

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM PLANTAS DE ARROZ SOB ESTRESSE SALINO

GABRIELA DOS SANTOS RODRIGUES¹; ISABEL LOPES VIGHI²; LETÍCIA CARVALHO BENITEZ²; PRISCILA ARIANE AULER²; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL²; GABRIELA PERES MORAES²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹*Gabriela dos Santos Rodrigues – gabrielarodrigues2094@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – isavighi@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal de elevado valor socioeconômico, sendo alimento básico para mais da metade da população do mundo (HADIARTO E TRAN, 2011). Considerado uma cultura moderadamente sensível à salinidade, regiões costeiras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina que utilizam água para irrigação de fontes conectadas ao Oceano Atlântico sofrem sua influência. Em condições de estresse elevado, o sal leva à morte da planta. Mas, em condições de moderadas a baixa, o estresse salino afeta o crescimento e, assim, os sintomas estão associados à alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (IRRI, 2015).

A alta concentração de NaCl prejudica o transporte de elétrons e provoca uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxílico ($\bullet OH$) e oxigênio singleto (1O_2) (FOYER E NOCTOR 2000; BEZRUKOVA ET AL. 2008; WANG et al. 2010). Para amenizar o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram um sistema de defesa constituído de enzimas que catalisam as reações de neutralização das espécies reativas de oxigênio. Dentre as principais enzimas removedoras de EROs (*scavenging*) pode-se citar a superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1), que participa da primeira linha de defesa contra a produção de espécies reativas de oxigênio. A SOD é uma metaloenzima, capaz de converter o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em O_2 e H_2O_2 que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como por exemplo, a catalase (SALVADOR E HENRIQUES, 2004). Os genes que codificam as SODs participam da rota metabólica para remoção do radical superóxido, juntamente com outros genes que codificam enzimas capazes de eliminar o produto tóxico das SODs (H_2O_2), como, por exemplo, as catalases e ascorbato peroxidase (DEUS, 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão diferencial dos genes da superóxido dismutase (SOD) em folhas de dois genótipos de arroz contrastantes (tolerante/sensível), submetidas ao estresse salino.

2. METODOLOGIA

Sementes dos dois genótipos foram colocadas para germinar em incubadora BOD com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 14 horas, permanecendo nestas condições por 14 dias. Após este período, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação em sistema de cultivo hidropônico tipo *floating* em bandejas com capacidade de 20 litros. Em cada bandeja foi utilizada uma lâmina de isopor com 150 células. Foram semeadas 75 plantas de cada genótipo; sendo utilizadas 3 bandejas para cada tratamento. Foi utilizada a

solução nutritiva de YOSHIDA et al. (1976) até as plantas atingirem o estágio de quatro folhas. Após este período foi adicionada solução nutritiva normal nas bandejas controle e solução nutritiva + 150 mM de NaCl nas bandejas de salinidade. A coleta do material para as análises (folhas) realizada da seguinte forma: 0 hora: C1 (coleta 1) = plantas não expostas ao sal; C2 = 6 horas de sal; C3 = 24 horas de sal; C4 = 48 horas de sal e C5 = 72 horas de sal.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar vegetal, utilizando o kit *PureLink Plant RNA Reagent* (Invitrogen®), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram tratadas com DNase e a quantidade de RNA total foi mensurada através de análises de absorbância (NanoDrop, ND-1000) a 260 e 280 nanômetros, cuja relação fornece uma estimativa da pureza do RNA. A qualidade e integridade do ácido nucléico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 µg RNA total em um volume final de 20 µL utilizando a enzima *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit* (Invitrogen®).

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o kit de detecção *SYBR® Green* (Applied Biosystems®, California, USA). As reações foram realizadas em termociclador BIORAD® modelo Termociclador C1000™ Thermal Cycler com volume final de 12 µL. Para todas as reações foram utilizadas três repetições experimentais e os resultados da quantificação relativa da expressão foram calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001) e Schefeet et al. (2006). Utilizou-se como normalizador interno da reação o gene *UBQ10* (AK101547).

Foram desenhados *primers* para a região codificadora dos genes de arroz: *OsSOD-Cu/Zn*, *OsSODB-Fe*, *OsSOD-Fe*, *OsSODA1-Mn*, *OsSOD₄-Cu/Zn*, *OsSOD₃-Cu/Zn*, *OsSOD₂-Cu/Zn*, *OsSODCc1-Cu/Zn* cujos números de acesso e sequências genômicas foram buscados no RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o mesmo genótipo submetido ao estresse salino nos diferentes tempos (0, 6h, 24h, 48h e 72h), os níveis de transcritos das várias isoformas da SOD foram diferenciados (Figura 1). Entre os diferentes tempos de exposição ao sal, a expressão dos oito genes da SOD foi significativamente aumentada em plantas submetidas à 72h de estresse, para o genótipo tolerante (BRS Bojuru), quando comparado ao tratamento controle (sem exposição ao sal), com exceção dos genes *OsSOD₄-Cu/Zn* (QR=1,63) e *OsSODB-Fe* (QR=1,26). Para o genótipo sensível (BRS Pampa), aumentos significativos de expressão foram observadas para os genes *OsSODB-Fe* (24 h de estresse), *OsSOD-Fe* (6 h e 72 h de estresse), *OsSODA1-Mn* (6 h de estresse), *OsSOD₄-Cu/Zn* (48 h e 72 h de estresse) e *OsSODCc1-Cu/Zn* (24 h e 48 h de estresse), enquanto para o gene *OsSOD₂-Cu/Zn*, observou-se uma redução da expressão gênica na presença do estresse salino. Quanto ao gene *OsSOD₃-Cu/Zn* observou-se uma resposta similar quanto ao padrão de expressão nos diferentes tempos de estresse (Figura 1). A maior diferença entre as isoformas da SOD está nas sequências reguladoras dos genes que codificam estas proteínas e cada proteína responde de modo diferenciado ao estresse oxidativo, em diferentes níveis (Fink e Scandalios, 2002). A regulação positiva das SODs está envolvida na luta contra o estresse oxidativo e tem um papel crítico na sobrevivência das plantas sob estresses ambientais (Gill e Tuteja, 2010).

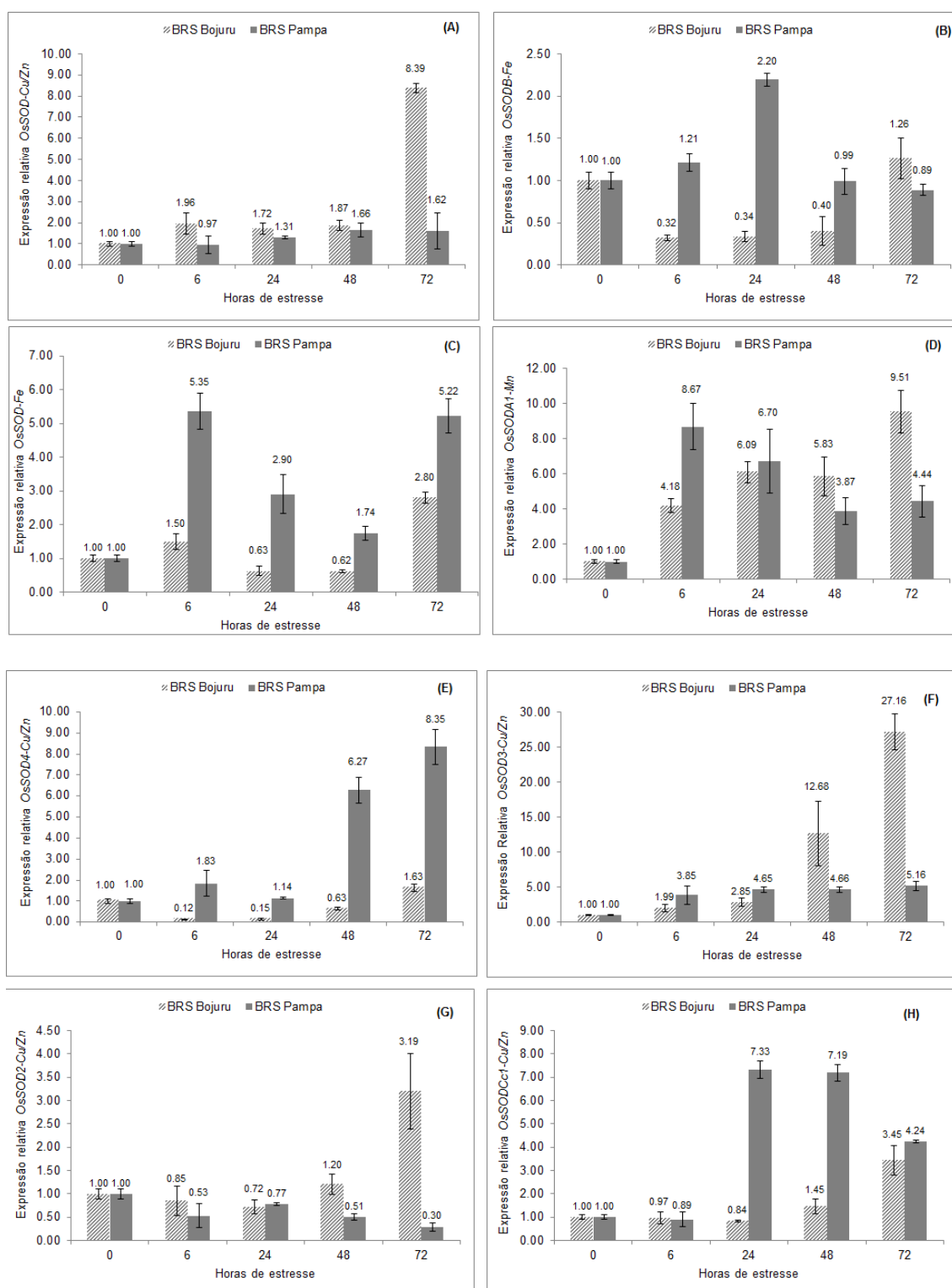


Figura 1: Quantificação relativa (QR) da expressão diferencial dos genes de SOD determinada por RT- qPCR, submetidos à diferentes tempos de estresse salino.

4. CONCLUSÕES

Quanto as oito isoformas de SOD avaliadas nesse estudo, conclui-se que há variação no padrão de expressão para um mesmo genótipo quando imposto ao estresse salino. No genótipo tolerante os maiores índices de expressão ocorrem às 72 horas. No genótipo sensível a resposta é variável em função do gene e tempo de exposição ao estresse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEZRUKOVA, M; KILDIBEKOVA, A; SHAKIROVA, F. WGA reduces the level of oxidative stress in wheat seedlings under salinity. **Plant Growth Regul** 54:195–201, 2008.
- FINK, RC; SCANDALIOS, JG. Molecular Evolution and struture-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2002, 399(1)19-36.
- FOYER, CH; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol** 146:359–388, 2000.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.
- HADIARTO T, TRAN LP. Progress studies of drought-responsive genes in rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, 2011, 30(3)297-310.
- IRRI (**International Rice Research Institutes**). Disponível em <http://www.irri.org>. Acesso em 20 de junho de 2015.
- KARINNE EVARISTO DE DEUS, K. E. **ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM PLANTAS DE ARROZ DE TERRAS ALTAS SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA**. 2014.128f. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia.
- LIVAK, K.J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real- time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- SALVADOR M, HENRIQUES JAP. **Radicais livres e a resposta celular ao dano oxidativo**. 1ª edição. Canoas, RS: editora ULBRA, 2004.
- SCHEFE, J. H.; LEHMANN, K. E; BUSCHMANN, I. R.; UNGER, T.; FUNKEKAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v.84, p. 901-910, 2006.
- WANG, YC; QU, GZ; LI, HY; WU, YJ; WANG, C; LIU, GF; YANG, CP. Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from Tamarix androssowii. **Mol Biol Rep** 37:1119–1124, 2010
- YOSHIDA S.; FORNO D.A.; COCK J.H.; GOMEZ K.A. Laboratory manual for physiological studies of rice, 3rd ed. **International Rice Research Institutes, Manila, Philippines**, 1976, p. 61.