

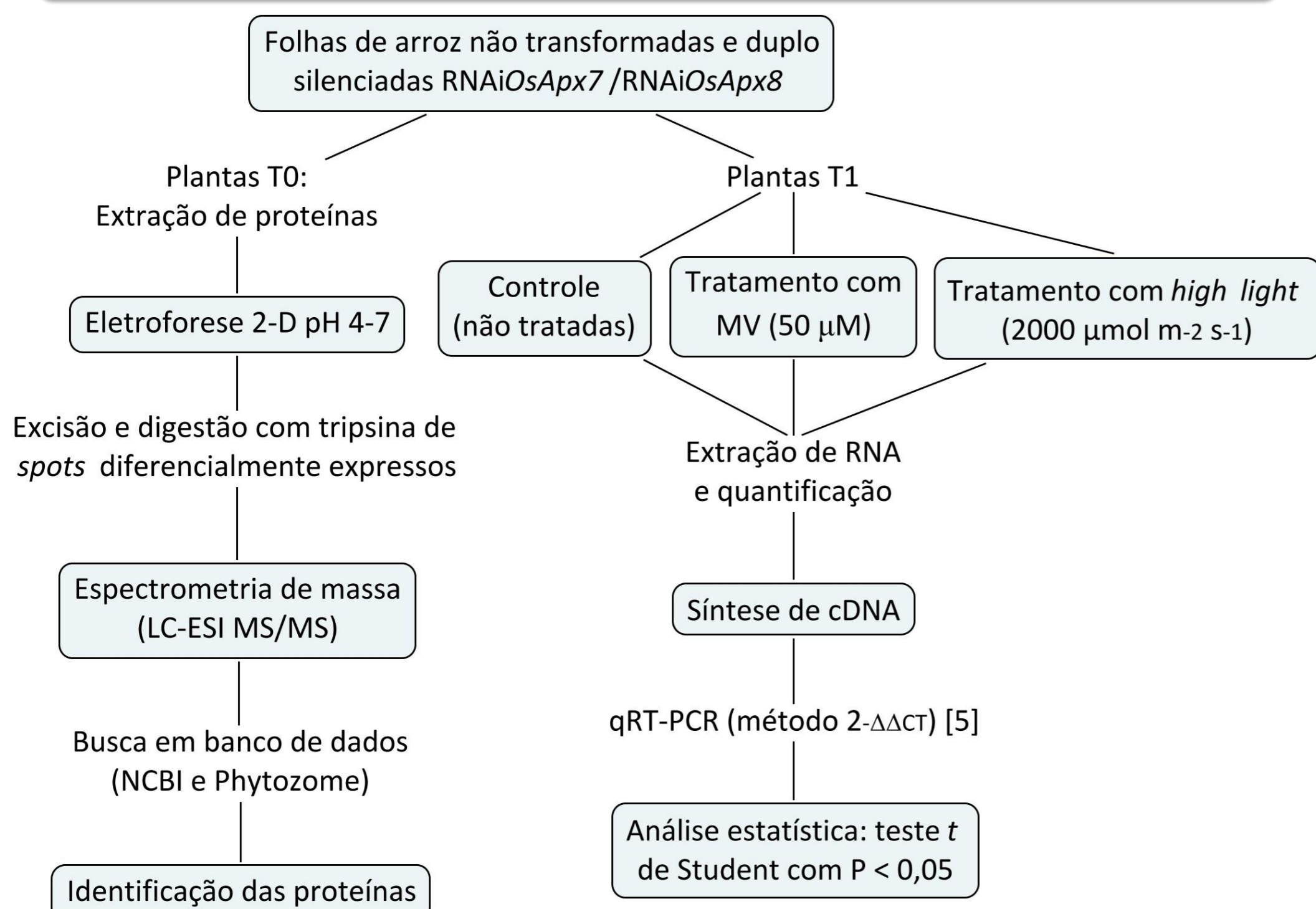
M. Schünemann<sup>1\*</sup>, A. Caverzan<sup>1</sup>, C. M. B. Andrade<sup>2,3</sup>, F. E. L. Carvalho<sup>4</sup>, J. A. G. da Silveira<sup>4</sup>, R. Margis<sup>2</sup>, M. Margis-Pinheiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, Departamento de Genética (UFRGS). <sup>2</sup>Laboratório de Genomas e Populações de Plantas e <sup>3</sup>Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massa, Centro de Biotecnologia (UFRGS). <sup>4</sup>Laboratório de Metabolismo do Estresse em Plantas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). \*E-mail: [mariana\\_schunem@hotmail.com](mailto:mariana_schunem@hotmail.com)

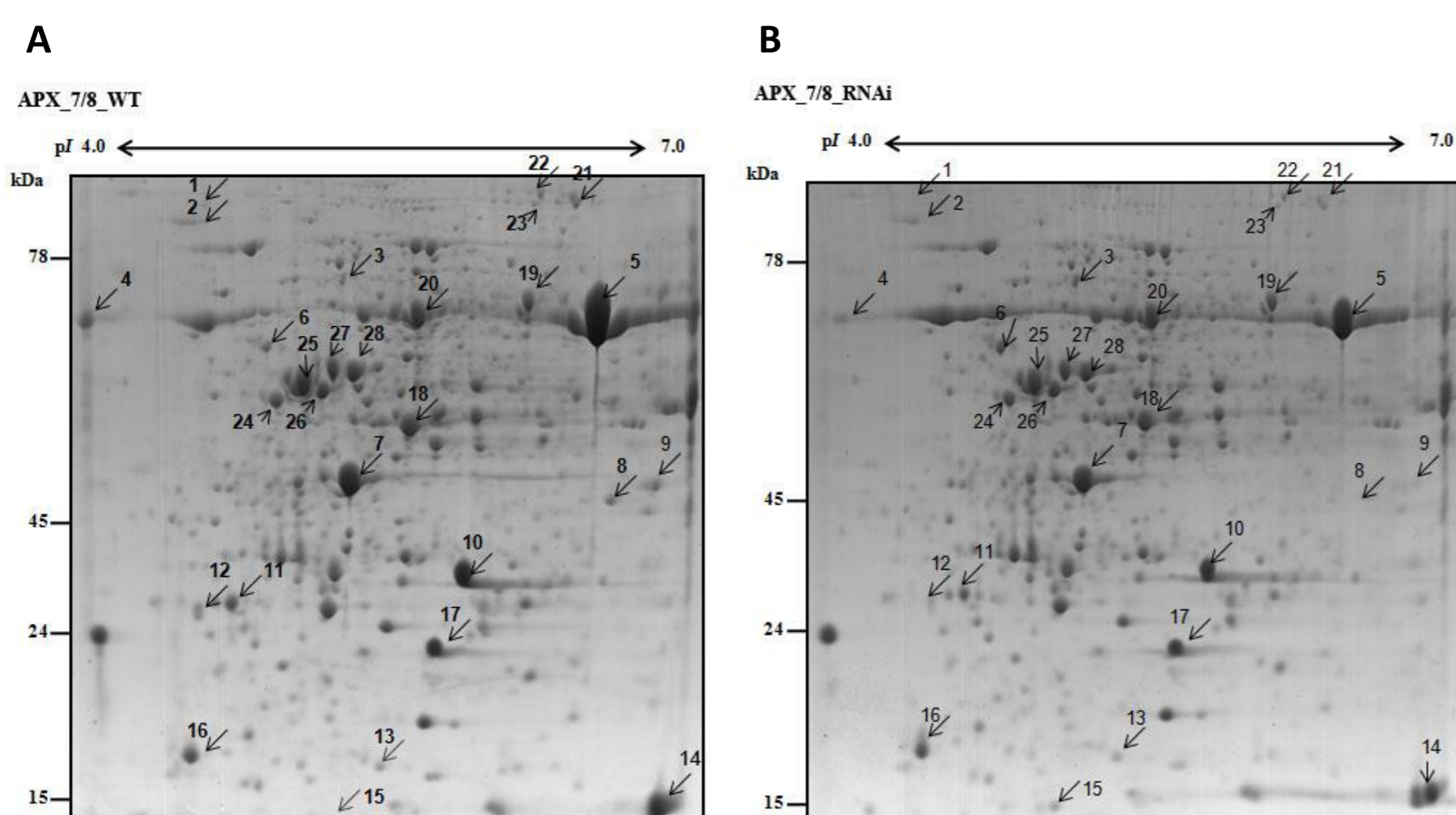
## Introdução e Objetivo

Estresses abióticos (alta intensidade luminosa, toxidez por alumínio, seca, frio) provocam o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo, afetando crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas [1]. A ascorbato peroxidase (APX) é uma das principais enzimas atuando na remoção de EROs em diferentes compartimentos subcelulares nas células vegetais. Em arroz, 8 genes codificam diferentes isoformas de *Apx* que são classificadas de acordo com sua localização subcelular [2;3;4]. O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil de expressão proteico em folhas de plantas de arroz não transformadas e duplo silenciadas para os genes das isoformas cloroplásticas, *OsApx7* e *OsApx8*, além de analisar a expressão relativa dessa família de peroxidases sob diferentes estresses formadores de EROs (a alta intensidade luminosa – *high light* – e o herbicida metil violágeno - MV), a fim de contribuir para o estudo da função dessas proteínas na resposta da planta ao estresse oxidativo.

## Métodos



## Resultados

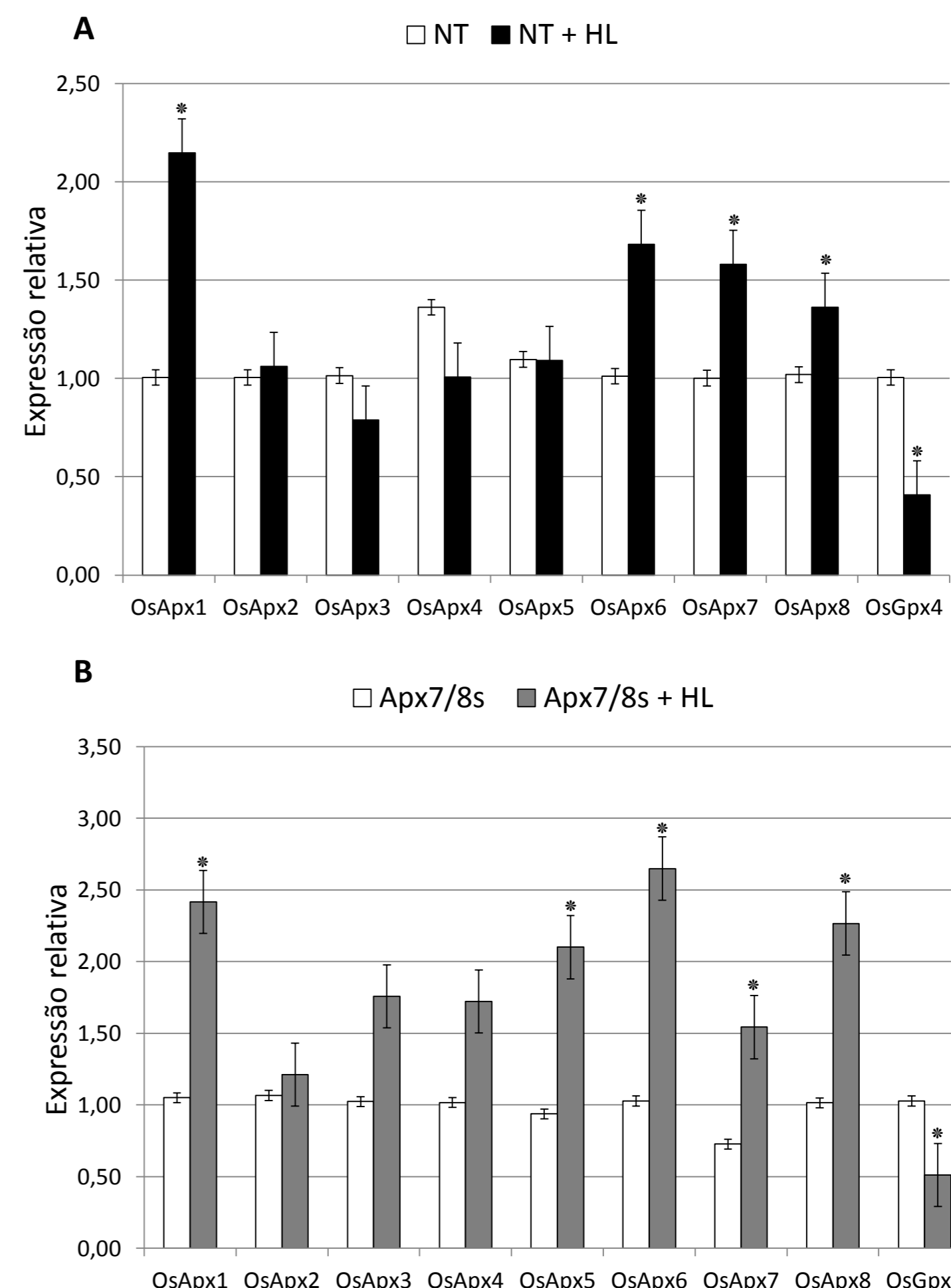


**Figura 1:** Imagens representativas dos géis bidimensionais das proteínas extraídas de folhas de arroz (*Oryza sativa*). (A) Plantas não transformadas (WT). (B) Plantas duplo silenciadas para os genes *OsApx7* e *OsApx8*. Os números representam as proteínas diferencialmente expressas e identificadas na tabela 1.

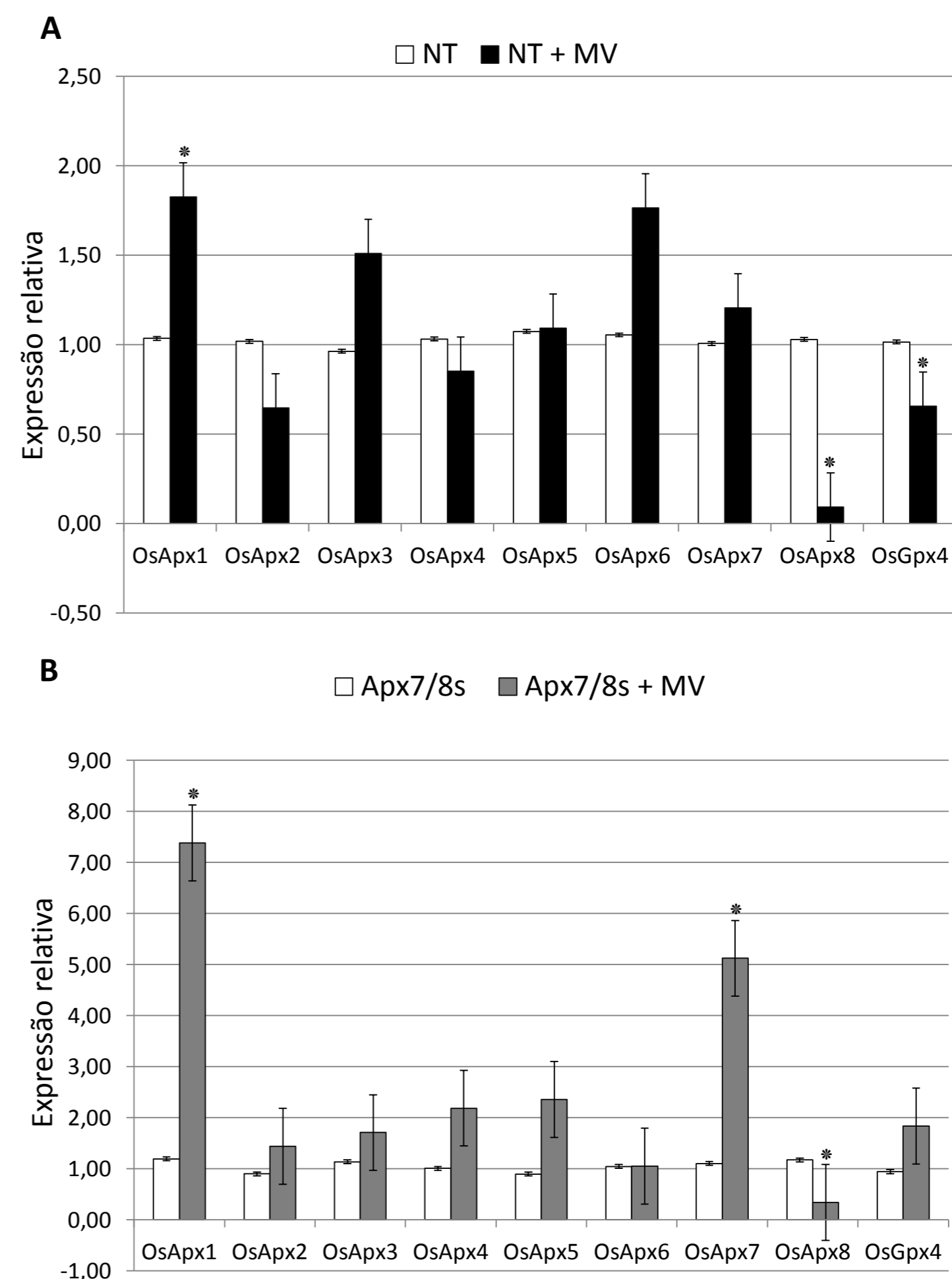
**Tabela 1:** Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de arroz (não transformadas e duplo silenciadas RNAiOsApx7/OsApx8) identificadas por espectrometria de massa (LC-ESI MS/MS).

Nº Spot <sup>a</sup>	Δ Expressão <sup>b</sup>	Nome da Proteína	Teórico pI	Teórico P. M. (kDa)	Observado pI	Observado P. M. (kDa)	Score <sup>c</sup>	S. P. (%) <sup>d</sup>	Nº Acesso (NCBI) <sup>e</sup>
<b>Degradação de Proteínas</b>									
2	↓	Heat shock protein (hypothetical protein LOC_Os08g31290.1)	4,53	83	4,98	89	244	16	gi 218202319
<b>Fotossíntese</b>									
19	↓	Putative, ATP synthase subunit alpha (LOC_Os04g16740.1)	5,95	55	6,1	55	830	39	gi 11466784
7	↓	Oxygen-evolving enhancer protein (LOC_Os01g31690.1)	6,1	35	6,1	34	1201	60	gi 115436780
10	↓	Oxygen-evolving enhancer protein (LOC_Os01g31690.2)	6,1	35	6,1	34	176	24	gi 115436780
13	↓	ATP synthase subunit alpha (LOC_Os04g16740.1)	5,27	29	6,1	55	317	40	gi 20143564
25	↑	Putative, AAA-type ATPase family protein (LOC_Os11g47970.1)	5,59	52	5,43	52	860	44	gi 62733297
14	↑	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (LOC_Os12g17600.1)	5,89	15	9,1	19	595	82	gi 56966763
20	↓	Putative ATP synthase like protein (LOC_Os05g35320.1)	5,66	46	6,73	43	683	39	gi 46391135
<b>Metabolismo de Carboidratos</b>									
26	↑	Phosphoribulokinase/Uridine kinase family protein (LOC_Os02g47020.1)	5,68	25	5,86	44	927	47	gi 115448091
18	↓	Putative fructose-biphosphate aldolase isozyme (LOC_Os11g07020.1)	6,07	41	6,7	42	806	42	gi 108864048
24	↑	Putative, fructose-1,6-biphosphatase (LOC_Os04g16680.1)	5,64	42	5,54	42	446	32	gi 115457386
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>									
22	↑	Putative, glycine dehydrogenase (LOC_Os06g40940.1)	6,35	11	6,80	11	128	7	gi 51090904
16	↑	Putative glycine cleavage system H protein (LOC_Os10g37180.1)	4,92	17	4,67	17	382	52	gi 115482934
<b>Resposta ao Estresse</b>									
3	↑	T-complex protein (LOC_Os06G02380.1)	5,27	74	5,32	64	557	46	gi 115466004
12	↓	Expressed protein (LOC_Os10G18340.1)	4,70	16	4,41	16	134	48	gi 115481540

<sup>a</sup> Numeração correspondente aos géis 2-DE na figura 1. <sup>b</sup> Aumento (↑) ou redução (↓) nos níveis das proteínas em resposta ao silenciamento dos genes *OsApx7* e *OsApx8*. <sup>c</sup> Score de identidade do Mascot. <sup>d</sup> Porcentagem de sequenciamento da proteína. <sup>e</sup> Número de acesso do banco de dados do NCBI.



**Figura 2:** Análises por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) dos níveis de mRNA dos genes *OsApx1* a *OsApx8* e *OsGpx4* (glutaciona peroxidase) em folhas de plantas de arroz não transformadas (A) e duplo silenciadas RNAiOsApx7/OsApx8 (B) submetidas a alta luminosidade (*high light* 2000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os níveis de transcritos foram normalizados em relação aos níveis de expressão dos genes *OsFdh* e *OsActina2*. O símbolo \* indica que os valores diferem significativamente quando comparados com o controle (P < 0,05).



**Figura 3:** qRT-PCR dos genes *OsApx1* a *OsApx8* e *OsGpx4* (glutaciona peroxidase) em folhas de plantas de arroz não transformadas (A) e duplo silenciadas RNAiOsApx7/OsApx8 (B) tratadas com metil violágeno (50 µM). Os níveis de transcritos foram normalizados em relação aos níveis de expressão dos genes *OsFdh* e *OssnU6*. O símbolo \* indica que os valores diferem significativamente quando comparados com o controle (P < 0,05).

## Referências

- SCANDALIOS, J. G. *The rise of ROS*. **TRENDS in Biochemical Sciences**, 9: 483-486, 2002.
- TEIXEIRA, F. K.; BENAVENTE, M. L.; MARGIS, R. & PINHEIRO, M. M. *Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome*. **Journal of Molecular Evolution**, 59: 761-770, 2004.
- TEIXEIRA, F. K.; BENAVENTE, M. L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS, R. & PINHEIRO, M. M. *Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments*. **Planta**, 224: 300-314, 2006.
- CAVERZAN, A. *Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos*. **Dissertação de Mestrado**, UFRGS, 2008.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method*. **Methods**, 25: 402-408, 2001.