

EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO

Alexandre Pereira Leivas¹; Tatiana Rossatto²; Priscila Ariane Auler²; Marcelo Nogueira do Amaral²; Cristini Milech²; Eugenia Jacira Bolacel Braga³

Palavras chaves: *Oryza sativa* L., estresse abiótico, memória

INTRODUÇÃO

A restrição hídrica é um dos vários estresses ambientais que causam mudanças drásticas no crescimento, fisiologia e metabolismo das plantas afetando a produção mundial de grãos. Estas alterações acabam refletindo no balanço hídrico e nutricional, provocando mudanças no metabolismo hormonal, nas trocas gasosas e na produção de espécies reativas de oxigênio (PRISCO; FILHO, 2010).

Sabe-se que em resposta a restrição hídrica as plantas desencadeiam um complexo sistema antioxidante, cuja função é proteger as células dos danos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (SILVEIRA et al., 2010). A enzima superóxido dismutase (SOD) parece ser a primeira a atuar na linha de defesa na eliminação das EROs, realizando a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio). As isoformas da SOD são classificadas de acordo com seu cofator metálico e/ou sua localização subcelular: (Fe-SOD presente nos cloroplastos; (Mn-SOD) presente nas mitocôndrias e peroxissomos e a Cu/Zn-SODs presentes nos cloroplastos, peroxissomos, citosol e, possivelmente, no espaço intercelular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002).

Em relação ao número de exposições da planta a determinada situação adversa, estudos demonstram a influência de pré-tratamentos na aquisição de memória pelo vegetal. Foi relatado que o *priming* (pré-exposição da planta a um evento de estresse moderado) efetivamente confere resistência da planta a um episódio de estresse severo que ocorra posteriormente (PASTOR et al., 2012).

O objetivo desse trabalho foi avaliar no estágio reprodutivo a atividade da superóxido dismutase e a expressão gênica de cada isoforma dessa enzima, em dois genótipos de arroz, BRS Querência (várzea) e AN Cambará (sequeiro) após serem submetidos ou não a um pré-tratamento com restrição hídrica no estágio vegetativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes dos dois genótipos foram colocadas para germinar sobre papel *Germitest*, e após 10 dias as plântulas foram transferidas para vasos plásticos (10L), contendo solo.

No estágio vegetativo V5, as plantas de cada genótipo foram divididas em dois grupos. No primeiro, as plantas não foram submetidas ao déficit hídrico (pré-tratamento) e no segundo grupo as plantas foram submetidas ao pré-tratamento de déficit hídrico. Nas plantas pré-tratadas, a irrigação foi suspensa quando a umidade do solo atingiu 10%. Após isso a irrigação voltou no mesmo nível dos vasos controle (capacidade de campo) e permaneceram nessa condição até o estágio reprodutivo.

No estágio reprodutivo (R1-R2), a irrigação foi suspensa novamente em um grupo de plantas, de cada genótipo, até atingirem 10% de umidade do solo. Para isso foram

¹Graduando do curso de Agronomia. Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N - 96160-000, Capão do Leão, RS - Brasil; email: alexandreleivas@hotmail.com

²Doutorandos (as) em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas

³Professora Associada Nível III, Universidade Federal de Pelotas

designadas quatro condições experimentais: C: Tratamento sem restrição hídrica; PT_v: Pré-tratamento no vegetativo e sem déficit hídrico no reprodutivo; PT_v+R: Pré-tratamento no vegetativo e subsequente déficit hídrico no reprodutivo; NPT: sem pré-tratamento no vegetativo e com déficit hídrico no reprodutivo.

A avaliação da atividade da SOD foi baseada na capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) e as leituras foram realizadas a 560 nm.

Para análise da expressão dos genes das isoformas da enzima SOD foram desenhados *primers* na região transcrita dos genes de arroz. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente *PureLink® Kit* (Invitrogen™), e após foi reversamente transcrito (mRNA) em cDNA usando o kit comercial *SuperScriptFirst-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™).. Como normalizador interno das reações de RT-qPCR utilizou-se o gene *UBC-E2*, previamente testado para as condições experimentais. A quantificação relativa da expressão de cada gene foi obtida conforme descrito por Liviak; Schmittgen (2001).

O delineamento experimental foi completamente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 4 (dois genótipos e quatro condições estudadas) e três repetições biológicas por tratamento, sendo cada unidade experimental representada por um vaso contendo seis plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software estatístico SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para ambos os genótipos estudados observou-se diferença significativas na atividade da SOD em todas as condições experimentais, com maiores variações em PT_v+R, PT_v e NPT sendo que para BRS Querência os valores foram de 167,32; 156,81 e 135,09 U mg⁻¹ proteína, respectivamente, enquanto que para AN Cambará 284,72; 302,40 e 248,96 U mg⁻¹ proteína, respectivamente. De modo geral, é possível perceber que os valores médios de SOD, em todos os tratamentos, no genótipo BRS Querência, foram menores que os observados no AN Cambará (Figura 1).

Segundo Basus et al. (2009) o aumento ou mesmo a manutenção da atividade da SOD está associado a tolerância, enquanto a sensibilidade ao déficit hídrico está associado a redução da atividade desta enzima. De forma semelhante Lum et al. (2014), verificaram que em *Oryza sativa* tolerante à seca (Pulot Wangi) exibiu maior atividade da enzima SOD, do que o genótipo sensível à seca (Kusam). Assim, os autores destacam que a tolerância à seca desta variedade de arroz pode estar relacionada à atividade dessa enzima antioxidante e de outras abordadas no estudo.

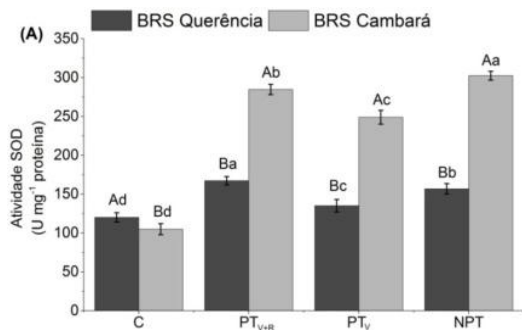


Figura 1- Atividade da enzima SOD em folhas de arroz (BRS Querência e AN Cambará), depois de submetidas às diferentes combinações de déficit hídrico ao longo do ciclo. Os valores são representados pela média de cada condição \pm DP. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente nos genótipos e letras minúsculas iguais não diferem entre as condições dentro do mesmo genótipo. C (sem restrição hídrica), PT_v+R (pré-tratamento e déficit hídrico no estágio reprodutivo), PT_v (pré-tratamento e nível ideal de umidade no solo no estágio reprodutivo) e NPT (sem pré-tratamento e déficit hídrico no estágio reprodutivo).

Com relação aos oito genes que codificam a enzima SOD, no genótipo BRS Querência, os maiores valores de expressão foram observados nos tratamentos PT_v+R e NPT, sendo que a isoforma *OsSODB-Fe* foi a mais responsiva com valores de QR 11,71 e 11,52, respectivamente (Figura 2A). Para o genótipo de sequeiro, AN Cambará, os maiores valores de atividade desta enzima podem ser associados aos maiores valores de expressão para estes genes codificadores da SOD. A isoforma mais responsiva neste caso foi a *OsSODA1-Mn* e com valores de QR superiores ao encontrado no outro genótipo estudado, com 40,71 no PT_v+R, (Figura 2B).

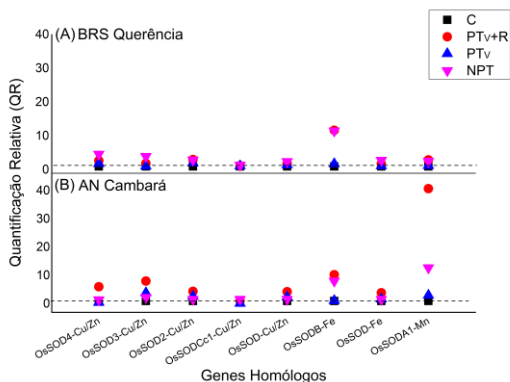


Figura 2- Expressão dos genes codificadores das oito isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de arroz, após submetidas às diferentes combinações de déficit hídrico ao longo do ciclo. BRS Querência (A) e AN Cambará (B). C (sem restrição hídrica), PT_v+R (pré-tratamento e déficit hídrico no estágio reprodutivo), PT_v (pré-tratamento e nível ideal de umidade no solo no estágio reprodutivo) e NPT (sem pré-tratamento e déficit hídrico no estágio reprodutivo).

Para os tratamentos que estavam em déficit hídrico em ambos os genótipos, os genes que codificam para as isoformas da SOD tiveram aumento de expressão. Entretanto, no genótipo de sequeiro a expressão do gene *OsSODA1-Mn* foi aproximadamente 40 vezes superior aos das plantas controle, quando comparadas com as que foram pré-tratadas e enfrentaram déficit hídrico subsequente no estágio reprodutivo (PT_v+R). A alta expressão está de acordo com a expressiva atividade da enzima nestas condições. Semelhante ao encontrado nesse estudo Uzilday et al. (2012), observaram aumentos significativos na expressão do gene *SOD-Mn*, em *Cleomespinosa* sob condições de seca, indicando a compartimentalização mitocondrial do anion superóxido (O₂^{•-}). Outros estudos têm relatado uma correlação positiva entre a expressão aumentada do gene *SOD-Mn* e maior tolerância das plantas a estresses ambientais (QUE et al., 2012). No genótipo de várzea, o gene que codifica a isoforma da SOD que teve maior expressão nas condições estudadas foi o *OsSODB-Fe*, porém sem marcantes diferenças entre as plantas pré-tratadas e as expostas à situação adversa somente no período reprodutivo.

CONCLUSÃO

O genótipo AN Cambará expressa atividade da enzima SOD significativamente superior ao controle e ao genótipo Querência nas condições PT_v+R, NPT e PT_v. Para o genótipo de sequeiro a isoforma *OsSODA1-Mn* apresenta maiores níveis de transcritos, contribuindo para o aumento da atividade da enzima e possível proteção ao déficit hídrico. Já para o genótipo Querência, a isoforma *OsSODB-Fe* é a mais responsiva ao estresse hídrico. Baseado nisso, infere-se que a maior capacidade de manutenção do status hídrico na AN Cambará pode ser induzida por um pré-tratamento de déficit hídrico decorrendo da memória dessas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSCHER, R. G. et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- BASU, S. et al. Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. **Plant Growth Regulation**, v.60, p. 51-59, 2010.
- GIANNOPOLITIS, C.N; REIS, S. K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings. **Plant Physiol**, v.59, p. 315-318, 1977.
- LUM et al. Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n. 5, p. 1487-1493
- PASTOR, V. et al. (2012) Primed plants do not forget. **EnvironExpBot** 94:46–56, 2012.
- PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEY, H.R.; DIAS, N.S da; LACERDA, C.F. de. Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza-CE, INCSal, 472 p. 2010.
- QUE, Y. et al. Molecular cloning and expression analysis of anMn-superoxide dismutase gene in sugarcane. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.3, p. 552-560, 2012.
- SILVEIRA, J. A. G. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: INCTsal, Simpósio Brasileiro de Salinidade. (Org). Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados, p.161-180, 2010.
- SOSBAI. Arroz Irrigado: **Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. /30 Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado, 06 a 08 de agosto de 2014, Bento Gonçalves, RS. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Santa Maria/RS, p.192, 2014.
- THELLIER, M.; LUTTGE, U. Plant memory: a tentative model. **Plant Biology** 15, 1–12, 2013.
- UZILDAY, B. et al. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**, v. 182, n. 1, p. 59–70, 2012.

