

ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM GENÓTIPOS DE ARROZ COM TOLERÂNCIA CONTRASTANTE SUBMETIDOS A ESTRESSE POR BAIXA TEMPERATURA

ALEXANDRE PEREIRA LEIVAS¹; PRISCILA ARIANE AULER²; MARCELO
NOGUEIRA DO AMARAL²; ISABEL LOPES VIGHI²; LETÍCIA CARVALHO
BENITEZ²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³;

¹Universidade Federal de Pelotas – alexandreleivas@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – pri_auler@hotmail.com; theoamaral@hotmail.com;
isavighi@hotmail.com; lecbenitez@gmail.com;

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

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura que evoluiu em áreas tropicais e subtropicais e é sensível ao estresse por baixas temperaturas, o que pode afetar sua distribuição geográfica e produtividade (KOVACH et al., 2007; SANG e GE, 2007). Este cereal é cultivado em uma ampla gama de ambientes (tropicais, subtropicais e temperados). No entanto, por ser uma cultura tropical com metabolismo C3, ela se adapta melhor em temperaturas quentes com alta radiação solar (KARKI et al., 2013). Diferentes níveis de tolerância a baixas temperaturas são observados dependendo da subespécie. As cultivares japônicas costumam produzir melhor em regiões com menores temperaturas anuais e geralmente apresentam maior tolerância ao frio quando comparado com cultivares indicas (MA et al., 2015).

Estima-se que o frio cause algum tipo de dano em aproximadamente sete milhões de hectares de arroz irrigado em todo o mundo, e no cone sul, da América do Sul, cerca de um milhão de hectares estão sujeitas a este problema (CRUZ et al., 2000). Devido a isso, estudos que busquem estratégias de minimizar perdas ocasionadas por baixas temperaturas são de extrema importância para assegurar as altas produtividades.

Estresses abióticos fazem com que as plantas produzam uma quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode levar a peroxidação lipídica (MDA) em níveis que dificultam a capacidade de metabolização pela planta e despolarizam as membranas (LI et al., 2010; SORKHEHA et al., 2011). Porém, para inativar o excesso das EROs é necessária a ação de um sistema antioxidante enzimático que envolve as enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11), e a glutatona redutase (GR, EC 1.6.4.2), moléculas chave do ciclo ascorbato-glutationa.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOD, APX e GR) em dois genótipos de arroz com tolerâncias contrastantes submetidos ao estresse por baixas temperaturas.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido com duas cultivares brasileiras de arroz que apresentam resposta contrastante ao estresse por baixa temperatura: BRS Pampa (subespécie indica – sensível) e BRS Bojuru (subespécie japônica - tolerante).

As sementes foram germinadas em rolo de papel a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias em BOD. Posteriormente, para o estresse por frio as plântulas, com desenvolvimento uniforme, foram transferidas para bandejas plásticas (3L) contendo solo comercial adubado conforme as recomendações para a cultura do arroz irrigado. Foram utilizadas três bandejas/genótipo com 50 plântulas, as quais foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e irrigadas com solução nutritiva de Yoshida (1976) até as plantas apresentarem quatro folhas. Após este período, as bandejas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 13°C durante cinco dias.

A coleta do material para as análises (folhas) foi realizada da seguinte forma: 0 hora: C1 (coleta 1) = plantas não expostas ao estresse por frio; C2 = 6 horas de estresse; C3 = 24 horas de estresse; C4 = 48 horas de estresse e C5 = 72 horas de estresse. O delineamento experimental foi completamente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2×5 (2 genótipos \times 5 tempos de exposição ao estresse), com três repetições por tratamento.

Amostras de folhas (400 mg) foram maceradas em N₂ líquido acrescido de 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizadas em 1,5 mL do tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM (pH 7.8), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0.1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR). As proteínas totais foram eluídas com o mesmo tampão e sua quantificação determinada pelo método de Bradford (1976). Os valores referentes ao teor de proteínas totais foram expressos em mg proteína g^{-1} MF.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) segundo Giannopolitis e Reis 1977.

A atividade da APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm.

A atividade da GR foi baseada no método descrito por Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH pelo decréscimo na absorbância, a 340 nm, durante 2 minutos.

Os dados foram submetidos à análise da variância, para testar as fontes de variação e suas possíveis interações. Foram considerados significativos os resultados onde $P \leq 0.05$. Para as análises foi utilizado o software estatístico SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da análise de variância, houve efeito significativo de interação entre os fatores (genótipo \times tempo de estresse) para a atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Ascorbato Peroxidase, enquanto que não houve significância para nenhum dos fatores analisados para a atividade da enzima Glutathione Redutase.

Conforme evidenciado na Tabela 1, foi observado que a atividade da enzima SOD começou a apresentar aumento significativo a partir de tempo de 24 horas de estresse, atingindo a maior média de atividade na última coleta (72 h) para ambos os genótipos. No entanto, este aumento foi maior no genótipo tolerante, 3,3 vezes, quando comparados os tratamentos controle e 72 horas de estresse. Para o genótipo sensível, foi observado aumento de 1,6 vezes fazendo-se a mesma comparação, plantas controle e 72 horas de estresse. Acreditamos que

BRS Bojuru, por ser mais tolerante, teve maior atividade da SOD de forma a metabolizar de forma mais eficiente o excesso de EROs, fazendo com que nestas plantas os danos causados pelo estresse fossem menores.

Tabela 1. Atividade da enzima Superóxido Dismutase em folhas de dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetidos a condições de baixa temperatura (13 °C) em diferentes tempos de estresse

Genótipos	Tempos de exposição (horas) à baixas temperaturas				
	0	6	24	48	72
BRS Bojuru	52,85 Db*	59,21 Db	72,53 Cb	105,05 Ba	175,97 Aa
BRS Pampa	80,56 Ca	83,37 Ca	101,83 Ba	110,00 Ba	128,22 Ab

(*) Os valores são representados pela média de cada tratamento (n=3). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentro de cada tempo de estresse pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 2, nota-se que a atividade da enzima APX, para o genótipo BRS Bojuru, foi maior após 72 horas de exposição ao frio, diferindo apenas do tempo de 48 horas, no qual foi observada a menor atividade média para esta enzima. Em contrapartida, para o genótipo BRS Pampa, a maior atividade da APX foi observada nas plantas do tratamento controle, o qual foi estatisticamente igual ao tempo de 72 horas e diferente de todos os demais. Dessa forma, é demonstrado novamente que o genótipo tolerante apresenta mecanismos enzimáticos de detoxificação de EROs mais eficiente, justificando sua maior tolerância.

Tabela 2: Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase em folhas de dois genótipos de arroz (BRS Bojuru e BRS Pampa) submetidos a condições de baixa temperatura (13 °C) em diferentes tempos de estresse

Genótipos	Tempo de exposição (horas) à baixas temperaturas				
	0	6	24	48	72
BRS Bojuru	20,59 ABb*	18,70 Aba	20,03 ABa	17,87 Ba	24,41 Aa
BRS Pampa	25,39 Aa	14,99 Bca	13,91 Cb	15,00 BCa	20,61 ABa

(*) Os valores são representados pela média de cada tratamento (n=3). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente no tempo de estresse para cada genótipo e letras minúsculas iguais não diferem os genótipos dentro de cada tempo de estresse pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Shafi et al. (2014) em estudos com Arabidopsis sob estresse por frio atribuíram maiores atividades da SOD e APX em plantas mais tolerantes a essa condição, conforme também foi demonstrado nesse estudo.

Ao contrário das outras enzimas analisadas, não foram detectadas diferenças significativas para a atividade GR para nenhum dos fatores.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que o genótipo tolerante (BRS Bojuru) apresentou maior atividade enzimática da SOD e APX nos tempos de maior estresse por frio quando comparado ao genótipo sensível (BRS Pampa), podendo estar relacionado com a maior eficiência dos mecanismos de defesa e por isso, maior tolerância.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens, v. 72, p. 248–254, 1976.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 260, p. 127-132, 1993.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K.; Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 909-917, 2000.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase I: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.

KARKI, S.; RIZAL, G.; QUICK, W.P.; Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C4 pathway. **Rice**, New York, v. 6, p. 28, 2013.

KOVACH, MJ; SWEENEY, MT; MCCOUCH, SR; New insights into the history of rice domestication. **Trends in Genetics**, Ithaca, v. 23, n. 11, p. 578-587, 2007.

LI, Q.; SUN, S.; YUAN, D.; YU, H.; et al. Validation of candidate reference genes for the accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data in rice during seed development. **Plant Molecular Biology Reporter**, Hong Kong v. 28 p. 49-57, 2010.

MA, Y.; DAI, X.; XU, Y.; LUO, W.; et al. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. **Cell**, Beijing, v. 160, p.1209-1221, 2015

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen-Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach-Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Uji, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

SANG, T; GE, S; Genetics and phylogenetics of rice domestication. **Current Opinion in Genetics & Development**, Beijing, v. 17, p. 533-538, 2007.

SHAFI, A.; DOGRA, V.; GILL, T.; AHUJA, P.S.; SREENIVASULU, Y. Simultaneous over-expression of *PaSOD* and *RaAPX* in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers cold stress tolerance through increase in vascular lignifications. **PLoS One**, India, v. 9, n. 10, p. 110302, 2014.

SORKHEHA, K.; SHIRANA, B.; ROUHIA, V.; KHODAMBASHIA, M.; SOFOB, A. Regulation of the ascorbate–glutathione cycle in wild almond during drought stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Russia, v. 58, p. 76–84, 2011.

YOSHIDA, S.; FORNO, D.A.; COCK, J.H.; GOMEZ, K.A. **Laboratory manual for physiological studies of rice**. 3rd edn. International Rice Research Institutes, Manila, Philippines, 1976.