

## SUPER EXPRESSÃO DE GENES DE PEROXIDASES (EC 1.11.1.7) EM ARROZ SOB ESTRESSE POR TOXIDEZ DE FERRO

**TESSMANN, Elisane W.<sup>1</sup>; FINATTO, Taciane<sup>1</sup>; MAIA, Luciano C. da<sup>1</sup>;  
PICAULT, Nathalie<sup>2</sup>; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio<sup>1</sup>;**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Centro de Genômica e Fitomelhoramento, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade de Perpignan Via Domitia, Laboratório de Genoma e Desenvolvimento de Plantas, Perpignan, França

### 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo (FAOSTAT, 2008), é um dos principais cultivos dos países em desenvolvimento onde desempenha um importante papel tanto econômico quanto social (GOMES e JÚNIOR, 2004). Adicionalmente, o arroz é uma planta modelo entre as monocotiledôneas, por apresentar um pequeno genoma (~389 Mpb) já sequenciado para a cultivar Nipponbare subespécie *japonica* (IRGSP, 2005).

O melhoramento genético é uma ferramenta importante pois possibilita a obtenção de plantas mais adaptadas, com maior produtividade e qualidade de grãos, além da resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos. Dentre os estresses abióticos observados no cultivo do arroz, encontra-se a toxidez por ferro. O ferro é um micronutriente essencial que participa de processos como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de clorofila, entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2004). Contudo, a presença de ferro em excesso em solos alagados ou encharcados, onde condições anaeróbicas ocorrem e os íons  $Fe^{3+}$  são reduzidos a  $Fe^{2+}$  e disponibilizados facilmente para as plantas, promove a absorção excessiva deste elemento pelas plantas causando sintomas como retardamento do crescimento, bronzeamento das folhas, e em casos extremos ocorre a morte da planta, podendo ocasionar perdas consideráveis na produção (MEURER, 2000).

Em condições de estresse abiótico ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) acarretando em destruição oxidativa da célula. As EROs são formadas em etapas de redução univalente a partir do oxigênio molecular. O primeiro passo na redução de  $O_2$  produz radicais superóxidos, os quais não conseguem atravessar membranas biológicas. Os superóxidos podem oxidar aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano e causar a peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares (BREUSEGEM *et al.*, 2001). A redução do oxigênio também gera peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual atravessa as membranas e se distribui a partir do local de sua produção. A última e mais reativa espécie a ser formada nessa reação é o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ). Esse radical é formado pela redução do  $H_2O_2$  por íons metálicos ( $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) na reação de *Fenton* e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

O grupo das peroxidases inclui enzimas capazes de catalisar a transferência do hidrogênio de um doador para o  $H_2O_2$  (ROSSI *et al.*, 1997). A ação desse grupo de enzimas constitui uma proteção antioxidativa, atuando como

recicladoras ou *scavenger* impedindo a ação tóxica de EROs na célula vegetal (SCHOPFER, *et al.*, 2001; MITTLER, 2002).

O objetivo deste trabalho foi identificar genes codificadores de peroxidases diferencialmente expressos em folhas de arroz (*Oryza sativa* L. spp *japonica*) cv. Nipponbare em condições de toxidez por ferro em solução nutritiva.

## 2 METODOLOGIA

As sementes da cv. Nipponbare (*Oryza sativa* L. spp. *japonica*) foram pré-germinadas e ao atingirem cerca de 5 mm de radícula, foram transferidas para baldes contendo solução nutritiva completa conforme descrito por Camargo e Oliveira (1981), aeração ausente e pH 5,5. As plantas foram cultivadas nestas condições por duas semanas. O delineamento experimental foi completamente casualizado com três repetições. No décimo quarto dia, as plantas da solução controle foram trocadas para uma nova solução nutritiva completa e pH 5,5 ao passo que as plantas da solução tratamento foram trocadas para solução nutritiva completa adicionada de 7mM de FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O + EDTA e pH 4,5, permaneceram nesta solução durante quatro dias. Transcorrido esse período, procedeu-se a coleta das amostras as quais permaneceram armazenadas a – 80° até a extração do RNA total.

A extração de RNA total foi realizada a partir de tecidos de folhas utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. Posteriormente as amostras foram purificadas com o kit RNeasy (Qiagen) e a qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose, e por espectrofotometria. Para hibridização no microarranjo foi realizada a síntese do cDNA a partir do RNA mensageiro, segundo o protocolo *Synthesis of Double-Stranded cDNA* (NimbleGen), utilizando o kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen). Em seguida a qualidade do cDNA foi aferida por espectrofotometria. Posteriormente o cDNA foi enviado para a NimbleGen, onde as três repetições de cada condição (controle – solução nutritiva normal) e a condição tratamento (com estresse por ferro na concentração de 7mM) foram marcadas com cy3 (*single channel*) e hibridizadas com as sondas do microarranjo *Rice transposome array v.2.0*. O microarranjo *Rice transposome array v.2.0* foi desenvolvido pela Equipe de Elementos Transponíveis e Genoma de Plantas (*Équipe Éléments Transposables et Génomes des Plantes* - TEPG) e produzido com a tecnologia NimbleGen™ sendo composto por cerca de 385.000 sondas/oligonucleotídeos selecionadas pelo conteúdo GC, T<sub>m</sub> (*temperature melting*), este microarranjo contém 90.000 sondas representando 45.000 genes do arroz *Oryza sativa* ssp. *japonica* (2 sondas/oligonucleotídeos por gene). Os oligonucleotídeos foram construídos para a extremidade 3' dos genes no intuito de detectar as fitas sintetizadas pela transcriptase reversa. A análise dos dados de expressão foi realizada utilizando o software R (*R Development Core Team*), e os pacotes Limma e Biobase do software Bioconductor. Foi realizado o teste T Bayesiano e o método de ajustamento por BH (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995) para rejeitar o máximo de falsos positivos (FDR - *False Discovery Rate*) entre os oligonucleotídeos diferencialmente expressos. A anotação dos genes foi realizada no banco de dados do RAP-DB (*Rice Annotation Project Database*) e a ontologia gênica foi realizada utilizando o programa Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Considerando o  $\log_2(\text{fold-change})$  maior que 1,5 (ou nível de expressão de 2,83) foram encontrados quatro genes codificadores da enzima peroxidase com expressão significativa, *Os01g0327100*, *Os05g0162000*, *Os12g0111800*, *Os11g0112200* (Tabela 1). Para três genes foram encontrados os dois oligonucleotídeos do microarranjo correspondentes diferencialmente expressos em folhas de arroz após quatro dias de exposição a dose de 7mM de ferro em solução nutritiva. O maior nível de expressão foi evidenciado para o gene *Os05g0162000*, com valores de expressão média em  $\log_2$  de 2,25 e 2,31. Não foram observados genes de peroxidases sub-expressos considerando  $\log_2(\text{fold-change})$  menor que 1,5.

Tabela 1. Genes codificadores da enzima peroxidase (ec:1.11.1.7) e nível expressão (*fold-change*) dos oligonucleotídeos correspondentes no microarranjo, em folhas de arroz (*Oryza sativa* L. spp. *japônica*) sob estresse por toxidez de ferro. CGF- FAEM/UFPeI, 2010.

<b>Locus Gênico</b>	<b>Número de oligonucleotídeos super-expressos</b>	<b>Log2(Fold-Change)</b>
<i>Os01g0327100</i>	2	1,51
		1,81
<i>Os05g0162000</i>	2	2,25
		2,31
<i>Os12g0111800</i>	2	1,84
		2,32
<i>Os11g0112200</i>	1	2,09

Na ontologia gênica (Tabela 2) foi verificado que os quatro genes participam do processo biológico de resposta ao estresse oxidativo, de três funções moleculares, como atividade de oxidorredutase ou seja na catálise de reações de oxidação-redução (redox) na qual o grupo peróxido atua como um acceptor de elétrons, como ligante do grupo heme e de cátions, e estão localizados na região intracelular ou numa vesícula envolvida por uma bicamada lipídica.

Tabela 2. Ontologia gênica (nível 4) para os quatro genes de peroxidases (*Os01g0327100*, *Os05g0162000*, *Os12g0111800*, *Os11g0112200*) super-expressos em folhas de arroz (*Oryza sativa* L. spp. *japônica*) sob estresse por toxidez de ferro. CGF- FAEM/UFPeI, 2010.

<b>Processo Biológico</b>	<b>Função Molecular</b>	<b>Componente Celular</b>
GO:0006979 Resposta ao estresse oxidativo	GO:0016684 Atividade de oxidorredutase; atuando como acceptor sobre o peróxido	GO:0044424 Parte intracelular
	GO:0020037 Ligante do grupo Heme	GO:0016023 Vesícula circundada por membrana localizada no citoplasma
	GO:0043169 Ligante de Cátions	

## 4 CONCLUSÕES

Os genes *Os01g0327100*, *Os05g0162000*, *Os12g0111800* e *Os11g0112200* codificadores de peroxidases estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em *O. sativa* spp *japonica* sob estresse por toxidez de ferro. Considerando que as peroxidases protegem a planta contra o estresse oxidativo, o estudo da expressão destes genes em cultivares sensíveis e tolerantes poderá auxiliar na compreensão do mecanismo de tolerância em genótipos de arroz.

## 5 REFERÊNCIAS

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p. 405-414, 2001.

CAMARGO, O.C.E., 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.

CONESA A, GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ J.M.; TEROL, J.; TALÓN M, ROBLES, M.; Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics** v.21: 3674-3676, 2005.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>, acessado em 15 de julho de 2010.

GOMES, A. S.; JÚNIOR, A. M. M. Arroz Irrigado no Sul do Brasil. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológicas**, 2004.

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

MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Gênese, 2000.

ROSSI, C.; LIMA, G.P.P.; HAKVOORT, D.M.R.; Atividade de peroxidases (ec 1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. *Scientia Agricola*. V.54:13, p.217-220 Piracicaba, **Scientia Agricola**, 1997.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G.; Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid. **Plant Physiology**, v.125, pp. 1591–1602, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.