - *Ethylene Response Factors* – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro

5.1.1 Deficiência de Oxigênio - Comparação Anoxia x Hipoxia

Sete genes com perfil de expressão diferenciado, extraído de pesquisa anterior (PEGORARO et al., dados não publicados), são exibidos na Tabela 4.

Tabela 4 Sete genes *ERFs* que apresentaram perfil de expressão diferenciado no *Genevestigator* (www.genevestigator.ethz.ch) e que foram, então, selecionados para análise por *qPCR*.

<i>TIGR</i>	<i>RAP DB</i>	<i>FL-cDNA</i>	Localização	Nome Genérico
<i>LOC_Os08g36920</i>	<i>Os08t0474000</i>	<i>AK062882</i>	chr08:23441862..23442942	<i>OsERF#104</i>
<i>LOC_Os03g08490</i>	<i>Os03t0183200</i>	<i>AK106987</i>	chr03:4366271..4367451	<i>OsERF#069</i>
<i>LOC_Os09g28440</i>	<i>Os09t0457900</i>	<i>AK067195</i>	chr09:18012099..18013198	<i>OsERF#102</i>
<i>LOC_Os09g13940</i>	<i>Os09t0309700</i>	<i>AK100575</i>	chr09:8818014..8821350	<i>OsERF#109</i>
<i>LOC_Os03g22170</i>	<i>Os03t0341000</i>	<i>AK111414</i>	chr03:12761327..12762581	<i>OsERF#066</i>
<i>LOC_Os09g11480</i>	<i>Os09t0287000</i>	<i>AK106057</i>	chr09:7022482..7024039	<i>OsERF#063</i>
<i>LOC_Os04g46400</i>	<i>Os04t0549700</i>	<i>AK107119</i>	chr04:28016357..28017492	<i>OsERF#033</i>
<i>LOC_Os04g40950</i>	<i>Os04t0486600</i>	<i>AK064960</i>	chr04:24804606..24808210	<i>GAPDH</i>

Sabe-se que os níveis de etileno aumentam rapidamente após a submergência ativando genes associados com respostas de aclimação assim como metabolismo de carboidratos, resultando em alongação da parte aérea e senescência foliar (STEFFENS; SAUTER, 2005; FUKAO et al., 2006). Assim, seria natural que a resposta transcricional dos *ERFs* às condições de anoxia e hipoxia fosse diferente devido ao fato do efeito destes estresses na biossíntese de etileno ser completamente oposto, pois enquanto, em anoxia, a produção de etileno cessa devido à falta de oxigênio, o que impede a oxidação do ACC, na hipoxia os níveis de produção de etileno aumentam devido ao estresse e a baixa solubilidade deste em água, o que mantém o hormônio em contato com o vegetal. Porém, ainda que em anoxia não haja produção de etileno, têm-se dado importância ao

estudo dos *ERFs* em condições de ausência de oxigênio (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). Entretanto, contrariando o esperado, o que se observa no gráfico obtido a partir da análise por *qPCR* da parte aérea de plântulas, submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio (Figura 4), é uma resposta semelhante entre os dois estresses. Somente os genes *AK111414* e *AK106057* demonstram perfil de expressão próximo ao esperado de um gene dependente de regulação direta por etileno.

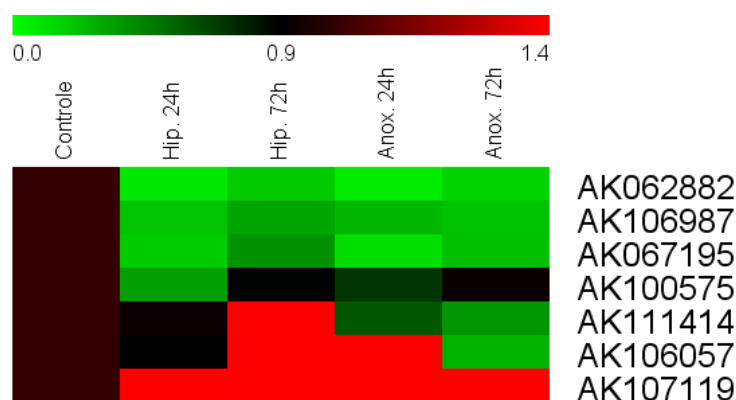


Figura 4 Expressão transcricional em folhas de plântulas de arroz submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio - Gráfico *heat map* construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por PCR em tempo real.

Verifica-se uma diminuição na quantidade de transcritos em ambos os estresses para os genes *AK062882*, *AK106987*, *AK067195* e ainda, mesmo que em menor intensidade, para o *AK100575*. Já para o *AK111414* é percebida uma diferença na resposta entre os estresses, considerando que este gene tenha demonstrado uma leve e transiente repressão às 24 horas, seguida de indução quando alcançadas as 72 horas em hipoxia, enquanto que, em condições de anoxia, o que se observa é uma indução transcricional deste gene. O *AK106057* também apresentou diferença entre os estresses, com repressão seguida de indução em hipoxia e o contrário em condições de anoxia. Já o *AK107119* demonstrou forte indução em todos tempos e estresses.

5.1.2 Estresse por Ferro

Através dos resultados obtidos por *qPCR* para excesso de ferro (2.000 mg.L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Figura 5) é possível observar a manutenção de um baixo nível de transcritos do *AK107119*, bem diferente do que ocorre em deficiência de oxigênio, e do *AK062882*, sendo que este manteve um nível de expressão bem mais instável. Já para os *AK106987*, *AK067195*, *AK111414*, *AK100575* e *AK106057* foi observado um gradativo aumento da expressão ao longo do tempo.

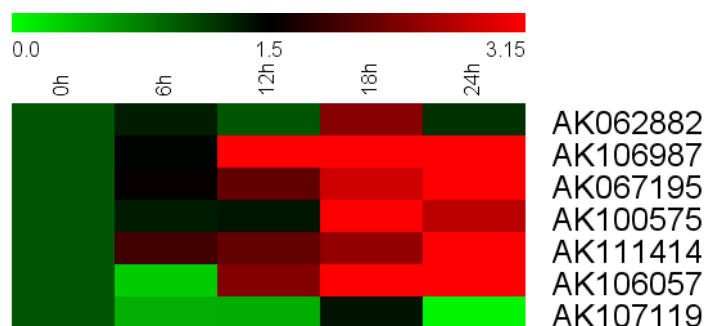


Figura 5 Expressão transcricional em folhas de plântulas de arroz submetidas ao estresse por excesso de ferro (2.000 mg.L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - Gráfico *heat map* construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por *qPCR*.

5.1.3 Toxidez de Ferro x Deficiência de Oxigênio

Os genes *AK062882*, *AK106987* e *AK067195* parecem não ser estimulados diretamente por um aumento na produção de etileno, já que não são induzidos em hipoxia, que causa tal modificação na produção deste hormônio (FUKAO et al., 2006). O *AK100575* também não parece ser diretamente dependente de etileno já que não é fortemente reprimido em condições de anoxia.

Já os genes *AK111414* e *AK106057* apresentam características de genes mais diretamente dependentes do etileno já que apresentam aumento gradativo em estresse por ferro, uma condição que aumenta a produção deste hormônio (YAMAUCHI; PENG, 1995) e apresentam repressão às 72 horas de anoxia, quando o etileno não pode ser produzido (PERATA et al., 2007).

5.1.4 Estudo da similaridade das CDSs e de promotores nos sete *ERFs* em estudo

5.1.4.1 Similaridade de CDSs e expressão diferenciada deste genes em diferentes órgãos e estádios do arroz

Um fato que torna o estudo da expressão deste grupo de *ERFs* em plântulas sob deficiência de oxigênio bastante interessante, é a possibilidade de agrupar estes em classes de expressão de forma mais simples, como pode ser visto na

Tabela 5, sendo possível realizar uma comparação da similaridade da região promotora destes com o perfil de expressão encontrado por *qPCR*.

Tabela 5 Interpretação da forma de expressão dos diferentes genes em estudo: **+**: significa indução; **-**: significa supressão; **+/-**: significa comportamento variável.

<i>FL-cDNA</i>	Hipoxia	Anoxia	Estresse por Ferro
<i>AK062882</i>	-	-	+/-
<i>AK106987</i>	-	-	+
<i>AK067195</i>	-	-	+
<i>AK100575</i>	+/-	+/-	+
<i>AK111414</i>	+	-	+
<i>AK106057</i>	+	+/-	+
<i>AK107119</i>	+	+	-

Para realizar-se a comparação destes genes executou-se o alinhamento de sequências de aminoácidos dos sete *ERFs* pelo *ClustalW* versão 2.0 (LARKIN et al., 2007), obtendo-se o filograma exibido na Figura 6.

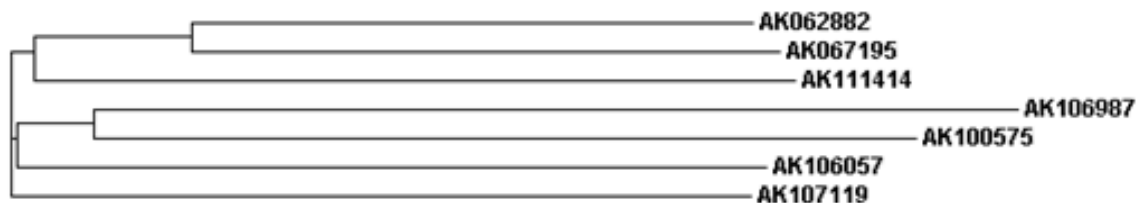


Figura 6 Filograma construído a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos referidos genes.

Percebe-se uma maior similaridade de expressão entre genes que são próximos no filograma obtido a partir da sequência de aminoácidos dos genes. O que indica a possibilidade de ativação transcricional simultânea de genes redundantes, algo que tem sido discutido para *ERFs* (NAKANO et al., 2006). Desta forma sugere-se que a seleção natural tenha direcionado um arranjo do genoma de maneira que, em um dado momento, uma grande quantidade de fatores de transcrição derivados de diferentes *loci*, mas responsáveis pela ativação de um mesmo gene ou grupo de genes, sejam produzidos. Este tipo de efeito, também chamado de dosagem, é revisado por Birchler e Veitia (2007), os quais comentam que genes relacionados a transdução de sinal e fatores de transcrição parecem ser preferencialmente mantidos ao longo da evolução de uma forma *dosagem-sensitiva*.

Objetivando-se examinar o registro de uma possível expressão diferenciada destes genes em determinados órgãos ou estádios das plantas de arroz, verificou-se as bases de dados do *Genevestigator*, o qual gerou o gráfico exibido a seguir (Figura 7).

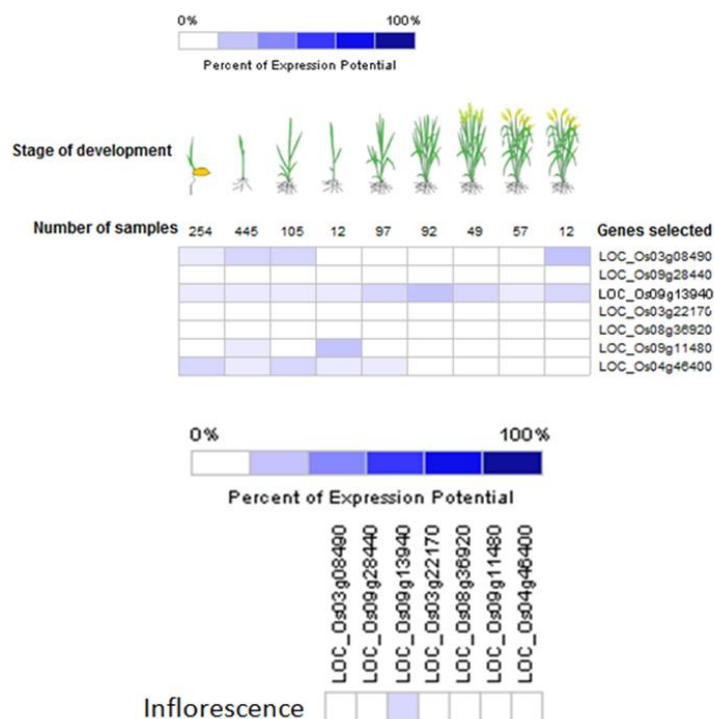


Figura 7 Nível de expressão dos sete *ERFs* estudados no primeiro experimento em diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento no *Genevestigator*.

Verifica-se a expressão do gene *AK100575* (*LOC_Os09g13940*) ao longo de todo o ciclo do vegetal, com um aumento no início da floração. Além disso, este gene tem expressão significativa na inflorescência. Trabalhos relatando a importância do etileno e de *ERFs* na floração (REID; WU, 1992; ACHARD et al., 2007), inclusive na repressão desta como forma de tolerância a estresse por hipoxia (FUKAO; BAILEY-SERRES et al., 2008; PEÑA-CASTRO et al., 2011), parecem dar suporte à ideia de que este gene possa ter envolvimento neste evento. Entretanto, maiores estudos como a utilização de transgenia (LLOYD, 2003; CIGAN et al., 2005) para o esclarecimento da função deste gene são necessários.

Os genes *AK106987* (*LOC_Os03g08490*) e *AK107119* (*LOC_Os04g46400*) parecem ter importância nos estádios iniciais das plantas, sendo que o *AK106987* (*LOC_Os03g08490*) possivelmente ainda tenha importância também nas fases finais do ciclo do vegetal estando possivelmente envolvido com atividades como, por exemplo, o enchimento de grãos. Entretanto os mesmos aspectos ressaltados

com relação ao gene *AK100575* (*LOC_Os09g13940*) são válidos aqui, ou seja, estes genes, até então, são apenas bons candidatos a estudos futuros e nada sobre sua função se estabelece aqui.

Objetivando-se verificar onde as maiores diferenças eram encontradas após o alinhamento das proteínas, estas foram avaliadas visualmente, e seus domínios foram destacados após passarem por análise pelo *Pfam - Protein Families Database* (PUNTA et al., 2012), como mostrado na Figura 8. Percebem-se poucas diferenças nos domínios *AP2* destas proteínas, sendo que a maior surpresa encontra-se no fato de não ser possível encontrar um domínio *AP2* para o gene *AK106987*, o qual possivelmente foi anotado de forma incorreta.

```

AK062882 -----FKLTPRRELSSQQRENTNSHDQPDLRHGRQPGVNDPIRRPHRRCL 45
AK067195 -----MTKKVIPAMAAARQDSCKTKLDERGGSHQAPSSARWISSEQHSIIIV 47
AK111414 -----MCGGAIPLISSRGPGGKRSLSADELNPPPPQHASDDPAEQAAA 44
AK106057 -----MCGGALIPNDYGDKPPPPPESSSEWDATTMMKKKKKRGGGGDDWEAAFRFI 53
AK107119 MEADASHIPTTSSSVSVSFSSSLSTSSSTSSSLVDNGAQDRPKSSKPKHAAMKRGAAAE 60
AK100575 -----MMVPSRRKRVVFCSDPDATDSSDEDDQNKERRFSREILIPMENSKAS 48
AK106987 -----MCGGAILANIIPATPRPRKCRPTTATATPKATTPNVV 37

AK062882 AELRHCR-----A 53
AK067195 AALRYVVSQCTTPPFEIVTVACGEACALCGIDGCLGCDFFGAENAGNEEAVMATDYAAAA 107
AK111414 DEEEQEQ----- 51
AK106057 AGDDDDDDGGVSMFFSGAG-----TMTETTE 79
AK107119 EPANAANGAGEDTSSCSTDNAAAAG-----KAQAGGGGG 95
AK100575 KPVKTLVQCG----- 58
AK106987 VVVKLVD----- 44

AK062882 TAAAAAGAAAGQRRRRKGGKYRGVVRQRPWGKWAAEIRDFRRVRKWLGTFTDAEEAAR 113
AK067195 AAAAAVAGSGGKRVRRRRKGGVYRGVVRQRPWGKWAAEIRDFRRVRKWLGTFTDAEEAAR 167
AK111414 -----QPAARRQRRGERRTLYRGIRRRPWGKWAAEIRDFPAKGVNLGTFTATAEAAA 104
AK106057 VAPAAAVVERPRRRRVRRSYHYRGVVRQRPWGKWAASEIRDFVKGARVNLGTFTAVEAAR 139
AK107119 GVDSSSTCTAASAPRSGFKHPSYRGVRRRSWGKWAASEIREPRKKSRIWNLGTFTAEMAAR 155
AK100575 -----TKTVKDSEKEPTSKYRGVRRRWGKWAAEIRDFVRKSRKWLGTFTNSEEEAAA 110
AK106987 -----KEAEVSESSGASSSALPDFSWQGMSSASSDDAAAQQALLDAAGGAKRPR 94

AK062882 AYDRAAVEFRGPRAKLNFFPFEQLSANDDS-----NGDASAAAKSDTILSPSP 160
AK067195 AYDRAALEFRGPRAKLNFFCSEPLPMFSQR-----NGNGGDAVTAATTTAEQ 214
AK111414 AYDRAARRIRGTAKVNFNEDNAFAAAPPPYHLAAYYGDA SSTSYLYPMA----- 155
AK106057 AYDAEARRIHGHGARTNFFPDPEPLPAPSQAP--FCFLDDDDDDGGVARG----- 188
AK107119 AHDVAALAIKERNALNFFDSAHLEPRPESTSPADIQAAAAKAAAEVRCEE----- 206
AK100575 AYLAQSNQFHEELMALKIQSSVSEQEDLSSSVTISCVSSSQSCDQKIQAQPKQEHKRVSVV 170
AK106987 SEPHVTSDDDEVLPASFDSDNNT----- 116

AK062882 --RSADADEQVEHTRWPQGGGGGGGGGGGETGDQLWEGLQDLMQLDEGGLSWFFQSSDSW 218
AK067195 --MTPTLSPCSADAEETITPVDWQMGADAGSNQLWDGLQDLMKLDEADTWFFPFSGAAS 272
AK111414 --MTPAAGLREQQLMTTITAVEYSVNDVAVSVYFQPPPPAVAYEFSAVGGGAVVVEVS 213
AK106057 --NSPASSAPDRASACTTSSSTVASGERGDELILLECCSDVMDSLLAGFDVSSSEPRSVL 246
AK107119 --ESSPSSSPTAZQPEEEAACPDVTGHADGGQDNALFDLPDLLDLRLDGLWWSFVWPAALA 264
AK100575 VNRETVEQKFKAQFQAQKIKAQFHVQKRVSVKISHETEDHLLNLPSTPKGKEISMGAVL 230
AK106987 --AAAGLLPLDDPFLFGDQFGDLNGGAFASLMDGLFAAGEANVAGESVGLWSFGDDFLNA 174

AK062882 N----- 219
AK067195 SF----- 274
AK111414 AVAPAMTYGQSQEVAAFLMWNFDDITAMP----- 243
AK106057 GMVN----- 250
AK107119 AEEYDG--GDAVVLNEPLLNAE----- 284
AK100575 GRIDEIPVSNVCVGHIDEFFPDQFTRLADAFFVSDFIGMADVPLGDDYIGLADISHLPLPI 290
AK106987 SY----- 177

AK062882 -----
AK067195 -----
AK111414 -----
AK106057 -----
AK107119 -----
AK100575 TDLKFDLNAELNWDGFDASLEQELNCL 318
AK106987 -----

```

Figura 8 Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos *ERFs* em estudo.

Estranhamente o *AK106987*, mesmo sem domínio AP2 identificado pelo Pfam ou BLASTp (NCBI – National Center for Biotechnology Information) consegue se agrupar bem com as demais proteínas, o que nos leva a pensar se as regiões que determinam as diferenças de agrupamento não se situam fora da região do domínio principal. Considerando-se esta possibilidade os seis domínios foram recortados, novamente alinhados (Figura 9) e deram origem a um novo filograma (Figura 10).

```

AK062882      -KYRGVRQRPWGKWAAEIRDPRRAVRKWLGTFTAEAAARAYDRAAVEFRG 50
AK067195      -VYRGVRHRPWGKWAAEIRDPRRAVRKWLGTFTAEAAARAYDRAALEFRG 50
AK111414      -LYGIRRRFPWGKWAAEIRDPAGARVWLGTFTAEAAARAYDRAARRIRG 50
AK106057      --YRGVRQRPWGRWASEIRDPVKGARVWLGTFTAVEAARAYDAEARRIHG 49
AK107119      PSYRGVRRRSWGKWVSEIREPRKKSRIWLGTFTAEAAARAHDAALAIKG 51
AK100575      SKYRGVRRRAWGKWAAEIRDVPRKSRKWIGTFNSEEEAAAAYLAQSNQFH- 50
               ***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Figura 9 Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos domínios dos *ERFs* em estudo.

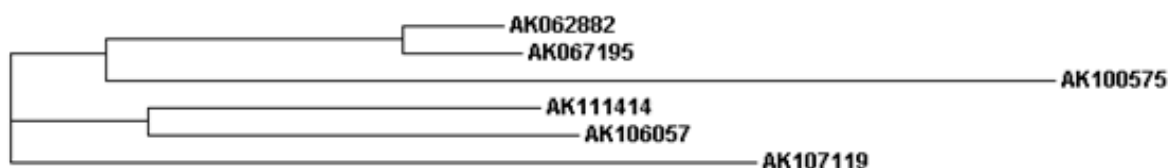


Figura 10 Filograma construído a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios dos referidos genes.

Após a formação de um novo filograma poucas mudanças foram observadas. O *AK062882* e *AK067195* seguiram no mesmo ramo enquanto o *AK107119* seguiu isolado dos demais. Assim as maiores diferenças residem no fato de o *AK100575* passar a se agrupar com o *AK062882* e *AK067195*, no lugar do *AK111414*, e este vir a se agrupar com o *AK106057*, onde antes estavam o *AK100575* e *AK106987*. Em suma os genes reprimidos e os genes induzidos seguem agrupados entre si.

5.1.4.2 Similaridade de promotores

Para avaliar a similaridade dos promotores e uma possível relação desta com a diferença de expressão dos genes em plântulas sob estresse, um novo alinhamento e filograma foi obtido, desta vez a partir da sequência de nucleotídeos da região promotora (-1.500 a +100pbs) dos referidos genes (Figura 11) através do *ClustalW* versão 2.0 (LARKIN et al., 2007).

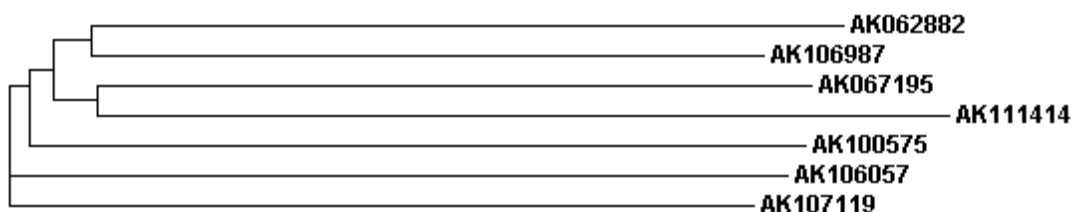


Figura 11 Filograma construído a partir do alinhamento dos nucleotídeos da região promotora de cada gene (-1500 a +100 pbs).

O novo filograma obtido agrupa os genes relativamente bem, entretanto este não foi capaz de unir o *AK067195* aos *AK106987* e *AK062882*, os quais são fortemente reprimidos e formam um grupo com expressão interessante.

Para se identificar motivos conservados entre os genes e analisar em que região específica do promotor estão as maiores semelhanças, realizou-se a análise da região de -1.500pb a +100 pb através do *MEME* (BAILEY et al., 2009), formando-se dois grupos de expressão: o dos genes fortemente reprimidos (*AK062882*, *AK106987*, *AK067195*) e o dos genes pouco regulados ou induzidos (*AK100575*, *AK111414*, *AK106057*, *AK107119*). Os resultados da análise por agrupamento são exibidos na Figura 12 e Figura 13.

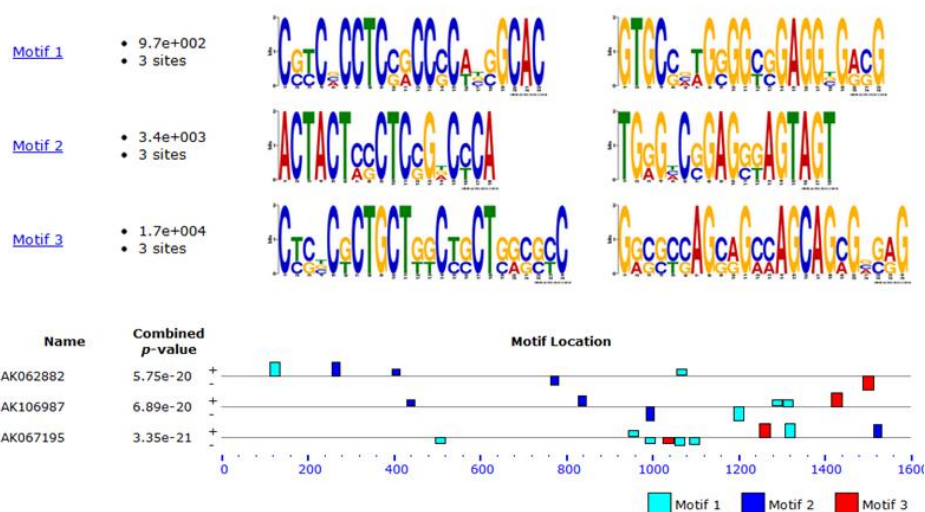


Figura 12 Análise de motivos conservados na região promotora (-1.500 a +100 pbs) para o grupo de três genes fortemente reprimidos em deficiência de oxigênio.

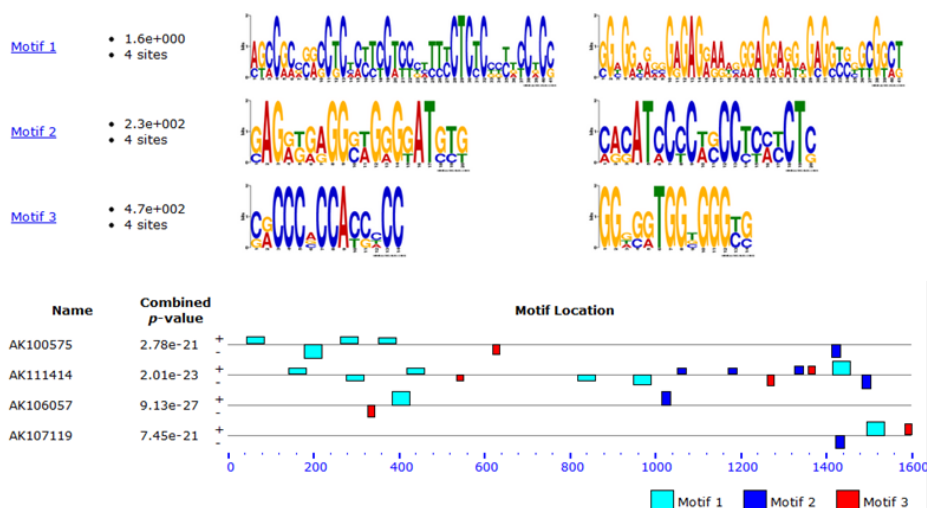


Figura 13 Análise de motivos conservados na região promotora (-1.500 a +100 pbs) para o grupo de quatro genes pouco regulados ou induzidos em deficiência de oxigênio.

Percebe-se que quando feita a análise de motivos dentro de grupos há certa concentração de motivos conservados na região próxima ao sítio de início da transcrição, diferentemente do que ocorre quando todos os sete genes são analisados em conjunto (Figura 14). Assim estima-se que a provável diferença

entre os grupos de expressão reside na região mais próxima ao sítio de início da transcrição.

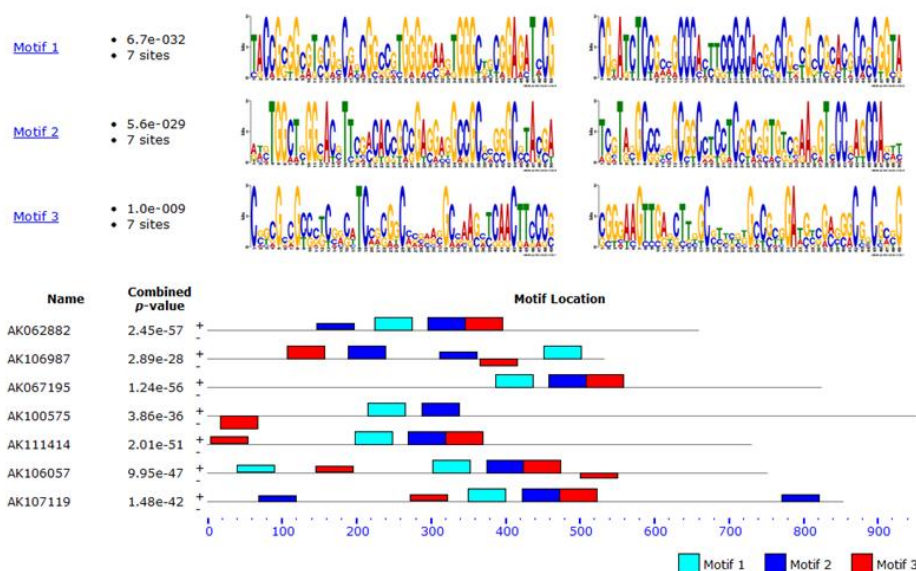


Figura 14 Análise de motivos conservados na região promotora (-1.500 a +100 pbs) para o grupo de sete genes estudados no Capítulo 2.

Considerando-se a nova informação obtida recortou-se a região de -500 à +100 pbs para realização de um novo alinhamento pelo *ClustalW2* obtendo-se um novo filograma (Figura 15).

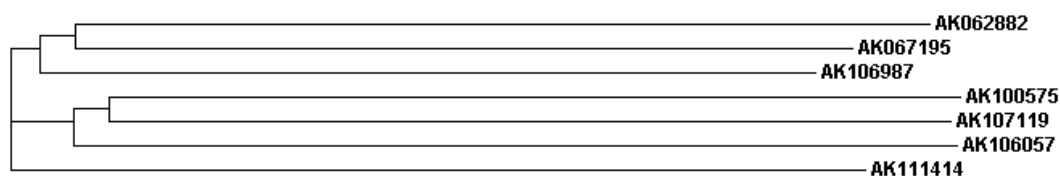


Figura 15 Filograma construído a partir de análise do alinhamento dos nucleotídeos da região promotora de cada gene (-500 a +100 pbs).

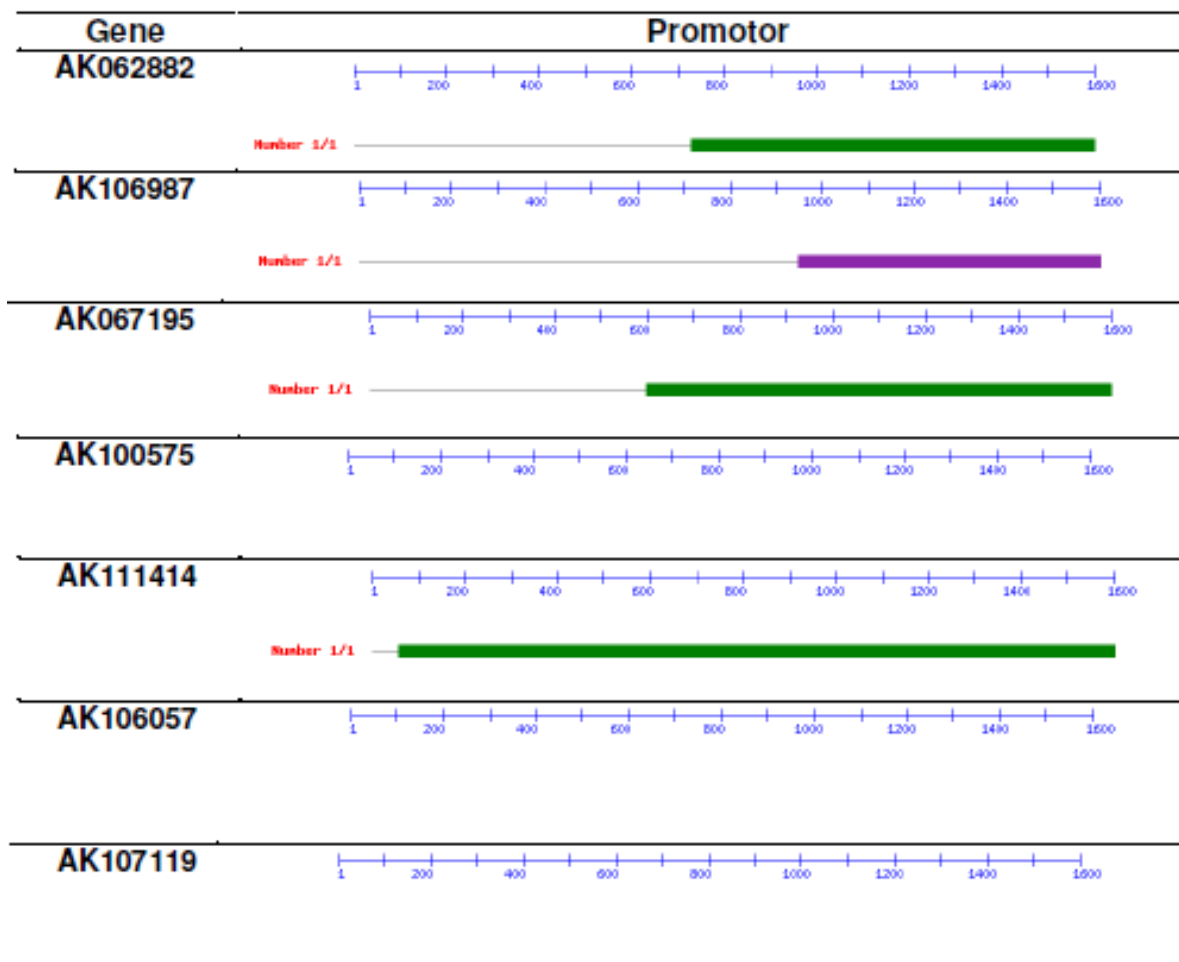
Percebe-se, pelo novo filograma obtido a partir do alinhamento das sequências próximas ao início da transcrição, que esta região parece ser a maior responsável pelas diferenças de expressão em estresse por hipoxia/anoxia, já que o novo agrupamento parece mais fiel às diferenças de expressão que o

anteriormente obtido, apesar de o gene *AK117119*, o qual é superexpresso, não se separar dos demais, como ocorre em todos os alinhamentos realizados até aqui.

A presença de grande quantidade de nucleotídeos C e G, encontrada junto aos motivos próximos ao início da transcrição, os quais parecem ser responsáveis pelas diferenças na expressão, leva à uma nova hipótese: que a regulação destes genes seja devida à diferenças de metilação, as quais podem impossibilitar a ligação de fatores de transcrição (STAM et al., 1998; ZILBERMAN et al., 2007) a essa região.

Efetua-se então a procura por ilhas CpG/CpNpG, através do *PlantPAN* (CHANG et al., 2008) (Tabela 6), na região promotora (-1.500 a +100 pbs) dos genes.

Tabela 6 Análise de ilhas CpG/CpNpG na região promotora (-1.500 a +100 pbs) dos sete genes estudados no Capítulo 2



*Caixas roxas são ilhas CpG/CpNpG na fita senso.

** Caixas verdes são ilhas CpG/CpNpG na fita antisenso.

Percebe-se a presença de ilhas CpG/CpNpG em todos os genes reprimidos por condições de hipoxia/anoxia. Além disso, observou-se que o *AK111414* também possui uma ilha especialmente grande quando comparada às demais. É difícil encontrar uma relação entre a ilha CpG/CpNpG presente no *AK111414* e seu comportamento transcricional, mas é possível que o comportamento diferencial tenha relação com a diferença de tamanho da ilha CpG/CpNpG.

É possível que a repressão por hipoxia/anoxia se deva à metilação da região próxima ao início da transcrição, considerando a existência de relatos de mudanças na metilação de certas regiões do genoma em resposta a estresses (KOVAR~IK et al., 1997).

Para obter dados sobre a metilação dessa região diferentes estratégias podem ser empregadas, sendo uma das mais precisas, a do sequenciamento após conversão com bissulfito (KOVALCHUK; ZEMP, 2010). Tal análise está sendo realizada em dois dos genes estudados (*AK106987* e *AK067195*) e maiores resultados deverão ser obtidos no futuro.

Outra análise importante a se fazer em conjunto com a análise de metilação é a da ocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos diferentes genes estudados. Muitos destes sítios já têm alguma informação sobre o possível papel do fator de transcrição o qual se liga a ele, desta forma é possível fazer inferências sobre a importância de determinada região em uma dada condição estressora, órgão ou estágio de desenvolvimento, por exemplo.

A demonstração do local de ligação para cada fator de transcrição em cada um dos sete genes é feita da Figura 16 a Figura 22. Tal análise foi realizada pelo *PlantPAN* e maiores especificações sobre a forma de análise podem ser encontradas nas seção referente a materiais e métodos.

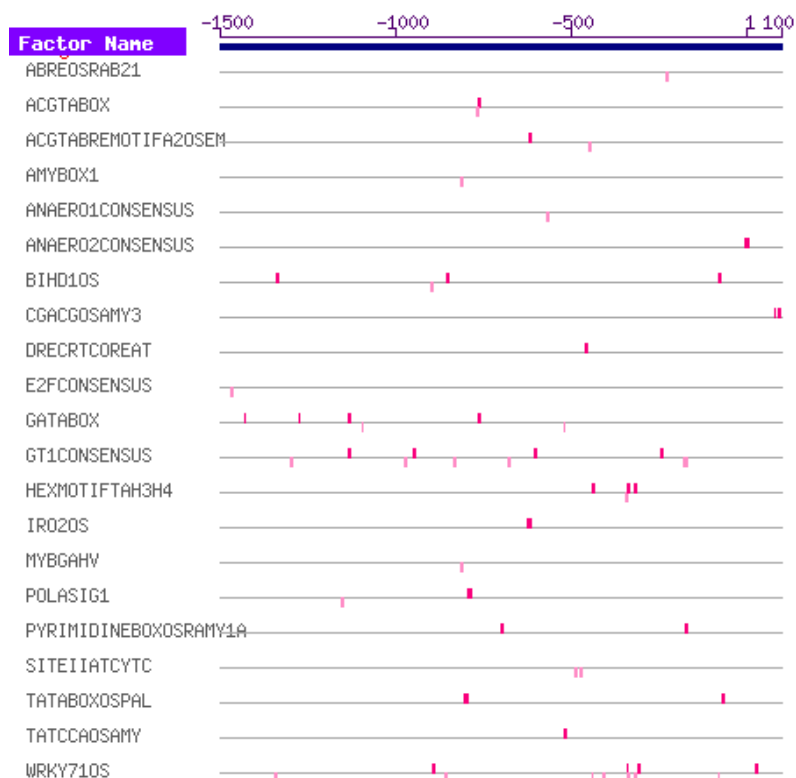


Figura 16 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os08g36920* (AK062882).

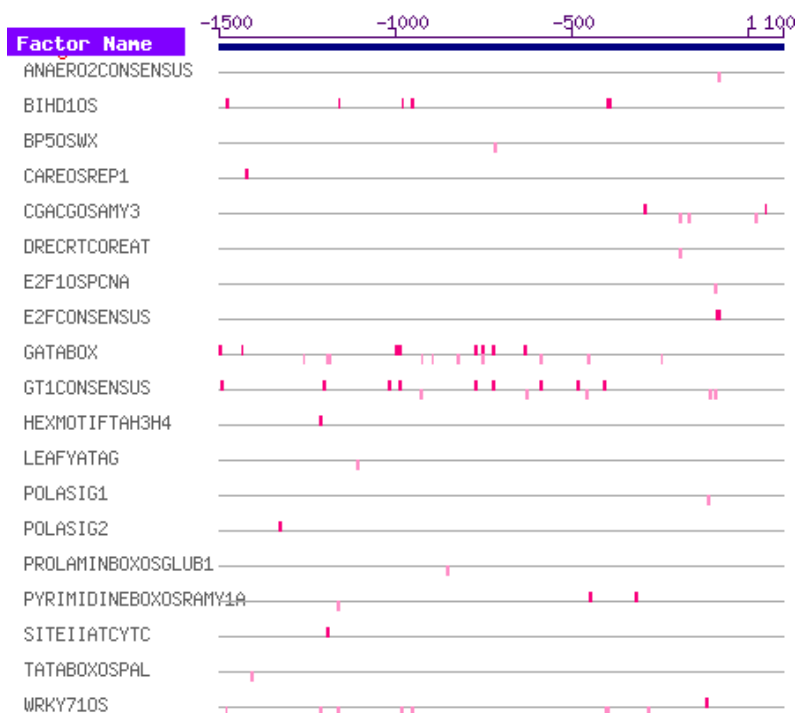


Figura 17 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os03g08490* (AK106987).

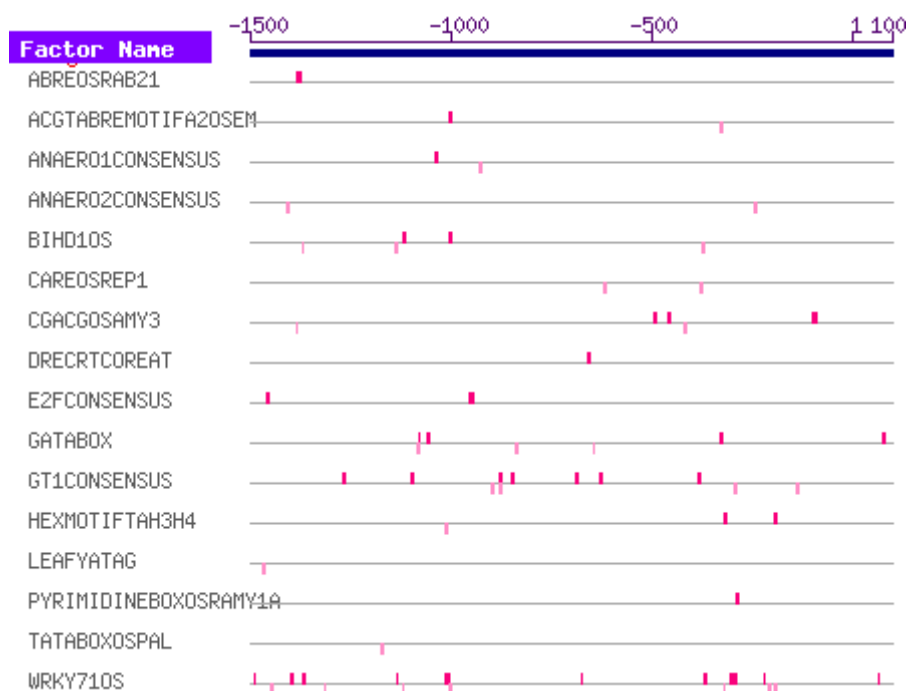


Figura 18 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os09g28440* (AK067195).

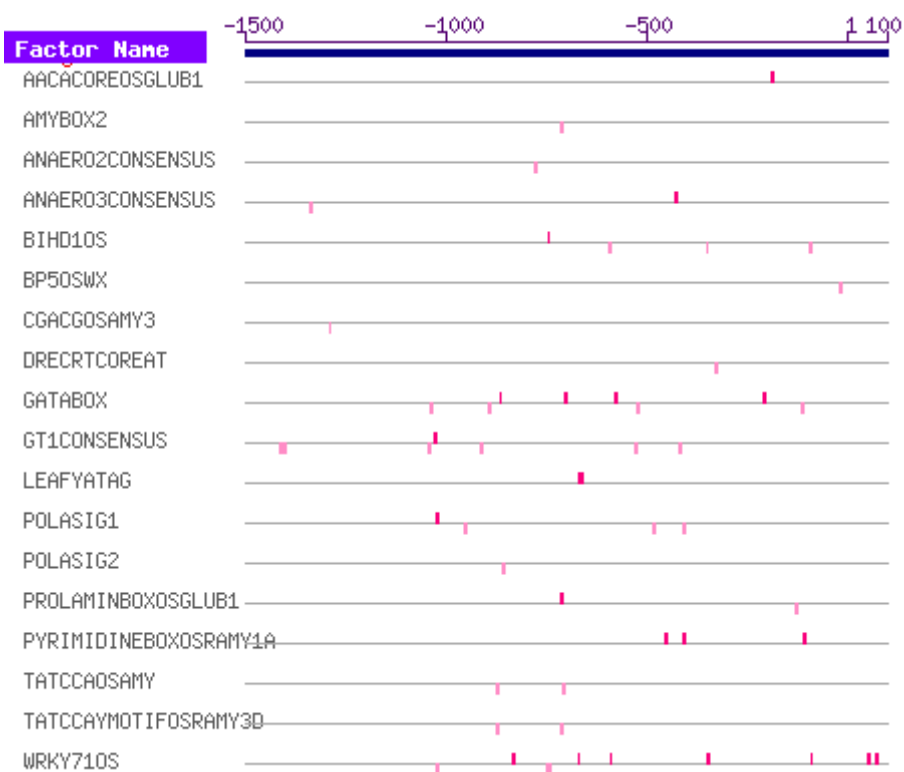


Figura 19 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os09g13940* (AK100575).

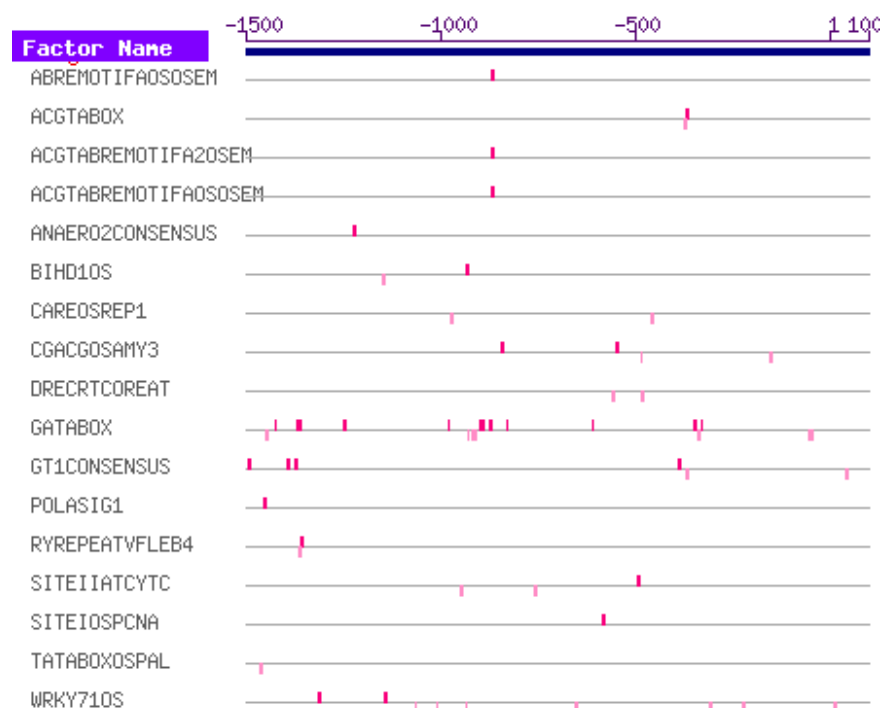


Figura 20 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os03g22170* (AK111414).

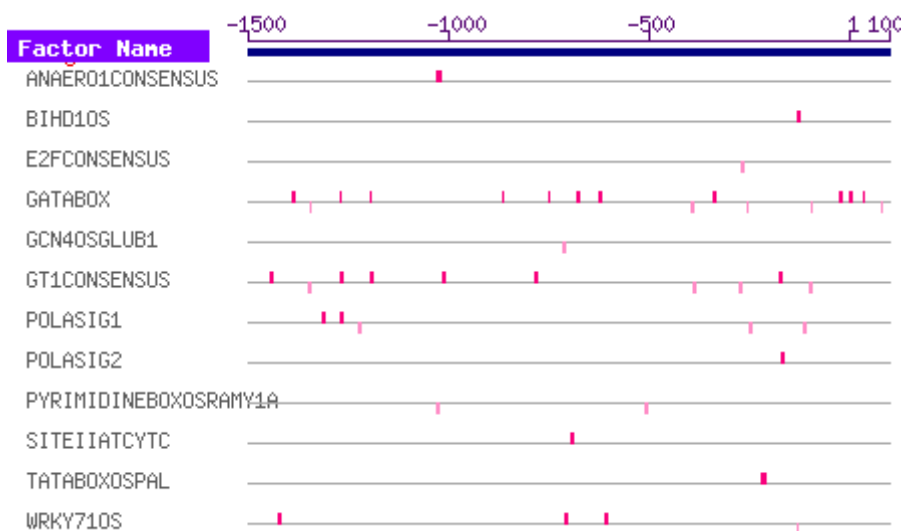


Figura 21 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os09g11480* (AK106057).

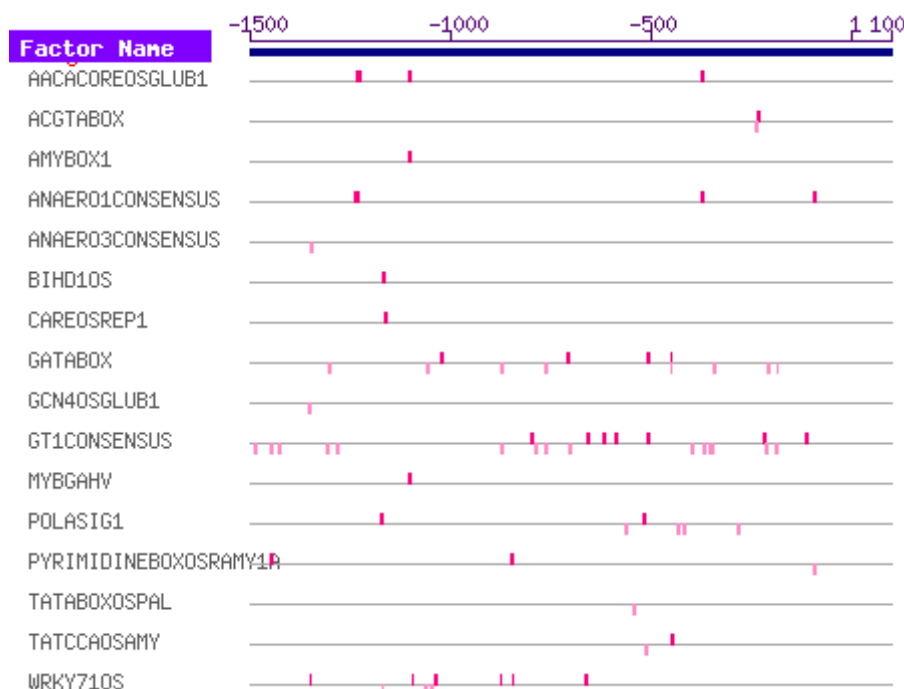


Figura 22 Sítios de ligação para fatores de transcrição encontrados na região promotora do gene *LOC_Os04g46400* (AK107119).

Nas diferentes figuras (Figura 16 a Figura 22) apresentadas é possível visualizar os locais específicos de ligação de diferentes fatores de transcrição, entretanto é difícil dizer quais deles têm especial importância dentro do contexto abordado simplesmente por uma análise visual direta, por isso, além da simples análise de ocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição, executou-se também a análise da coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição dentro dos sub-grupos de expressão previamente formados (Tabela 7 e Tabela 9) e no super-grupo de sete genes (Tabela 8).

Quando efetuada a análise dentro do grupo de genes reprimidos é possível se perceber a ocorrência de sítios de ligação como TATABOXOSPAL, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A, HEXMOTIFTAH3H4, E2FCONSENSUS, DRECRTCOREAT, CGACGOSAMY3 e ANAERO2CONSENSUS (marcados com *), os quais não têm ocorrência comum quando todos os genes são analisados em conjunto (Tabela 8).

Tabela 7 Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos três genes fortemente reprimidos em deficiência de hipoxia, utilizando a região de -1.500 a +100 pbs do gene. Sítios comuns aos genes reprimidos, mas não comum aos sete genes analisados como um todo são marcados por *.

Nº	Elemento Cis	Valor P
1	TATABOXOSPAL*	6.10351E ⁻⁰⁵
2	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A*	0.00024414
3	WRKY71OS	0.00390625
4	HEXMOTIFTAH3H4*	0.00024414
5	GT1CONSENSUS	0.00024414
6	GATABOX	0.00390625
7	E2FCONSENSUS*	1.52587E ⁻⁰⁵
8	DRECRTCOREAT*	0.00024414
9	CGACGOSAMY3*	0.00097656
10	BIHD1OS	0.00097656
11	ANAERO2CONSENSUS*	0.00024414

Tabela 8 Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos sete genes avaliados no estudo, utilizando a região de -1.500 a +100 pbs do gene.

Nº	Elemento Cis	Valor P
1	WRKY71OS	0,00390625
2	BIHD1OS	0,00097656
3	GT1CONSENSUS	0,00024414
4	GATABOX	0,00390625

Para complementar a análise de coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição, também se efetuou a análise de coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição dentro do grupo de genes não reprimidos por deficiência de oxigênio (Tabela 9). Nestes genes o único sítio de ligação incomum ao grupo total é o POLASIG1 (HEIDECKER; MESSING, 1986) o qual não parece ter especial significancia no contexto analisado.

Tabela 9 Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos quatro genes com expressão variável ou altamente expresso em deficiência de hipoxia, utilizando a região de -1.500 a +100 pbs do gene.

Nº	Elemento Cis	Valor P
1	WRKY71OS	0,00390625
2	POLASIG1	0,00024414
3	GT1CONSENSUS	0,00024414
4	GATABOX	0,00390625
5	BIHD1OS	0,00097656

Com respeito ao grupo de genes reprimidos em deficiência e oxigênio percebe-se a ocorrência de alguns sítios de ligação interessantes, como o ANAERO2CONSENSUS, o qual é encontrado em promotores de genes envolvidos com anaerobiose e rota fermentativa (MOHANTY et al., 2005) e o CGACGOSAMY3, o qual ocorre em regiões ricas em CG na RAMY3D (HWANG et al., 1998), uma α -amilase fortemente induzida em condições de anaerobiose (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). O fato destes ocorrerem na região proximal seria uma evidência de que a metilação dessa região possivelmente seja responsável pelo silenciamento destes genes, pois, se estes sítios de ligação são presentes em genes importantes na adaptação vegetal ao estresse por deficiência de oxigênio os fatores de transcrição necessários para sua ativação deverão estar presentes e, possivelmente, só não se ligam à região promotora destes genes devido a metilação da região em questão. Considerando-se a hipótese levantada realizou-se a análise da coocorrência de sítios de ligação na região de -500 a +100 pbs dos genes reprimidos, a qual é exibida na Tabela 10.

Tabela 10 Coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição nos promotores dos três genes fortemente reprimidos em deficiência de hipoxia, utilizando a região de -500 a +100 pbs do gene.

Nº	Elemento Cis	Valor P
1	ANAERO2CONSENSUS	0.00024414
2	BIHD1OS	0.00097656
3	CGACGOSAMY3	0.00097656
4	GT1CONSENSUS	0.00024414
5	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	0.00024414
6	WRKY71OS	0.00390625

Após análise de coocorrência de sítios de ligação para fatores de transcrição dentro do grupo de genes reprimidos especificamente na região de -500 a +100 pbs percebe-se que realmente estes sítios de ligação encontram-se presentes. Tal informação reforça a hipótese anteriormente levantada de que estes podem não contribuir para ativação transcricional devido à possível metilação e compactação daquela região da cromatina, o que impediria o acesso de fatores de transcrição e da RNA polimerase.

5.1.5 Análise da expressão transcricional de genes modificadores da cromatina pelo *Genevestigator*

Dada a possível importância diferencial da metilação na regulação de genes quando plantas se encontram sob estresse por deficiência de oxigênio decidiu-se procurar por genes que possivelmente tenham relação com modificações epigenéticas como desmetilases e proteínas com domínios de ligação a DNA metilado. Tais proteínas foram procuradas no *RAP-DB* e cinco genes encontrados nesta base de dados apresentavam também perfil de expressão nos bancos de dados do *Genevestigator* (Tabela 11).

Tabela 11 Cinco genes anotados como possíveis modificadores da cromatina e que têm perfil de expressão disponível no *Genevestigator*.

<i>ID RAP DB</i>	<i>ID MSU</i>	<i>Localização</i>	<i>Nome genérico</i>
<i>Os01t0218032-01</i>	<i>LOC_Os01g11900</i>	chr01:6452871..6455988	<i>Repressor of Silencing 1</i>
<i>Os02t0494700-00</i>	<i>LOC_Os02g29230</i>	chr02:17358716..17369016	<i>Repressor of Silencing 2</i>
<i>Os08t0485700-01</i>	<i>LOC_Os08g37920</i>	chr08:24015062..24020655	<i>Methyl-CpG DNA binding domain</i>
<i>Os05t0404600-01</i>	<i>LOC_Os05g33550</i>	chr05:19702828..19703739	<i>Methyl-CpG DNA binding domain</i>
<i>Os12t0620400-01</i>	<i>LOC_Os12g42550</i>	chr12:26425353..26430083	<i>Methyl-CpG DNA binding domain</i>

Diferentes tipos de estresse e estádios de desenvolvimentos estão disponíveis para análise. Através do gráfico tipo *heat map* obtido após análise no *Genevestigator* (Figura 23) percebe-se uma regulação diferencial de quatro genes, sendo que os *LOC_Os12g42550* e *LOC_Os08g37920* foram reprimidos em estresse por anaerobiose na germinação, enquanto que o *LOC_Os01g11900* e

LOC_Os05g33550 foram induzidos. Entretanto ao se comparar ambas germinações aeróbicas em diferentes tempos percebe-se que uma diferença de expressão muito semelhante ocorre, o que significa que provavelmente a diferença de expressão desses genes, nos diferentes tempos, se explique sim por mudanças ontogenéticas e não devido propriamente ao estresse por deficiência de oxigênio. Percebe-se ainda que tal regulação diferencial parece ser mais intensa logo que a semente inicia a germinação.

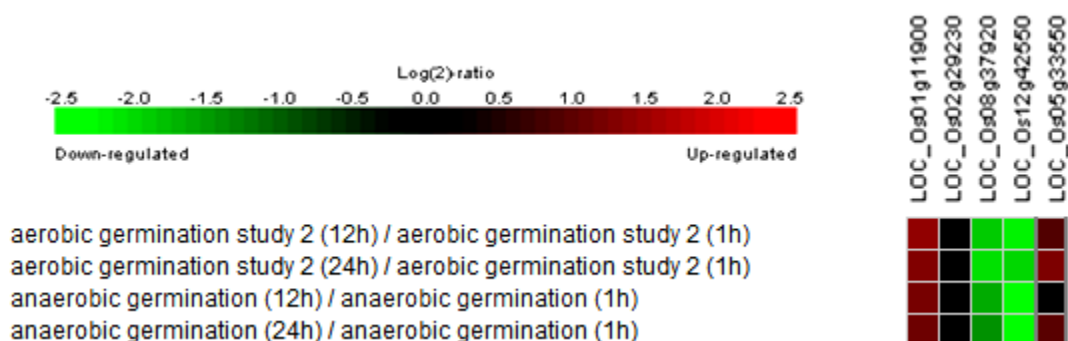


Figura 23 Análise a expressão transcricional dos cinco genes modificadores da cromatina em plântulas de arroz germinadas em condições de aero e anaerobiose.

Ao se comparar germinação aeróbica com germinação anaeróbica em plântulas com tempos iguais percebem-se mudanças transcricionais bastante diferentes das previamente observadas na análise anterior, sendo que neste caso os *LOC_Os01g11900* (*Repressor of Silencing*), *LOC_Os02g29230* (*Repressor of Silencing 2*) e *LOC_Os05g33550* (*Methyl-CpG DNA binding domain containing protein*) parecem apresentar pouca regulação diferencial enquanto que o *LOC_Os08g37920* (*Methyl-CpG DNA binding domain containing protein*) passa a ser levemente reprimido pela presença de oxigênio durante a germinação e o *LOC_Os12g42550* (*Methyl-CpG DNA binding domain containing protein*) ser levemente induzido nesta mesma condição.

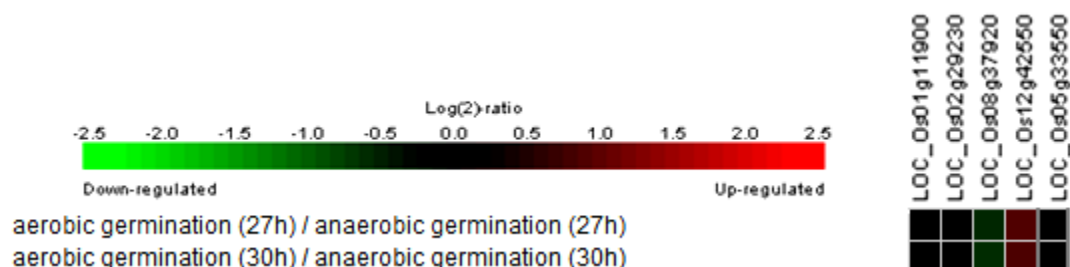


Figura 24 Análise a expressão transcricional dos cinco genes modificadores da cromatina em plântulas de arroz germinadas em condições de aero e anaerobiose, as quais, neste caso, têm semelhante tempo de vida.

De qualquer forma pode-se afirmar que genes importantes na regulação do desenvolvimento inicial das plantas, por meio da ativação e desativação de genes, parecem também sofrer influência de fatores ambientais, os quais podem determinar mudanças dos níveis de expressão de diversos genes por meio de modificações na cromatina.

Tais informações indicam que genes anotados como modificadores da cromatina necessitam de estudos mais aprofundados, bem como maiores análises da expressão transcricional, especialmente utilizando métodos mais apurados, como *qPCR*.

5.2 Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsáveis ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro

Treze genes, os quais foram selecionados para avaliação por não possuírem perfil de expressão disponível no *Genevesigator* são exibidos na Tabela 12.

Tabela 12 Os treze genes de *ERFs* selecionados, os quais não apresentam expressão nos bancos de dados do *Genevestigator* (<http://www.genevestigator.ethz.ch>).

<i>TIGR</i>	<i>RAP DB</i>	<i>FL-cDNA</i>	Localização	Nome Genérico
<i>LOC_Os02g51670</i>	<i>Os02t0752800</i>	<i>AK105991</i>	chr02:32504993..32506385	<i>OsERF#049</i>
<i>LOC_Os02g43970</i>	<i>Os02t0657000</i>	<i>AK108830</i>	chr02:27406962..27407999	<i>OsERF#035</i>
<i>LOC_Os01g07120</i>	<i>Os01t0165000</i>	<i>AK067313</i>	chr01:3355449..3357439	<i>OsERF#040</i>
<i>LOC_Os05g27930</i>	<i>Os05t0346200</i>	<i>AK099221</i>	chr05:16326086..16329397	<i>OsERF#042</i>
<i>LOC_Os03g08470</i>	<i>Os03t0183000</i>	<i>AK101949</i>	chr03:4347734..4349527	<i>OsERF#062</i>
<i>LOC_Os07g42510</i>	<i>Os07t0617000</i>	<i>AK109360</i>	chr07:26100975..26102728	<i>OsERF#065</i>
<i>LOC_Os06g09390</i>	<i>Os06t0194000</i>	<i>AK069833</i>	chr06:4730371..4732912	<i>OsERF#071</i>
<i>LOC_Os09g26420</i>	<i>Os09t0434500</i>	<i>AK104576</i>	chr09:16665433..16668645	<i>OsERF#072</i>
<i>LOC_Os09g11460</i>	<i>Os09t0286600</i>	<i>AK072749</i>	chr09:7006158..7007789	<i>OsERF#073</i>
<i>LOC_Os03g64260</i>	<i>Os03t0860100</i>	<i>AK109390</i>	chr03:37200039..37200955	<i>OsERF#083</i>
<i>LOC_Os09g39850</i>	<i>Os09t0572000</i>	<i>AK241281</i>	chr09:23731141..23731951	<i>OsERF#087</i>
<i>LOC_Os02g43820</i>	<i>Os02t0655200</i>	<i>AK241246</i>	chr02:27312467..27313939	<i>OsERF#095</i>
<i>LOC_Os02g32140</i>	<i>Os02t0521100</i>	<i>AK109226</i>	chr02:19813682..19814263	<i>OsERF#107</i>
<i>LOC_Os04g40950</i>	<i>Os04t0486600</i>	<i>AK064960</i>	chr04:24804606..24808210	<i>GAPDH</i>

Após análise por *qPCR*, de modo geral, percebeu-se que todos os *ERFs* analisados apresentam alguma regulação sob condições de estresse, tanto hipoxia como por anoxia, em ambas as cultivares em estudo (Figura 25 e Figura 26), entretanto, diferentemente dos *ERFs* analisados anteriormente, estes treze demonstram perfis de expressão bastante variáveis.

5.2.1.1 Cultivar Nipponbare

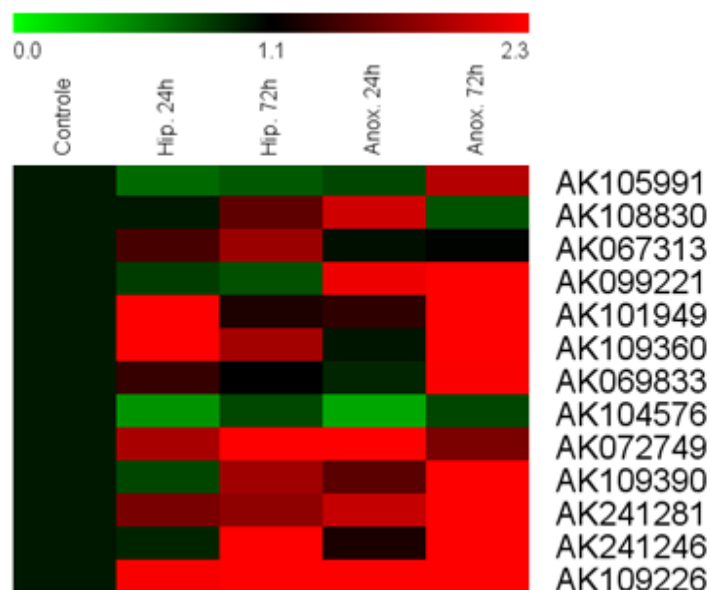


Figura 25 Expressão transcricional em folhas de plântulas da cv. Nipponbare submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio - Gráfico *heat map* construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por PCR em tempo real.

Observa-se que na cv. Nipponbare grande parte dos genes analisados (*AK101949*, *AK109360*, *AK072749*, *AK241281* e *AK109226*) são induzidos tanto em condições de anoxia como em condições de hipoxia, independentemente do tempo em questão. Já os genes *AK104576* e *AK105991*, em geral, parecem ser reprimidos, exceto para o *AK105991* em plântulas sob 72 horas de anoxia.

O gene *AK067313* é induzido em ambos os períodos de exposição à condições de hipoxia analisados, entretanto seu nível de expressão não foi muito alterado quando as plantas foram submetidas a condições de anoxia. Interessantemente, o gene *AK099221* sofre uma regulação contrastante quando comparando os dois estresses analisados, sendo gradativamente reprimido por hipoxia e gradativamente induzido por anoxia. O gene *AK069833* é induzido em ambos os tempos analisados em hipoxia, enquanto que, em anoxia, este é levemente reprimido nas primeiras 24 horas e fortemente induzido às 72 horas.

Os genes *AK109390* e *AK241246* são negativamente regulados nas primeiras 24 horas de hipoxia, apresentando indução às 72 horas. Esses genes

apresentam comportamento muito similar entre si também em condições de estresse por anoxia.

O gene *AK108830* não é afetado pelo estresse por hipoxia nas primeiras 24 horas, mas passa a ser induzido após esse período. Em condições de anoxia este gene é induzido às 24 horas após o início do estresse, mas apresenta uma redução do nível de transcritos após este período.

Considerando-se o fato de que em condições de anoxia não há produção de etileno (PERATA; VOESENEK, 2007) e que em condições de hipoxia ocorre alta produção de etileno (FUKAO et al., 2006), os resultados obtidos sugerem que os genes *ERFs* analisados não são totalmente dependentes de etileno. Além disso, verifica-se que embora os genes estudados façam parte da mesma família, não respondem de forma similar frente ao mesmo estresse, indicando a presença de uma regulação específica para cada membro da família *ERF* sob determinada condição ambiental.

Estudos disponíveis na literatura já têm demonstrado que alguns genes *ERFs* não são totalmente dependentes de etileno, e respondem a outros estímulos e hormônios (SAKUMA et al, 2002). Por exemplo, o aumento da expressão de *ERFs* sob condições de anoxia e hipoxia pode ser sinalizada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nessas condições. Pucciariello e Perata (2012) sugerem que a produção de ROS observada sob condições de baixos níveis de oxigênio esteja envolvida na rede de sinalização para a aclimação de plantas.

A regulação diferencial entre os genes pode ser explicada pela afinidade de cada um com determinado hormônio. Além do etileno, hormônios como ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmônico e ácido giberélico são capazes de regular a expressão de *ERFs* (SAKUMA et al, 2002).

Outros compostos, como ácido abscísico (ABA) bem como o estresse oxidativo, podem ter impacto na regulação de *ERFs* (FUKAO et al., 2011; LIU et al., 2012), de qualquer maneira é difícil dizer precisamente de que forma cada composto afeta a expressão de um dado *ERF*.

Sabe-se ainda que as respostas vegetais a diferentes estresses é algo complexo, que envolve diferentes genes (AARTS; FIER, 2003) e hormônios (ENGELBERTH; ENGELBERTH, 2009). Engelberth e Engelberth (2009) citam o ácido jasmônico, ácido salicílico e ácido abscísico como alguns dos fatores responsáveis pela resposta vegetal a estresses. Além disso, entre diversos genes, a importância de diferentes fatores de transcrição na resposta a estresse é também muito comentada (SINGH et al., 2002).

Considerando-se tal complexidade é difícil acreditar que os *ERFs* estudados, não só no segundo experimento, mas mesmo no primeiro, tenham resposta primariamente regulada pelo etileno, como é muitas vezes sugerido até mesmo por seu próprio nome. Os *ERFs* foram primeiramente identificados em tabaco, em quatro proteínas que se mostraram ter sítios de ligação a regiões *GCC Box* (domínio AP2) que são geralmente presentes em genes responsáveis por respostas fenotípicas a ação do etileno (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995) entretanto, os estudos que originaram o nome *ERF* para esta família de proteínas aconteceram em uma época em que ainda muito pouca informação sobre genomas e biologia molecular de plantas era disponível.

Foi possível se ver no experimento anterior, que muitos *ERFs* têm, em sua região promotora, sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, entre eles fatores de transcrição *WRKY*, os quais são bastante estudados e que se sabe ter ativação por fatores diversos (CHEN et al., 2012). Sabendo-se que fatores de transcrição podem agir em cascata (JIAO et al., 2007; QUAIL, 2007), é possível ainda que alguns *ERFs* promovam respostas similares ao etileno a partir de sinais bastante diferentes.

Estudo de McGrath et al. (2005), o qual comenta a importância do jasmonato na ativação de fatores de transcrição em *arabidopsis*, incluindo *ERFs* e *WRKY*, teve grande impacto na comunidade científica (GRENNAN, 2008).

Ainda antes dos artigos de McGrath et al. (2005) e Grennan (2008), Brown et al. (2003) demonstravam a importância da *GCC Box* do gene *PDF1.2* na regulação deste em resposta ao jasmonato em *arabidopsis*, mostrando a provável importância dos *ERFs* na resposta a estresse mediada por outros hormônios que

não o etileno. Novos estudos sobre as regiões promotoras de *ERFs* em resposta ao etileno, bem como a outros hormônios devem ser conduzidos. Apesar da grande complexidade de interação entre hormônios e o papel destes na resposta vegetal a estresses (ANDERSON et al., 2004) poder complicar bastante o entendimento dos fatores que, em separado, levam a regulação desses genes, uma maior quantidade de informações sobre a forma de regulação deles contribuirá fortemente para obtenção de transgênicos com transcrição controlada de acordo com determinadas condições ambientais estressoras.

5.2.1.2 Cultivar Bonança

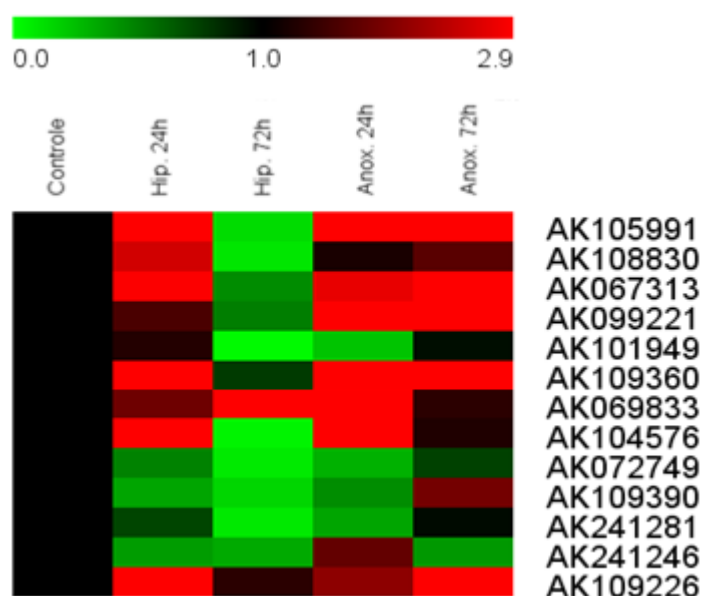


Figura 26 Expressão transcricional em folhas de plântulas da cv. Bonança submetidas aos estresses por deficiência de oxigênio - Gráfico *heat map* construído com base nos valores de quantificação relativa obtidos a partir da análise por PCR em tempo real.

Pela análise do perfil de expressão obtido para a cv. Bonança percebe-se uma forte repressão dos genes *AK105991*, *AK108830*, *AK067313*, *AK099221*, *AK101949*, *AK109360*, *AK104576*, *AK072749*, *AK109390*, *AK241281* e *AK241246* quando as plântulas atingem 72 horas de hipoxia. A forte repressão de uma grande quantidade de *ERFs* nessa fase avançada após submersão é

interessante e poderia ser creditada ao aumento de produção de etileno não fossem os resultados contrastantes obtidos na cv. Nipponbare.

Algo interessante percebido para a cv. Bonança é a resposta mais intensa dos *ERFs* aos diferentes estresses, tanto por repressão quanto por indução. Considerando-se uma maior suscetibilidade desta cultivar ao encharcamento estima-se que tal resposta mais intensa dos *ERFs* em estudo deva-se a danos já ocorridos e não propriamente a uma forma precoce de adaptação ao estresse.

Wang et al. (2007) demonstram, através de análise por microarranjo que genes que codificam fatores de transcrição se mostram diferencialmente expressos em arroz de sequeiro submetido à estresse por seca utilizando polietilenoglicol. Além desta constatação inicial, Wang et al. (2007) sugerem que tais genes mais expressos em arroz de sequeiro possam contribuir para um aumento de tolerância a seca em cultivares irrigadas bem como outras espécies intolerantes a tal estresse. Gao et al. (2009) também demonstram uma diferença de expressão em genes responsáveis por transdução de sinal em arroz de sequeiro submetido à estresse por seca. Sabe-se que *ERFs* têm papel na tolerância vegetal à estresse por seca (QUAN et al., 2010) e que estes podem ainda mediar um *crosstalk* entre tolerância à seca e submergência (FUKAO et al., 2011).

Trabalhos futuros comparando utilizando técnicas como, por exemplo, transgenia, poderão demonstrar se os *ERFs* reprimidos em hipoxia, na cv. Bonança, podem ser causadores de uma diferença de tolerância em comparação com a cv. Nipponbare. De qualquer forma, o padrão extremamente variável de resposta destes genes aos diferentes estresses testados nas duas diferentes cultivares, não parece indicar nenhum candidato em especial a participação na adaptação do vegetal a condições de submergência, nem mesmo nos possibilita apontar um fator determinante para regulação de sua expressão.

6 Conclusões

6.1 Conclusões Específicas

6.1.1 Experimento I - *Ethylene Response Factors* – Um estudo da resposta transcricional em arroz sob estresse por deficiência de oxigênio e excesso de ferro

Os genes em estudo apresentam expressão diferencial nos estresses analisados, tanto por deficiência de oxigênio, como por estresse por ferro.

Genes de regulação semelhante apresentaram maior similaridade na sua sequência de aminoácidos de acordo com as análises realizadas.

Genes de regulação semelhante também apresentaram maior similaridade entre si na região promotora, mas esta foi maior na região de -500 a +100 pbs do que na região de -1.500 a +100 pb, de acordo com os grupamentos previamente realizados.

Análises *in silico* indicam importância da regulação epigenética em alguns destes genes.

6.1.2 Experimento II - Perfil transcricional de treze fatores de transcrição responsáveis ao etileno em plântulas sob estresse por deficiência de oxigênio em cultivar de arroz irrigado e de sequeiro

A grande variação na regulação transcricional destes genes ao longo dos tempos e condições de estresse dificultam a eleição de genes fortes candidatos a adaptação vegetal a estresse.

A repressão de um grande número de *ERFs* às 72 horas foi detectada para a cv. Bonança.

A variação de expressão de muitos dos genes testados em plântulas sob estresses contrastantes para produção de etileno apoiam a ideia de que a regulação de muitos *ERFs* devem-se a outros sinais que não do etileno.

A variação mais intensa de muitos *ERFs* foi percebida para a cv. Bonança e não para a cv. Nipponbare.

7 Perspectivas

Mais estudos sobre a possibilidade de redundância funcional de *ERFs* são necessários.

Estudos através de sequenciamento após conversão com bissulfito, na região promotora dos genes, poderão verificar de forma mais precisa se a metilação realmente tem papel importante na regulação de *ERFs* em arroz sob condições de estresse.

Uma análise da regulação transcricional de genes relacionados com modificações epigenéticas também poderão trazer informações interessantes a respeito da importância da epigenética na regulação de *ERFs*.

Estudos bioquímicos ajudarão a dar noção dos fatores que influem na modificação da expressão de muitos *ERFs*.

Informações sobre modificações transcricionais e no metabolismo das cvs. Bonança e Nipponbare em tempos superiores a 72 horas de hipoxia poderão concluir se a repressão de uma grande quantidade de genes *ERF* detectada no atual estudo realmente pode proporcionar alguma capacidade diferenciada de adaptação a diferentes genótipos de arroz.

A possibilidade de que a regulação mais intensa dos *ERFs* na cv. Bonança se deva a danos já ocorridos no vegetal ainda necessita de mais estudos.

Referências Bibliográficas

AARTS, M.G.M.; FIERS, M. What drives plant stress genes? **Trends in Plant Science**, v. 8, nº3, p. 99-102, 2003.

ABELES, F.B. Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 23, p. 259-292, 1972.

ACHARD, P.; BAGHOUR, M.; CHAPPLE, A.; HEDDEN, P.; VAN DER STRAETEN, D.; GENSCHIK, P.; MORITZ, T.; HARBERD, N. P. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 6484-6489, 2007.

ALLEN, M.D.; YAMASAKI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TATENO, M.; SUZUKI, M. A novel mode of DNA recognition by a beta sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 17, p. 5485–5496, 1998.

ALPI, A.; BEEVERS, H.; Effects of O₂ concentration on Rice seedlings. **Plant Physiology**, v. 71, p. 30–34, 1983.

ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R.; KAZAN, K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 16, nº12, p. 3460-3479, 2004.

BABA, I. Physiological and ecological studies on ethylene in crop plants. II. Studies on the growth and physiology of rice plants as affected by water stress in relation to ethylene. **Nogaku Kenkyn**, v. 57, p. 73–86, 1978.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. *In*: **Anais da Reunião da Cultura do Arroz Irrigado** Florianópolis, p. 156-159, 1993.

BAILEY, T.L.; BODÉN, M.; BUSKE, F.A.; FRITH, M.; GRANT, C.E.; CLEMENTI, L.; REN, J.; LI, W.W.; NOBLE, W.S. "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching". **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W202-W208, 2009.

BAILEY-SERRES J.; VOESENEK L.A. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 313–339, 2008.

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.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 558-573, 2005.

BENCKISER, G.; OTTOW, J.C.G.; SANTIAGO. S; WATANABE. I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines, 1982.

BIRCHLER, J.A.; VEITIA, R.A. The Gene Balance Hypothesis: From Classical Genetics to Modern Genomics **The Plant Cell**, v. 19, p. 395–402, 2007

BOSSDORF, O.; RICHARDS, C.L.; PIGLIUCCI, M. Epigenetics for ecologists. **Ecology Letters**, v. 11, p. 106–115, 2008.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, p. 443–448, 1982.

BOYKO, A.; KATHIRIA, P.; ZEMP, F.J.; YAO, Y.; POGRIBNY, I.; KOVALCHUK, I. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants. **Nucleic Acids Research**, v.35, p.1714–1725, 2007.

BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Epigenetic control of plant stress response, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 61–72, 2008.

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. 341p. (Boletim Técnico, 30), 1973.

BROWN, R.L.; KAZAN, K.; McGRATH, K.C.; MACLEAN, D.J.; MANNERS J.M. A Role for the GCC-Box in Jasmonate-Mediated Activation of the *PDF1.2* Gene of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1020-1032, 2003.

BUI, A.Q.; O'NEILL, S.D. Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. **Plant Physiology**, v. 116, p. 419–428, 1998.

BURG S.P.; BURG E.A. Gas exchange in fruits. **Physiologia Plantarum**, v. 18, p. 870–884, 1965.

BÜTTNER, M.; SINGH, K.B. *Arabidopsis thaliana* ethylene responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 5961-5966, 1997.

CAMARGO, C.E.O DE; OLIVEIRA O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia, Campinas** v. 40, p. 21-23, 1981.

CATLING D. Rice in Deepwater. London: Macmillan Press; 1992.

CHANG, C; STADLER, R. Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. **Bioessays**, v. 23, p. 619-627, 2001.

CHANG, W.; LEE, T.; HUANG, H.; HUANG, H.; PAN, R. PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. **BMC Genomics**, v. 9, p. 561, 2008.

CHAVES, A.L.S.; MELLO-FARIAS, P.C. de. Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 508-515, 2006.

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- Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, p. 120-128, 2012.

CHEN, M.; LV, S.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. **Development, Growth; Differentiation**, v. 52, p. 555–566, 2010.

CHEN, Y.F.; RANDLETT, M.D.; FINDELL, J.L.; SCHALLER, G.E.; Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 19861-19866, 2002.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo. 2.ed. Lavras: Uflap.785, 2005.

CIGAN, A.M.; UNGER-WALLACE E.; HAUG-COLLET K. Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. **The Plant Journal**, v.43, p.929–940, 2005.

CROCKER, W.; KNIGHT, L.I. Effect of illuminating gas and ethylene upon flowering carnations. **Botanical Gazette**, v. 46, p. 259–276, 1908.

CHOI, C.-S.; SANO, H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. **Molecular Genetics; Genomics**, v. 277, p. 589–600, 2007.

COLANGELO, E.P.; GUERINOT, M.L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 322-330, 2006.

DALTON, C.C.; IQBAL, K.; TURNER, D.A. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. **Physiologia Plantarum**, v. 57, p. 472-476, 1983.

DE PAEPE, A. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. **Tese de Doutorado**, Ghent University 2004-a.

DE PAEPE, A.; VUYLSTEKE, M.; VAN HUMMELEN, P.; ZABEAU, M.; VAN DER STRAETEN, D. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 39, p. 537–559, 2004-b.

DE PAEPE, A.; VAN DER STRAETEN, D.; Ethylene biosynthesis and signaling: an overview. **Vitamins; Hormones**, v. 72, p. 399–430, 2005.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute** Manila, Philippines, 2000.

DUGARDEYN, J.; VAN DER STRAETEN, D.; Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**, v. 175, p. 59–70, 2008.

DYACHENKO, O.V.; ZAKHARCHENKO, N.S.; SHEVCHUK, T.V.; BOHNERT, H.J.; CUSHMAN, J.C.; BURYANOV, Y.I. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of Mesembryanthemum crystallinum plants on their adaptation to salt stress. **Biochemistry**, v. 71, p. 461–465, 2006.

EL BELTAGY, A.S.; HALL, M.A. Effect of water stress upon endogenous ethylene levels in *Vicia faba*. **New Phytologist**, v. 73, p. 47-59, 1974.

EL BELTAGY, A.S.; KHALIFA, M.M.; HALL, M.A. Salinity in relation to ethylene. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 6, p. 269-271, 1979.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Sistemas de Produção, 3 ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica Nov./2005

EMBRAPA. Origem e História do Arroz; <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm>> - Acessado no dia 29 de dezembro de 2010.

ENGELBERTH, M.J.; ENGELBERTH, J. Monitoring Plant Hormones During Stress Responses. **Journal of Visualized Experiments**, e1127, 2009.

FACHINELLO, J.C.; KERSTEN, E. Fitorreguladores *in*: NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J.C. Fruticultura - Fundamentos e Práticas. Pelotas - RS: Editora e Grafica UFPEL, v. 1000, p. 311, 1996.

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

FUKAO, T.; XU, K.; RONALD, P.C.; BAILEY-SERRES, J. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. **Plant Cell**, v. 18, p. 2021–2034, 2006.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 16814–16819, 2008.

FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES J. The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. **The Plant Cell**, v. 23, p. 412-427, 2011.

FUJIMOTO, S.Y.; OHTA, M.; USUI, A.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M.; Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression, **Plant Cell**, v. 12, p. 393–404, 2000.

GAGNE, J.M.; SMALLE, J.; GINGERICH D.J.; WALKER, J.M.; YOO, S.D.; YANAGISAWA, S.; VIERSTRA, R.D. Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 6803–6808, 2004.

GAO, Z.; CHEN, Y.F.; RANDLETT, M.D.; ZHAO, X.C.; FINDELL, J.L.; KIEBER, J.J.; SCHALLER, G.E.; Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, p. 34725-34732, 2003.

GAO, F.H.; ZHANG, H.L.; WANG, H.G.; GAO, H.; LI, Z.C. Comparative transcriptional profiling under drought stress between upland and lowland rice (*Oryza sativa* L.) using cDNA-AFLP. **Chinese Science Bulletin**, v.54, p.3555-3571, 2009.

GEHRING, M.; HENIKOFF, S. DNA methylation dynamics in plant genomes, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1769, p. 276–286, 2007.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**. v. 30, p. 1–47, 2003.

GIRARDIN, J.P.L. Einfluss des Leuchtgases auf die Promenaden- und Strassenbaume. **Jahresber. Agrikultur-Chemie**, v. 7, p. 199-200. 1864.

GOESCHL, J.D.; RAPPAPORT, L.; PRATT, H.K. Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. **Plant Physiology**, v. 41, p. 877-884, 1966.

GRATIVOL, C.; HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.C. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 2, p. 176-85, 2012.

GRENNAN, A.K. Ethylene response factors in jasmonate signaling and defense response. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1457-1458. 2008.

GRIST, D. H. **Rice**. 5.ed. London: Longman, 601p., 1978.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 477-497, 2003.

GU, Y.Q.; WILDERMUTH M.C.; CHAKRAVARTHY, S.; LOH, Y.T.; YANG C.; HE X.; HAN Y.; MARTIN, G.B. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 14, p. 817–831, 2002.

GUO, H.W.; ECKER, J.R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, v. 115, p. 667–677, 2003.

GUZMAN, P.; ECKER, J.R.; Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants, **Plant Cell**, v. 2, p. 513–523, 1990.

HALL, A.E.; BLEECKER, A.B.; Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the Arabidopsis ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. **Plant Cell**, v. 15, p. 2032–2041, 2003.

HALL, M.A.; SMITH, A.R. Ethylene and the responses of plants to stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 21, p. 71–79, 1995.

HARPHAM, N.V.J; BERRY, A.W.; HOLLAND, M.G.; MOSHKOV, I.E.; SMITH, A.R.; HALL, M.A. Ethylene binding sites in higher plants. **Plant Growth Regulation**, v. 18, p. 71–77, 1996.

HEIDECKER, G.; MESSING, J. Structural Analysis of Plant Genes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 439-466, 1986

HOLLICK, J.B.; PATTERSON, G.I.; COE, E.H.; CONE, K.C.; CHANDLER, V.L. Allelic interactions heritably alter the activity of a metastable maize PZ allele. **Genetics**, v. 141, p. 709–719, 1995.

HUA, J.; MEYEROWITZ, E.M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 94, p. 261–271, 1998.

HUANG, S.B.; GREENWAY, H.; COLMER, T.D.; MILLAR, A.H. Protein synthesis by rice coleoptiles during prolonged anoxia: implications for glycolysis, growth and energy utilization. **Annals of Botany**, v. 96, p. 703–715, 2005.

HWANG, Y.S.; KARRER, E.E.; THOMAS, B.R.; CHEN, L.; RODRIGUEZ, R.L. Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3D expression during sugar starvation. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 331-341, 1998.

IRGA - INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ. **Arroz irrigado no RS**: área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>> Acesso em: 10 de mar. 2004, 16:23:00.

IRGA - INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ. **Evolução da comercialização da safra 2010/2011**. Disponível em: >http://www.irga.rs.gov.br/uploads/anexos/1305914825Informacoes_para_o_site_do_IRGA_20_05_2011.pdf.> Acesso em: 26 de mar. 2012, 13:22:10.

JIAO, Y.; LAU, O.S.; DENG, X.W. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 217–230, 2007.

JONES, P.L.; VEENSTRA, G.J.; WADE, P.A.; VERMAAK, D.; KASS, S.U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOULIS, J.; WOLFFE, A.P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature Genetics**, v. 19, p. 187-91, 1998.

KALISZ, S.; PURUGGANAN, M.D. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution, **Trends in Ecology; Evolution**, v. 19, p. 309–314, 2004.

KAWASE, M. Effect of flooding on ethylene concentration in horticultural plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 97, p. 584, 1972.

KENDE, H.; BOLLER, T. Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit. **Planta**, v. 151, p. 476–481, 1981.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1-6, 1992.

KIEBER, J.J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, K.A.; ECKER, J.R. Ctr1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis,

encodes a member of the raf family of protein-kinases. **Cell**, v. 72, p. 427–441, 1993.

KIM, Y.S.; CHOI, D.; LEE, M.M.; LEE, S.H.; KIM, W.T. Biotic and Abiotic Stress-Related Expression of 1-Aminocyclopropane-l-carboxylate Oxidase Gene Family in *Nicotiana glutinosa* L. **Plant & Cell Physiology**, v. 39, p. 565-573, 1998.

KONINGS, H.; JACKSON, M.B. Relationship between rates of ethylene production by roots and the promoting or inhibiting effects of exogenous ethylene and water on root elongation. **Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie**, v. 92, p. 385–397, 1979.

KOVALCHUK, I.; ZEMP, F.J. Plant Epigenetics : Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 631, 2010.

KOVARČIK, A.; KOUKALOVÁ, B.; BEZDEČK, M.; OPATRŇ, Z. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 301–306, 1997.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. **Plant Physiology**, v. 144, p. 218-231, 2007.

LAW, J.A.; JACOBSEN, S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals, **Nature Reviews Genetics**. v. 11, p. 204–220, 2010.

LEWIN, B. Genes IX, Jones and Barlett Publishers, 2007.

LIEBERMAN, M. Role of ethylene in plant growth, development and senescence. In: B. Mandava, Editor, **Plant Growth Substances**, p. 115–134, 1979.

LIU, D.; CHEN, X.; LIU, J.; YE, J.; GUO, Z.; The rice *ERF* transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3899-3911, 2012.

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

LLOYD, A. Vector construction for gene overexpression as a tool to elucidate gene function. **Methods in Molecular Biology**, v. 236, p. 329-344, 2003.

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, p. 9578-9583, 2006.

LORETI, E.; POGGI, A.; NOVI, G.; ALPI, A.; PERATA, P.A. genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in arabidopsis seedlings under anoxia. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1130-1138, 2005.

MADLUNG, A.; COMAI, L. The effect of stress on genome regulation and structure. **Annals of Botany**, v. 94, p. 481-495, 2004.

MATHOOKO, F.M.; INABA, A.; NAKAMURA, R. Characterization of Carbon Dioxide Stress-Induced Ethylene Biosynthesis in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Fruit. **Plant Cell Physiology**, v. 39, p. 285-293, 1998.

McAULIFF, C. Solubility in water of paraffin cycloparaffin olefin acetylene cycloolefin and aromatic hydrocarbons. **Journal of Physical Chemistry**, v. 70, p. 1267–1268, 1966.

McGRATH, K.C.; DOMBRECHT, B.; MANNERS, J.M.; SCHENK, P.M.; EDGAR, C.I.; MACLEAN, D.J.; SCHEIBLE, W.R.; UDVARDI, M.K.; KAZAN, K. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. **Plant Physiology**, v. 139, p. 949-959. 2005.

McMANUS, M.T.; GRIERSON D. 100 Years of Ethylene – A Personal View. **Annual Plant Reviews**, v. 44, p. 1–17, 2012.

MEHLHORN, H.; WELLBURN, A.R. Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. **Nature**, v. 327, p. 417–418, 1987.

MILLENAAR, F.F.; COX, M.C.H.; BERKEL, Y. VAN; WELSCHEN, R.A.M.; PIERIK, R.; VOESENEK, L.; PEETERS, A.J.M.; Ethylene-induced differential growth of petioles in *Arabidopsis*. Analyzing natural variation, response kinetics, and regulation, **Plant Physiology**, v. 137, p. 998–1008, 2005.

MOHANTY, B.; KRISHNAN, S.P.T.; SWARUP, S.; BAJIC, V.B. Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. **Annals of Botany**, v. 96, p. 669-681, 2005.

MORGAN, P.W.; DREW, M.C. Ethylene and plant responses to stress. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 620-630, 1997.

MULLINS, E.D.; MCCOLLUM, T.G.; MCDONALD, R.E. Ethylene: A regulator of stress-induced ACC synthase activity in nonclimacteric fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 107, p. 1–7, 1999

NAKAGAWA, N.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the genes by auxin and wounding. **Plant; Cell Physiology**, v. 32, p. 1153-1163, 1991.

NAKAJIMA, N.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASCKI, H. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. **Plant; Cell Physiology**, v. 31, p. 1021-1029, 1990.

NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome wide analysis of the *ERF* gene family in arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v. 140, p. 411–432, 2006.

NELJUBOV, D. Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. **Pflanzen Beitrage und Botanik Zentralblatt**, v. 10, p. 128–139, 1901.

OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H.; Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **The Plant Cell**, v. 7, p. 173–182, 1995.

OLMEDO, G.; GUO, H.W.; GREGORY, B.D.; NOURIZADEH, S.D.; AGUILAR-HENONIN, L.; LI, H.J.; AN, F.Y.; GUZMAN, P.; ECKER, J.R. ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 50 kDa exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 13286–13293, 2006.

OSBORNE, D.J. Abscission. *Critical Reviews in Plant Sciences* v. 8, p. 103–129, 1989

OTSUKA, C.; MINAMI, I.; ODA, K. Hypoxia-Inducible Genes Encoding Small EF-Hand Proteins in Rice and Tomato. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 2463–2469, 2010

PEGORARO, C.; MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; FARIAS, D. da R.; MAIA L. C. da; ROMBALDI C.V.; OLIVEIRA A.C. de. Expression profiling under stress conditions of rice *ERF* gene family. **Dados Não Publicados**, 2012.

PEISER, G.D.; YANG, S.F. Ethylene and ethane production from sulfur dioxide injured plants. **Plant Physiology**, v. 63, p. 142–145, 1979.

PEÑA-CASTRO, J.M.; VAN ZANTEN, M.; LEE, S.C.; PATEL, M.R.; VOESENEK, L.A.J.C.; FUKAO, T.; BAILEY-SERRES J. Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. **The Plant Journal**, v. 67, p. 434–446, 2011.

PENG, H.; ZHANG, J. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: potential applications and challenges in plant breeding. **Progress in Natural Science**, v. 19, p. 1037–1045, 2009.

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

PERATA, P.; VOESENEK, L.A.C.J. Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 43–46, 2007.

PEREIRA, J. A. **A cultura do arroz no Brasil**: subsídios para a sua história. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 226p.

PIERIK, R.; CUPPENS, M.L.C.; VOESENEK, L.; VISSER, E.J.W. Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2928–2936, 2004.

POTUSCHAK, T. VANSIRI, A. BINDER, B.M. LECHNER, E. VIERSTRA, R.D. GENSCHIK, P. The exoribonuclease XRN4 Is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 18, p. 3047–3057, 2006.

PUCCIARIELLO, C.; PERATA, P. How plants sense low oxygen. **Plant Signaling and behavior**, v. 7, p. 813-816, 2012.

PUNTA, M.; COGGILL, P.C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNEILL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A.; FINN, R. D., The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n°D1, p.D290-D301. 2012.

QUAIL, P. Phytochrome-regulated gene expression. **Journal of Integrated Plant Biology**, v. 49, p. 11–20, 2007.

QUAN, R.; HU, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; HUANG, R. Overexpression of an *ERF* transcription factor TSRF1 improves rice drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 476–488, 2010.

REID, M.S., WU, M.J. Ethylene and flower senescence. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 37–43, 1992.

RICHARDS, C.L.; BOSSDORF, O.; PIGLIUCCI, M. What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution? **Bioscience**, v. 60, p. 232–237, 2010.

RICHARDS, E.J. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 395–402, 2006.

SACHS, M.M., FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, v. 20, p. 761–767, 1980.

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, opensource system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, p. 374-378, 2003.

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

SAHRAWAT, K.L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association. **Annual Report 1995**, p. 34–35, 1996.

SAIKA, H., MATSUMURA, H., TAKANO, T., TSUTSUMI, N., NAKAZONO M. A. A point mutation of Adh1 gene is involved in repression of coleoptile elongation under submergence in rice. **Breeding Science**, v. 56, p. 69–74, 2006.

SAKUMA, Y., LIU Q, DUBOUZET, J.G., ABE, H., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKA, K. DNA-binding specificity of the *ERF/AP2* domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 998–1000, 2002.

SINGH, K.B.; FOLEY, R.C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 430-436, 2002.

SMALLE, J., VAN DER STRAETEN, D., Ethylene and vegetative development, **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 593–605, 1997-a.

SMALLE, J.; HAEGMAN, M.; KUREPA, J.; VANMONTAGU, M.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene can stimulate Arabidopsis hypocotyl elongation in the light. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 2756–2761, 1997-b.

SMITH, K.A.; RUSSELL, R.S. Occurrence of ethylene and its significance in anaerobic soil. **Nature**, v. 222, p. 769-771, 1969.

SOLANO, R.; STEPANOVA, A.; CHAO, Q.; ECKER, J.R. Nuclear events in ethylene signalling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-

INSENSITIVE3 and ETHYLENE RESPONSE FACTOR1. **Genes and Development**, v. 12, p. 3703–3714, 1998.

STAM, M.; VITERBO, A.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, p. 6165–6177, 1998.

STAN, H.; SCHICKER, S. Effect of repetitive ozone treatment on bean plants—stress ethylene production and leaf necrosis. **Atmospheric Environment**, v. 16, p. 2267–2270, 1982.

STEFFENS, B.; SAUTER, M. Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 139, p. 713–721, 2005.

STEWART, N.; KUSANO, T.; SANO, H. Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 3250–3259, 2000.

STOKES, T.L.; KUNKEL, B.N.; RICHARDS, E.J. Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. **Genes Development**, 2002. v. 16, p. 171–182, 2002.

TANG, X.; CHANG, L.; WU, S.; LI, P.; LIU, G.; WANG N.N. Auto-regulation of the promoter activities of Arabidopsis 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes AtACS4, AtACS5, and AtACS7 in response to different plant hormones. **Plant Science**, v. 175, p. 161–167, 2008.

TARIQ, M.; PASZKOWSKI, J. DNA and histone methylation in plants, **Trends in Genetics**, v. 20, p. 244–251, 2004.

TINGEY, D.T.; PETTIT, N.; BARD, L. Effect of chlorine on stress ethylene production. **Environmental and Experimental Botany**, v. 18, p. 61–66, 1978.

UMEDA, M.; UCHIMIYA, H. Differential transcript levels of genes associated with glycolysis and alcohol fermentation in rice plants (*Oryza sativa* L.) under submergence stress. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1015–1022, 1994.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 113–122, 2006.

VANDENBUSSCHE, F.; VRIEZEN, W.H.; SMALLE, J.; LAARHOVEN, L.J.J.; HARREN, F.J.M.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased. **Light Intensity**, v. 133, p. 517–527, 2003.

VANDENBUSSCHE, F.; VAN DER STRAETEN, D. Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 499–506, 2004.

VANDENBUSSCHE, F.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F.F.; VOESENEK, L.A.; VAN DER STRAETEN D. Reaching out of the shade. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 462–468, 2005.

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.

VOESENEK, L.A.C.J.; BAILEY-SERRES, J. Genetics of high-rise Rice. **Nature**, v. 460, p. 959-960, 2009.

WADDINGTON C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, p. 563-565, 1942.

WANG, H.; ZHANG, H.; GAO, F.; LI, J.; LI Z.; Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, p. 1109-1126, 2007.

WANG, T.; ARTECA, R.N. Effects of Low O₂ Root Stress on Ethylene Biosynthesis in Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Heinz 1350), **Plant Physiology**, v. 98, p. 97-100, 1992.

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

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.

XU, K.N.; MACKILL, D.J. A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 219–224, 1996.

YAMAUCHI, M.; PENG, X.X. Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. **Plant and Soil**, v. 173, p. 21-28, 1995.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 155-189, 1984.

YU, Y.; YANG, S.F.; Biosynthesis of wound ethylene. **Plant Physiology**, v. 66, p. 281–285, 1980.

ZAREMBINSKI, T.I.; THEOLOGIS, A. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 363–373, 1993.

ZEMACH, A.; MCDANIEL, I.E.; SILVA, P.; ZILBERMAN, D. Genome-wide evolutionar analysis of eucaryotic DNA methylation, **Science**, v. 328, 2010.

ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S.W.; CHEN, H.; HENDERSON, I.R.; SHINN, P.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E.; ECKER, J.R. Genome wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis, **Cell**, v. 126, p. 1189–1201, 2006.

ZHOU, J.; TANG, X.; MARTIN, G.B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 16, p. 3207–3218, 1997.

ZILBERMAN, D.; GEHRING, M.; TRAN, R.K.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nature Genetics**, v. 39, p. 61–69, 2007.

ZIMMERMANN P.; LAULE O.; SCHMITZ J.; HRUZ T.; BLEULER S.; GRUISSEM W. Genevestigator Transcriptome Meta-Analysis and Biomarker

Search Using Rice and Barley Gene Expression Databases. **Molecular Plant**, v. 5, p. 851-857, 2008.