

## EXPRESSÃO DOS GENES CODIFICADORES DA ENZIMA CATALASE E SUA CORRELAÇÃO EM PLANTAS DE ARROZ SOB ESTRESSE SALINO

GABRIELA DOS SANTOS RODRIGUES<sup>1</sup>; ISABEL LOPES VIGHI<sup>2</sup>; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL<sup>2</sup>; PRISCILA ARIANE AULER<sup>2</sup>; LETICIA CARVALHO BENITEZ<sup>2</sup>; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – gabrielarodrigues2094@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – theoamaral@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais importantes, porém seu rendimento é muito sensível à salinidade (ZENG, 2005). 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 ( $O_2\cdot^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (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 catalase (CAT), que é um potente antioxidante, cuja expressão varia com a intensidade do estresse. A CAT é encontrada em todos os organismos aeróbios e catalisa a conversão de duas moléculas de  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  pela transferência de dois elétrons, principalmente nos peroxissomos e glioxisossomos (ZENG et al., 2010). O  $H_2O_2$  formado nestas organelas pode ser originado a partir de eventos de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo de purinas (GILL; TUTEJA, 2010).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar, em dois genótipos de arroz submetidos ao estresse salino, o padrão de expressão dos genes codificadores da enzima Catalase e sua correlação com a atividade enzimática e níveis de Peróxido de Hidrogênio e Peroxidarão Lipídica.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido com dois genótipos de arroz, que apresentam respostas contrastante ao estresse salino, BRS Pampa (sensível) e BRS Bojuru (tolerante). Sementes foram germinadas em rolo de papel *germitest* em câmara de germinação climatizada e posteriormente, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação em sistema de cultivo hidropônico do tipo *floating*, constituído de bandejas contendo solução nutritiva de Yoshida et al. (1976). As plantas foram cultivadas nestas condições até apresentarem quatro folhas (estádio V4). Após este período, para simular o estresse salino, adicionou-se 150 mM de NaCl à solução nutritiva. A coleta do material para as análises (folhas) foi realizada à 0 h (tratamento controle); 6 h ; 24 h ; 48 h e 72 h de estresse. O delineamento experimental foi completamente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao estresse), com três repetições por tratamento.

Para a determinação de Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e Peroxidação Lipídica a concentração do  $H_2O_2$  foi determinada de acordo com Velikova (2000). A determinação da atividade da Catalase foi realizada conforme descrito por Azevedo et al. (1998).

O RNA total foi extraído a partir de 0,1 g de folhas utilizando-se o reagente *PureLink® Kit* (Invitrogen™). Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit *SuperScriptFirst-Strand System for RT-PCR* (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. Utilizou-se como normalizador interno da reação o gene *UBQ10* (AK101547).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no genótipo BRS Bojuru aumentou 2,0 vezes às 72 horas em relação ao controle. Para o genótipo BRS Pampa ocorreu decréscimo no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual diferiu apenas do tempo de 24 h. Observou-se diferença entre os genótipos, somente no tratamento controle (Tabela 1).

Para a variável peroxidação lipídica, o genótipo BRS Bojuru apresentou diminuição significativa nos níveis de MDA em todos os tempos de estresse. Entretanto, para o genótipo BRS Pampa, ocorreu aumento a partir de 24 h de estresse, chegando a 2,08 vezes mais MDA às 72 h. O genótipo tolerante apresentou níveis de peroxidação lipídica inferiores aos do genótipo sensível, independente do tempo de exposição à salinidade (Tabela 1).

A atividade da enzima Catalase manteve-se estável ao longo do tempo de avaliação nos dois genótipos avaliados, sendo que os mesmos diferiram significativamente entre si nos tempos de 6 e 48 h com valores superiores no genótipo BRS Pampa (Tabela 1).

De acordo com Miller et al. (2009), embora seja atribuído um papel deletério a grande parte das EROs, alguns autores defendem o seu papel como sinalizador molecular das condições ambientais, em particular ao peróxido de hidrogênio, portanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado não foi direcionado para a peroxidação lipídica.

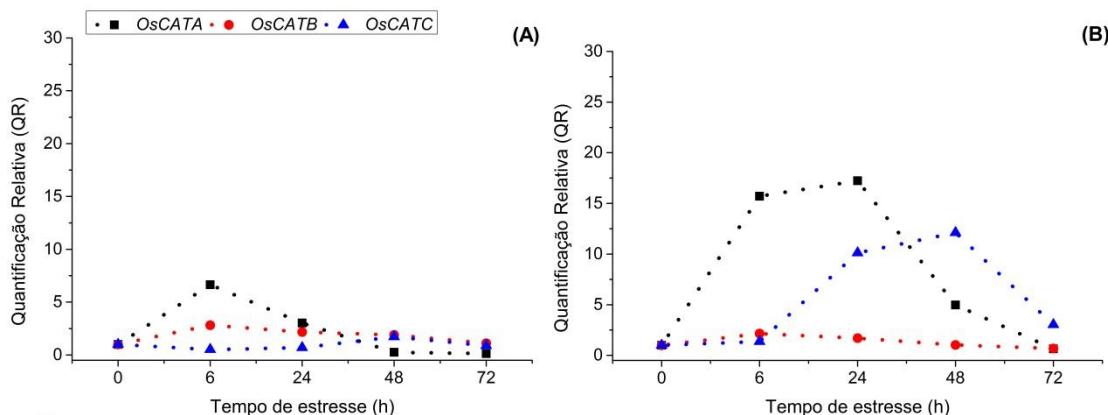
**Tabela 1.** Conteúdo de peróxido de hidrogênio,peroxidação lipídica e atividade da catalase em folhas de dois genótipos de arroz submetidos a condições de salinidade (150 mM de NaCl)

<b>Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>					
Genótipo	Tempos de estresses (horas) à salinidade				
	0	6	24	48	72
BRS Bojuru	0,30 Bb <sup>(*)</sup>	0,37 Ba	0,38 Ba	0,56 Aa	0,60 Aa
BRS Pampa	0,57 Aa	0,47 Aa	0,37 Ba	0,53 Aa	0,52 Aa
<b>Peroxidação lipídica (MDA)</b>					
BRS Bojuru	34,41 Aa <sup>(*)</sup>	22,02 Ba	23,24 Bb	21,58Bb	16,91 Cb
BRS Pampa	38,64Ca	27,93Da	41,77 Ca	72,33 Ba	80,60 Aa
<b>Atividade da catalase</b>					
BRS Bojuru	0,16 Aa*	0,14 Ab	0,15 Aa	0,13 Ab	0,18 Aa
BRS Pampa	0,17 Aa	0,19 Aa	0,15 Aa	0,17 Aa	0,15 Aa

(\*) Letras maiúsculas comparam o tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas os genótipos dentro de cada tempo de estresse pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

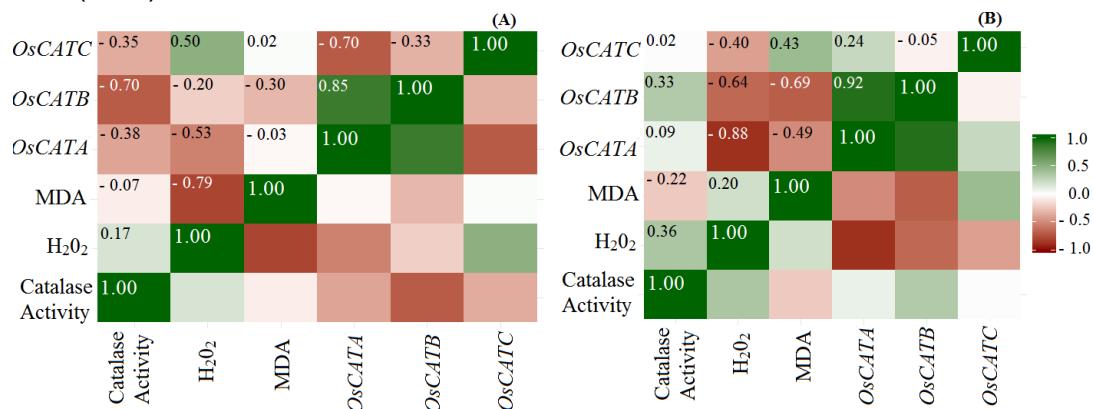
Os dados de expressão relativa indicam que os genes OsCATA e OsCATB são os mais responsivos à salinidade no genótipo tolerante (Figura 1A). No genótipo sensível, o gene OsCATA apresentou maior expressão às 24 h de exposição ao sal. Contrariamente,

o gene *OsCATC* apresentou valores de expressão superiores ao controle no genótipo sensível em todos os tempos, evidenciando a resposta contrastante entre os genótipos na resposta deste gene (Figura 1B). Foram encontrados resultados semelhantes por Turan; Tripathy (2013), os quais também observaram aumento nos níveis de transcritos do gene homólogo *OsCATA* para genótipos de arroz tolerantes e sensíveis à salinidade, porém este correlacionou-se de maneira positiva com a atividade da enzima.



**Figura 1.** Quantificação Relativa (QR) da expressão dos genes codificadores da Catalase (CAT) em folhas dos genótipos de arroz submetidos à salinidade (150 mM de NaCl). **A** - BRS Bojuru e **B** - BRS Pampa.

A amplitude de variação dos valores de correlação foi de -0.79 a 0.85, entre as variáveis analisadas para BRS Bojuru e de -0.88 a 0.92 para BRS Pampa (Figura 2A e 2B). No genótipo tolerante, considerando a correlação existente entre a atividade da enzima Catalase e as demais variáveis, observou-se correlação negativa entre as mesmas, exceto entre atividade CAT/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuja correlação foi positiva, porém de baixa magnitude (0.17).



**Figura 2.** Correlação de Pearson entre todas as variáveis analisadas experimentalmente nos genótipos de arroz BRS Bojuru (A) e BRS Pampa (B) em condições de salinidade (150 mM de NaCl). Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); Peroxidação lipídica (MDA).

As correlações entre atividade da CAT e expressão dos genes que codificam esta proteína foram negativas. Porém, entre os genes *OsCATA*/*OsCATB* foi observada correlação positiva (0.85), ou seja, em condições de salinidade ocorre aumento da expressão de *OsCATA* paralelamente ao aumento da expressão de *OsCATB*. Por outro lado, estes dois genes apresentaram correlação negativa com *OsCATC* (Figura 2A). Respostas contrastantes foram evidenciadas no genótipo sensível, para o qual foram

encontradas estimativas de correlação positiva entre atividade CAT/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.36) e atividade CAT/OsCATB (0.33). Dentre os genes, a maior correlação foi entre OsCATA/OsCATB (0.92) e a menor entre OsCATB/OsCATC (-0.05) (Figura 2B).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o genótipo sensível mantém melhor equilíbrio entre conteúdo de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividade da Catalase. No genótipo tolerante, OsCATA e OsCATC são os mais responsivos ao estresse salino. O gene OsCATC é o mais indicado para diferenciar genótipos com resposta contrastante ao estresse por salinidade. Entretanto há correlação positiva entre atividade da Catalase/OsCATB para o genótipo tolerante em estresse salino.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-29, 1998.
- 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.
- MILLER, G.; HONIG, A.; STEIN, H.; SUZUKI, N.; MITLER, R.; ZILBERSTEIN, A. Unraveling delta 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression proline oxidation enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 26482–26492, 2009.
- TURAN, S.; TRIPATHY, B. C. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation. **Protoplasma**, v. 250, p. 209–222, 2013.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, p. 59-66, 2000.
- YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. 3rd edition. International Rice Research Institutes, Manila, Philippines, 1976. 61 pp.
- ZENG, H. W.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; QIAN, S. L.; ZHANG, F.; ZHANG, D. B. Optimization of catalase production and purification and characterization of a novel cold-adapted Cat-2 from mesophilic bacterium *Serratia marcescens* SYBC-01. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 701-708, 2010.
- ZENG, L. Exploration of relationships between physiological parameters and growth performance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under salinity stress using multivariate analysis. **Plant and Soil**, v. 268, p. 51-59, 2005.