

Caracterização Fenotípica e Molecular de plantas de arroz silenciadas no gene *OsGpx3*

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente produzidas durante o metabolismo aeróbico pela cadeia respiratória na mitocôndria e pela cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese. Essas moléculas podem reagir com componentes celulares e causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídios, portanto, sua presença deve ser estritamente controlada pela célula. Para atenuar a toxicidade desses compostos, os organismos aeróbios desenvolveram sistemas enzimáticos; dentre eles, enzimas da família Glutathione peroxidase (GPx), que catalisam a redução de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos à água ou a álcoois correspondentes.

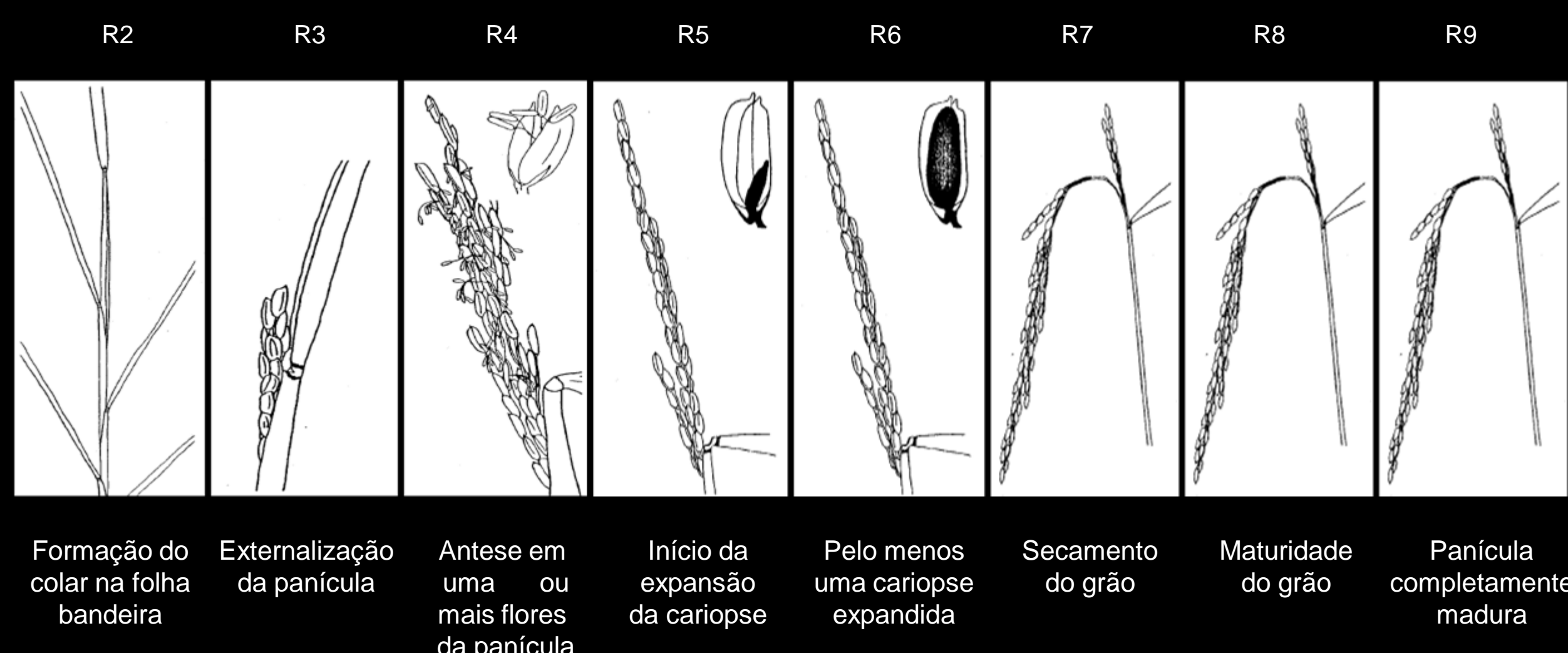
O papel das GPx não se limita a proteger as plantas dos efeitos danosos das EROs; essas enzimas também atuam em complexas cascatas de sinalização, assim, seu perfeito funcionamento é indispensável para a célula. O estresse oxidativo derivado das EROs constitui um dos principais fatores de danos às plantas expostas a condições ambientais adversas. A caracterização funcional de genes cujos produtos podem proteger as plantas dos efeitos do estresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes e adaptadas ao meio ambiente e assim, aumentar sua produtividade.

Metodologia e Objetivos

Para contribuir com a elucidação das funções dos produtos gênicos dessa família, foram obtidas linhagens de plantas geneticamente modificadas, carregando construções de RNA de interferência (RNAi) para silenciar especificamente GPx3. Através do método de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, calos de arroz (cv. *Nippombare*) foram transformados com o vetor *pANDA* (Miki & Shimamoto, 2004).

Paralelamente, traçamos um perfil de expressão dos genes de Glutathione peroxidase durante o desenvolvimento da planta selvagem. Para tanto, foram coletadas amostras de panículas das fases R2 a R9 de acordo com a escala de desenvolvimento de Counce et al. (Figura 1). Prosseguiu-se com a extração de RNA total, a síntese de cDNA e PCR quantitativa em Tempo Real. Os resultados foram analisados através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Figura 1 – Escala de desenvolvimento da panícula (Counce et al., 2001)



Resultados e Conclusões

Análises por RT-qPCR mostraram a redução da expressão do gene *OsGpx3* em aproximadamente 95% quando comparado às plantas não transformadas (Gráfico 1), enquanto que as outras quatro GPx presentes no genoma do arroz não foram afetadas (Gráfico 2).

Durante a fase reprodutiva, foi possível observar que os genes de GPx são mais expressos nas etapas R4 a R7, que correspondem às fases relacionadas com a expansão de grãos e início da maturação. Foi observada expressão aumentada dos cinco genes GPx durante o estágio R6, indicando que esta família gênica parece estar envolvida na expansão em profundidade da cariopse. Além disso, observou-se que o produto gênico de *OsGPx2* pode participar da expansão inicial da cariopse, já que sua expressão está aumentada na fase R5.

Gráfico 1 – Expressão do gene *OsGpx3*

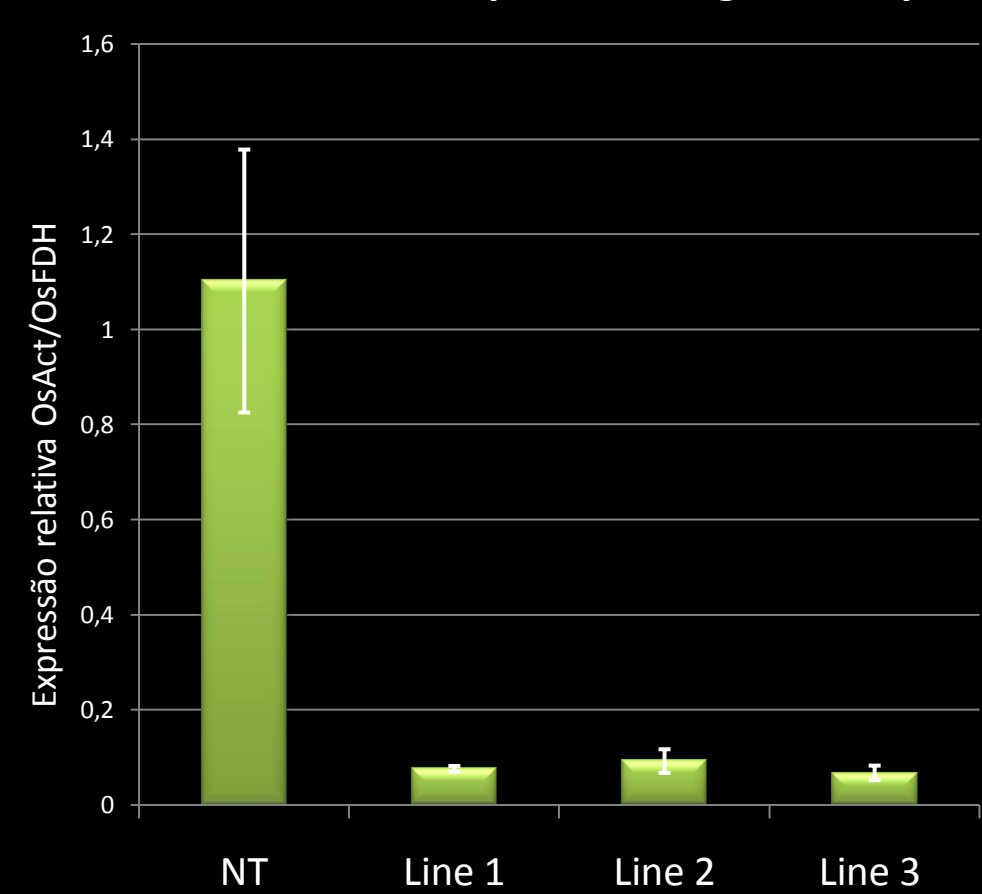


Gráfico 1 – Expressão do gene *OsGpx3* em plantas silenciadas para o Gene *OsGpx3*
 NT: Planta não transformada
 Line 1 – Linhagem 1 de plantas RNAiOsGpx3
 Line 2 – Linhagem 2 de plantas RNAiOsGpx3
 Line 3 – Linhagem 3 de plantas RNAiOsGpx3
 Genes normalizadores: Actina e FDH

Gráfico 2 – Expressão de *OsGPx* em plantas RNAiOsGpx3

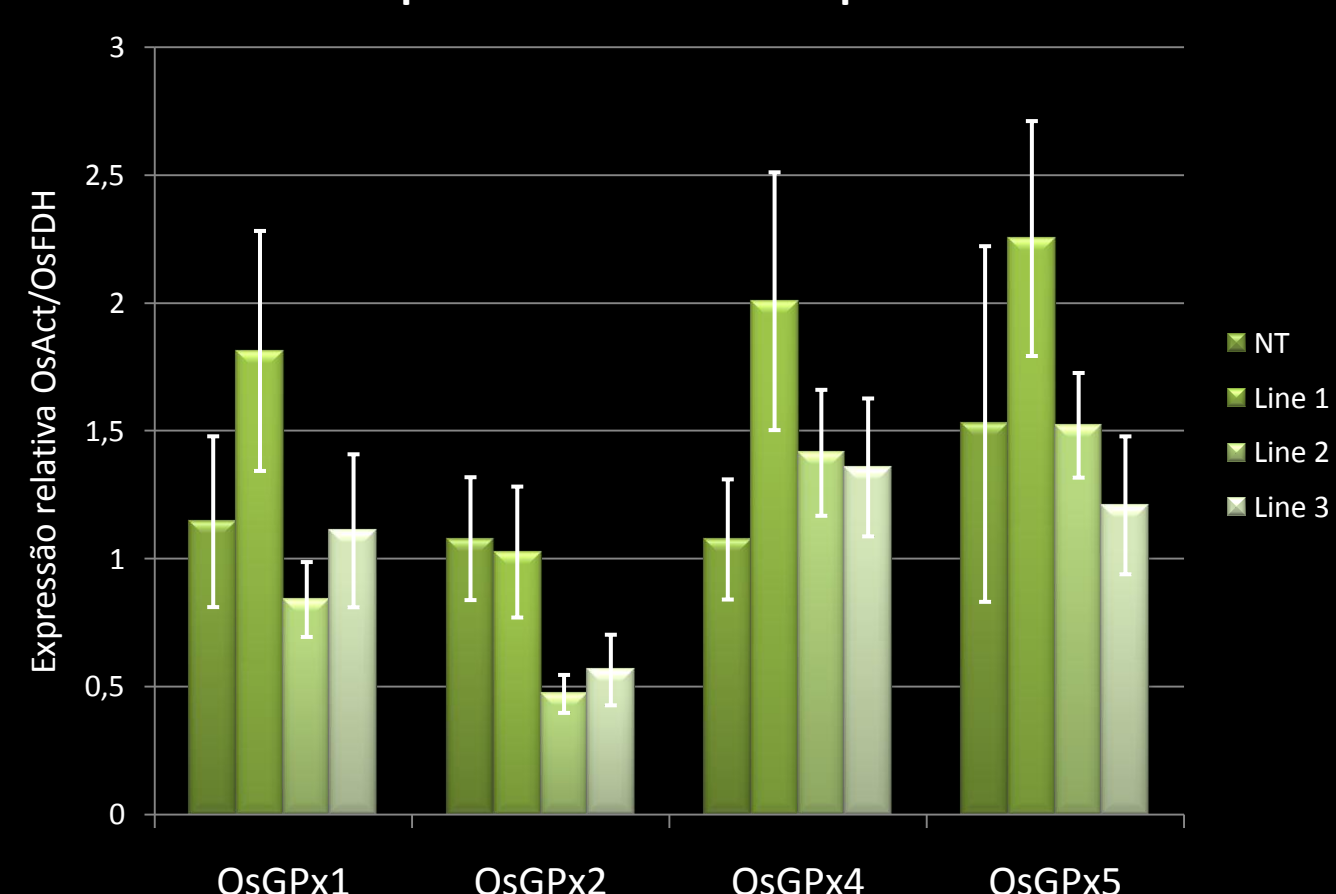


Gráfico 2 – Expressão dos Genes 1, 2, 4 e 5 de GPx nas plantas silenciadas para o gene *OsGpx3*
 NT: Planta não transformada
 Line 1 – Linhagem 1 de plantas RNAiOsGpx3
 Line 2 – Linhagem 2 de plantas RNAiOsGpx3
 Line 3 – Linhagem 3 de plantas RNAiOsGpx3
 Genes normalizadores: Actina e FDH
 OsGPx – genes de Glutathione Peroxidase de *Oryza sativa* (*OsGPx1*; *OsGPx2*; *OsGPx3*; *OsGPx4*; *OsGPx5*).

Gráfico 3 – Perfil de Expressão dos genes de GPx de arroz durante a fase reprodutiva

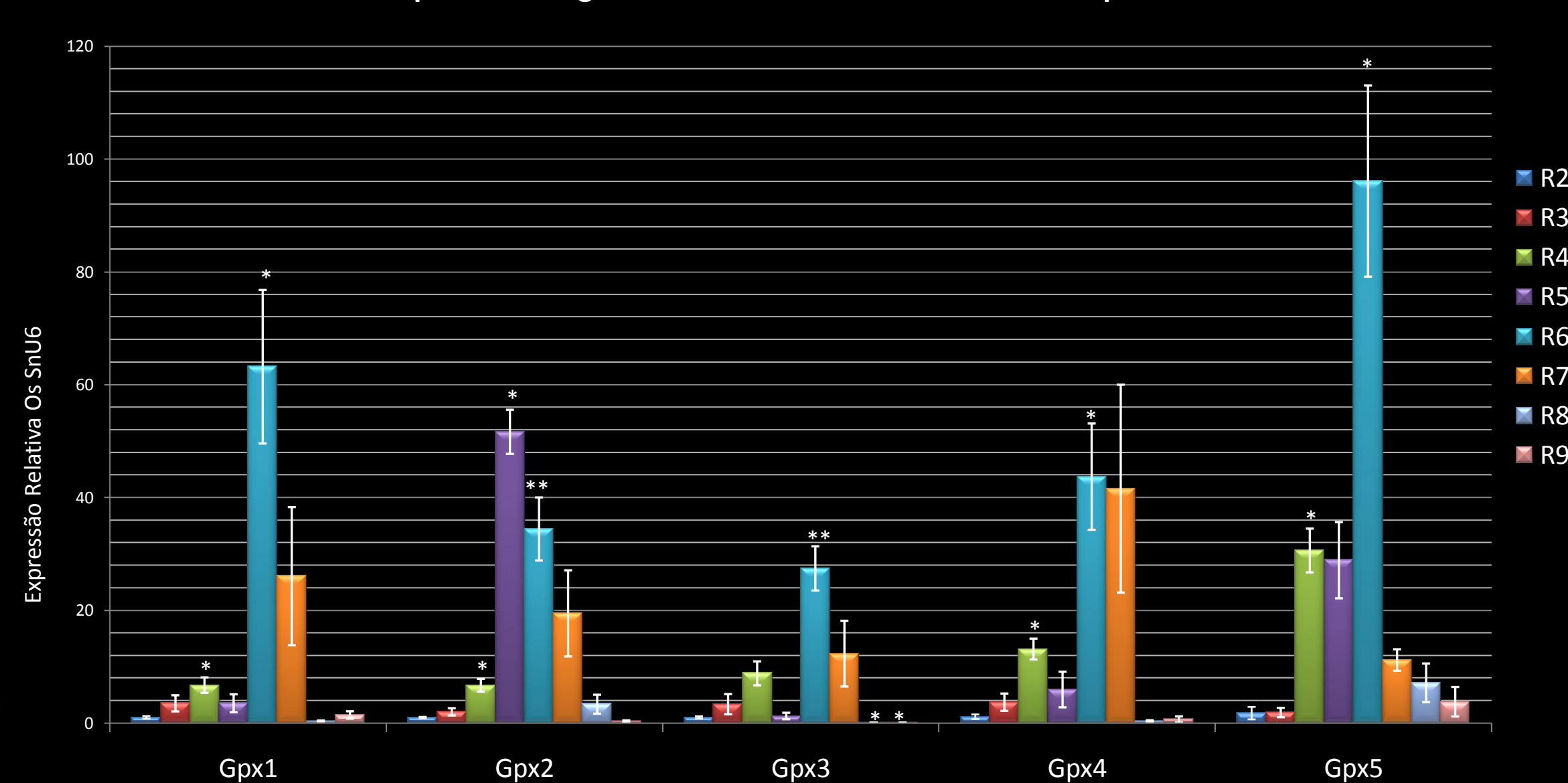


Gráfico 3 – Perfil de Expressão dos genes de GPx de arroz durante a fase reprodutiva.
 Gene normalizador: SnU6
 *p<0.05
 **p<0.01

References

COUNCE, P. A. et al. CROP SCI. n.40, p. 436-443 (2000)
 LIVAK, K.J. et al. METHODS, n.25, p. 402-408 (2001)
 MARGIS, R. et al. FEBS J., n.275, p. 3959-3970. (2008)
 MIKI & SHIMAMOTO. Plant Cell Physiol. n.45, p.490-495 (2004)

Apoio Financeiro: CNPq, FAPERGS, ICGEB, UNESCO.



As plantas silenciadas apresentaram desenvolvimento anormal da panícula, com o prolongamento de *pedicelos* e a redução no número de grãos, sugerindo a participação da GPx3 na formação dessa estrutura.