

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Leila Spagnolo Fonini

Análise da expressão dos genes de Glutathione peroxidase em
arroz (*Oryza sativa* L.)

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Análise da expressão dos genes de Glutathione peroxidase em arroz
(*Oryza sativa* L.)**

LEILA SPAGNOLO FONINI

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação,
apresentado na Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina.

Área: Genética

Orientação: Prof^ª Dra. Márcia Margis-Pinheiro
Co-orientação: Me. Gisele Passaia

Porto Alegre

2011

Análise da expressão dos genes de Glutathione peroxidase em
arroz (*Oryza sativa* L.)

Leila Spagnolo Fonini

ORIENTADORA

Prof^a Márcia Margis-Pinheiro

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adriano Silvério

Dra. Beatriz Wiebke Ströhm

*Agradeço aos meus pais pela oportunidade de
realizar este curso de graduação*

*À minha orientadora, Márcia, por ter me orientado
durante o período de Iniciação Científica e pelas contribuições a este trabalho*

*À minha co-orientadora Gisele por todos os
ensinamentos*

*Aos demais colegas do Laboratório de Genética
Vegetal que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho*

*À Graciela e à Fernanda, pela amizade dentro e fora
do laboratório*

*À Vivian e à Deborah, que conviveram comigo
durante esses quatro anos e os tornaram mais agradáveis*

*Ao meu namorado, Felipe, por todo o apoio e
compreensão e por sempre estar ao meu lado*

Sumário

1. Resumo	6
2. Introdução.....	8
2.1. As espécies reativas de oxigênio	8
2.2. Estresse oxidativo derivado das espécies reativas de oxigênio	9
2.3. Modificações oxidativas dos componentes celulares das plantas.....	10
2.4. O papel das espécies reativas de oxigênio na sinalização celular.....	10
2.5. Sistemas antioxidantes em plantas.....	14
2.6. Peroxidases	14
2.6.1. Glutationa Peroxidase	14
2.7. Modelo de Estudo	14
3. Objetivos	16
4. Material e Métodos.....	16
5. Trabalho experimental em formato de artigo científico	18
6. Conclusões e Perspectivas.....	42
7. Bibliografia Adicional	43
8. Anexo	49

1. Resumo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são conhecidas como mediadoras de cascatas de sinalização intracelular, desempenhando um importante papel na ativação de fatores de transcrição, modulando a expressão de genes relacionados com a defesa a patógenos e com o desenvolvimento da planta. Entretanto, sua produção excessiva pode levar ao estresse oxidativo, podendo causar danos às proteínas, ao DNA, aos lipídeos e aos carboidratos, podendo levar à morte celular.

Os mecanismos através dos quais as plantas removem esses compostos tóxicos, principalmente em situações de estresse, têm sido largamente estudados. As enzimas da família Glutaciona peroxidase (GPX) atuam catalisando a conversão de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos à água ou a álcoois correspondentes, participando, assim, dos processos enzimáticos de defesa contra os danos causados pelas ERO.

No arroz, essa família é codificada por cinco genes, *OsGpx1*, *OsGpx2*, *OsGpx3*, *OsGpx4* e *OsGpx5*. Neste trabalho, foi analisado o perfil de expressão dos genes *OsGpx* durante o desenvolvimento da planta, bem como em situações de estresse abiótico, a saber, frio, seca, exposição à luz e ao escuro, exposição à luz UV-B e concentrações tóxicas de alumínio.

Em termos gerais, os genes *OsGpx* tiveram a expressão modulada frente aos estresses de frio, seca, exposição à luz e ao escuro e também à luz UV-B, não respondendo ao estresse por alumínio. Observou-se que a expressão dos genes foi induzida durante as fases de floração e enchimento de grãos.

Além disso, foi obtida uma construção para transformação de arroz, contendo os genes repórteres GUS e GFP, a fim de realizar o estudo do promotor do gene da Glutaciona Peroxidase 3.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are known as mediators of intracellular signaling pathways, playing an important role in the activation of transcription factors, modulating the expression of genes related to pathogen defense and plant development. However, its overproduction can lead to oxidative stress, and may damage proteins, DNA, lipids and carbohydrates, and consequently may lead to cell death.

The mechanisms by which plants remove these toxic compounds, especially in stressful situations, have been widely studied. The family of glutathione peroxidase enzymes (GPX) acts by catalyzing the conversion of hydrogen peroxide or hydroperoxides to water or corresponding alcohols, participating in enzymatic defense against damage caused by ROS.

In rice, this family is encoded by five genes, *OsGpx1*, *OsGpx2*, *OsGpx3*, and *OsGpx4* *OsGpx5*. In this work, is analyzed the expression profile of *OsGpx* genes during plant development, as well as abiotic stress situations, namely, cold, drought, toxic concentrations of aluminum, light and exposure, and exposure to UV-B.

In general, the expression levels of *OsGpx* genes were modulated in response to cold, drought, exposure to light and dark and also to UV-B, not responding to aluminum stress. It was observed that the expression of genes was induced during the stages of flowering and grain filling.

In addition, it was obtained a construct for transformation of rice, containing the GUS and GFP reporter genes in order to study the Glutathione Peroxidase 3 gene promoter.

2. Introdução

2.1. As Espécies Reativas de Oxigênio

A introdução do oxigênio molecular (O_2) na atmosfera terrestre por organismos fotossintetizantes conferiu uma vantagem adaptativa aos organismos aeróbios, que utilizam O_2 como aceptor final de elétrons, proporcionando uma maior produção de energia em comparação com outros processos como a fermentação e a respiração anaeróbia (SCANDALIOS, 1993, 2002, 2005).

Como resultado da redução de O_2 à água, são formados compostos intermediários extremamente reativos, conhecidos como **Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)** (HALLIWELL, 2006; DAT *et al.*, 2000). As ERO são produtos normais do metabolismo aeróbio, entretanto, sua concentração nas células deve permanecer controlada, aumentando sob condições de estresse ou durante certos processos de sinalização celular (GECHEV *et al.*, 2006).

Na exposição à luz, organelas como os cloroplastos e os peroxissomos são responsáveis pela geração de ERO em partes fotossintetizantes da planta, por meio do processo conhecido como fotorrespiração (FOYER & NOCTOR, 2003). Porém, em tecidos não fotossintetizantes ou quando não há exposição da planta à luz, a mitocôndria parece ser a principal produtora desses compostos. (MAXWELL *et al.*, 1999; MØLLER, 2001).

A redução univalente do O_2 pelo transporte de elétrons da cadeia respiratória resulta na geração do superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ ocorre em baixo pH, envolvendo a transferência de um elétron para outro $O_2^{\cdot-}$, formando o íon peróxido (O_2^{2-}) que, por sua vez, é protonado formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (POSPÍSIL *et al.*, 2004). Além disso, $O_2^{\cdot-}$ pode ser protonado formando o radical peridroxil (HO_2^{\cdot}). Na presença de metais de transição como cobre e ferro, o H_2O_2 pode gerar o radical hidroxila ($\cdot OH$) via Reação de Fenton ou Haber-Weiss. O oxigênio singleto (1O_2) é outra forma de ERO, mas não é gerada com a adição de elétrons, e sim pela elevação de um elétron a um orbital mais energético (GILL & TUTEJA, 2010) (Figura 1).

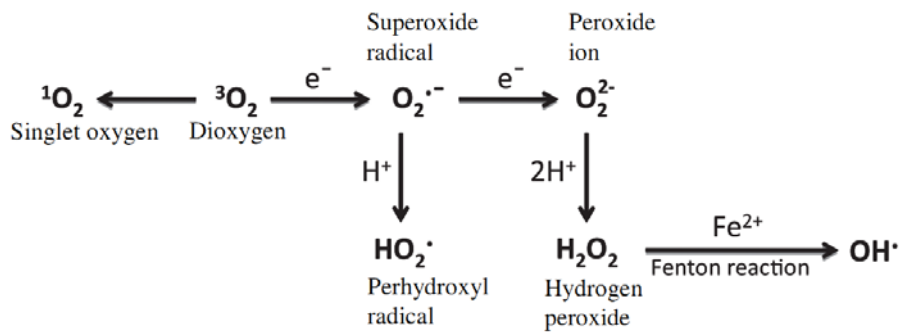


Figura 1: Formação de ERO a partir da transferência de elétrons da cadeia respiratória (GILL & TUTEJA, 2010).

2.2. Estresse Oxidativo Derivado das Espécies Reativas de Oxigênio

As ERO são continuamente produzidas durante o metabolismo aeróbio normal, porém, sua formação pode ser acelerada em consequência de condições ambientais adversas, como a radiação ultravioleta, altas intensidades de luz, exposição a herbicidas, toxinas, poluentes, metais, temperaturas extremas, xenobióticos e ferimentos (DAT *et al.*, 1999; MITTLER *et al.*, 2004; SCANDALIOS, 2005) e também durante a senescência e na defesa contra o ataque de patógenos (MACH & GREENBERG, 2004).

Os principais locais de produção de espécies reativas de oxigênio na célula vegetal durante o estresse abiótico são as organelas com atividade metabólica oxidante ou com fluxo de elétrons, como a cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto e na mitocôndria, onde também é chamada cadeia respiratória. Outras fontes de ERO em plantas incluem o processo fotorrespiratório nos peroxissomos e as oxidases e peroxidases na parede celular. (DAT *et al.*, 2000; BREUSEGEM *et al.*, 2001).

O poder oxidante de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 é perigoso para as células. O superóxido pode inativar importantes enzimas metabólicas, alterando sua atividade catalítica; sua forma protonada, o H_2O_2 pode atravessar a membrana celular e iniciar a oxidação lipídica pela desprotonação de ácidos graxos. Geralmente, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (GECHEV *et al.*, 2006).

Devido ao sistema antioxidante, as ERO permanecem em quantidades equilibradas nas células. Porém, na falta desse sistema, a formação de ERO é muito grande, favorecendo o estresse oxidativo (SCANDALIOS, 2005).

2.3. Modificações oxidativas dos componentes celulares das plantas

2.3.1. Modificações aos Lipídeos

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são os principais componentes das membranas celulares e são particularmente suscetíveis ao $^1\text{O}_2$ e ao $^{\bullet}\text{OH}$, já que possuem múltiplas duplas ligações (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Uma extensiva peroxidação dos AGPI diminui a fluidez das membranas permitindo a passagem de íons que só atravessariam a membrana através de transportadores específicos, além de causar danos secundários às proteínas de membrana (HALLIWELL, 2006; MØLLER, 2007).

Nos alimentos, a peroxidação lipídica provoca rancidez e desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis (SCANDALIOS, 2005).

Aldeídos como 4-hidroxil-2-nonenal (HNE), malondialdeído (MDA), além de hidroxila e cetoácidos podem ser formados com a lipoperoxidação. Esses produtos podem formar conjugados com o DNA e proteínas (MØLLER, 2007), podendo danificar estas moléculas.

2.3.2. Modificações ao DNA

As ERO podem interagir com o DNA tanto direta quanto indiretamente, tendo como alvo principal os nucleotídeos, principalmente a guanina. O $^{\bullet}\text{OH}$ é a espécie mais reativa e a conversão de guanina a 8-hidroxiguanina é a modificação mais observada (WISEMAN & HALLIWELL, 1996; MØLLER, 2007). O $^1\text{O}_2$ ataca primeiramente a guanina, já o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ não reagem com o DNA (MØLLER, 2007).

O dano causado pelas ERO pode gerar múltiplas lesões ao DNA, como a quebra de uma ou de ambas as fitas, geração de sítios AP e modificação de purinas ou pirimidinas (WISEMAN & HALLIWELL, 1996). O fato de a apoptose ser

mediada por ERO pode ser devida, em parte, pelos danos ao DNA (KAMATA & HIRATA, 1998).

As modificações indiretas envolvem a conjugação da guanina com o malondialdeído, produto da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, formando mais um anel. Além disso, pode haver mudanças na metilação de citosinas, processo importante na regulação da expressão gênica (HALLIWELL, 2006). Existem diversos mecanismos de reparo dos danos ao DNA, contudo, esses mecanismos podem estar reprimidos, como pode ser observado em algumas doenças em humanos. (WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

ERO são produzidas em grande quantidade pela mitocôndria, sendo assim, é de se esperar que seu DNA seja danificado. O dano oxidativo ao DNA mitocondrial foi detectado em níveis superiores àqueles encontrados no DNA nuclear; isso pode ser explicado pela proximidade da fonte geradora de ERO, pela falta de histonas para proteger o DNA e também pelo reparo ineficiente. Além disso, radicais intermediários formados durante a lipoperoxidação também podem afetar o DNA mitocondrial devido à sua proximidade com a membrana (WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

2.3.3. Modificações às Proteínas

Mudanças oxidativas em proteínas podem ter severas consequências, como a perda do sítio catalítico, a inibição da atividade enzimática, agregação, proteólise e alterações celulares (SHACTER, 2003).

A oxidação das proteínas é definida por modificações covalentes induzidas por ERO ou por subprodutos do estresse oxidativo. As proteínas podem ser oxidadas de diversas formas, que podem ser reversíveis ou irreversíveis.

A oxidação de tiol a dissulfeto, mecanismo muito importante na regulação do metabolismo redox, pode ser gerado por diferentes ERO. Além disso, a oxidação da cisteína provavelmente está envolvida em processos de sinalização celular. Outro exemplo interessante é a proteína de choque térmico, nos cloroplastos, inativada reversivelmente pela oxidação da metionina (MØLLER, 2007).

A reação de carbonilação é a modificação oxidativa mais comum às proteínas (MØLLER, 2007). Estudos em *Arabidopsis thaliana* (JOB *et al.*, 2005) demonstraram que a carbonilação proteica é aumentada durante a germinação de

sementes e que as proteínas oxidadas derivaram de diversos compartimentos subcelulares como o citosol, cloroplastos e mitocôndria.

Davies (2004) demonstrou que o $^1\text{O}_2$ reage com os aminoácidos Triptofano (Trp), Histidina (His), Tirosina (Tyr), Metionina (Met) e Cisteína (Cys); o radical $\cdot\text{OH}$ reage rapidamente com aminoácidos, sendo que os mais reativos são Cys, Met, Trp, Tyr, e Phe (fenilalanina) (XU & CHANCE, 2005); o $\text{O}_2^{\cdot-}$ interage com os centros Fe-S, e o H_2O_2 com cisteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

2.3.4. Modificações aos Carboidratos

Fry (1998) demonstrou que a combinação de ascorbato e H_2O_2 pode levar à quebra de polissacarídeos, enquanto que os radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} e $^1\text{O}_2$ não reagem com carboidratos. Além disso, demonstrou que o radical $\cdot\text{OH}$ reage com carboidratos, retirando um átomo de hidrogênio antes ligado a um carbono da cadeia do polissacarídeo levando à quebra de ligações glicosídicas.

Em plantas, o crescimento é provocado pelo afrouxamento da estrutura da parede celular, que é composta por diversos carboidratos (FRY, 1998; SCHOPFER, 2001). O afrouxamento da parede celular é um processo muito importante em processos como a germinação da semente e o amadurecimento dos frutos (MÜLLER, 2009).

O desenvolvimento das plantas requer uma série de mudanças estruturais na parede celular, como a hidrólise enzimática de polissacarídeos por glicosidases (FRY, 1998; MÜLLER *et al.*, 2009; DUAN & KASPER, 2011) e o ataque do radical $\cdot\text{OH}$ levando à quebra de polissacarídeos presentes na parede celular.

2.4. O Papel das Espécies Reativas de Oxigênio na Sinalização Celular

Devido a sua presença durante o estresse, as ERO foram consideradas unicamente como prejudiciais. Agora, também se sabe que são moléculas vitais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e que participam de complexas cascatas de sinalização na célula, atuando em resposta a estresses.

A resposta é iniciada quando uma planta reconhece o estresse a nível celular através de receptores, fatores de transcrição e fosfatases. A detecção por receptores resulta na geração de sinais de Ca^{2+} e ativação das fosfolipases C e D, que geram

ácido fosfatídico (PA). Ca^{2+} e PA ativam a proteína quinase OXI1, resultando na ativação da cascata das proteínas quinases (MAPK) e na indução de fatores de transcrição que regulam a produção e a remoção de ERO. A inibição de fosfatases pelas ERO também podem ativar as quinases OXI1 e MAPK3 e 6. Por sua vez, as MAPK atuam no aumento da expressão de fatores de transcrição das famílias WRKY, Zat, RAV, GRAS e Myb, que ativam a remoção de ERO (MITTLER *et al.*, 2004).

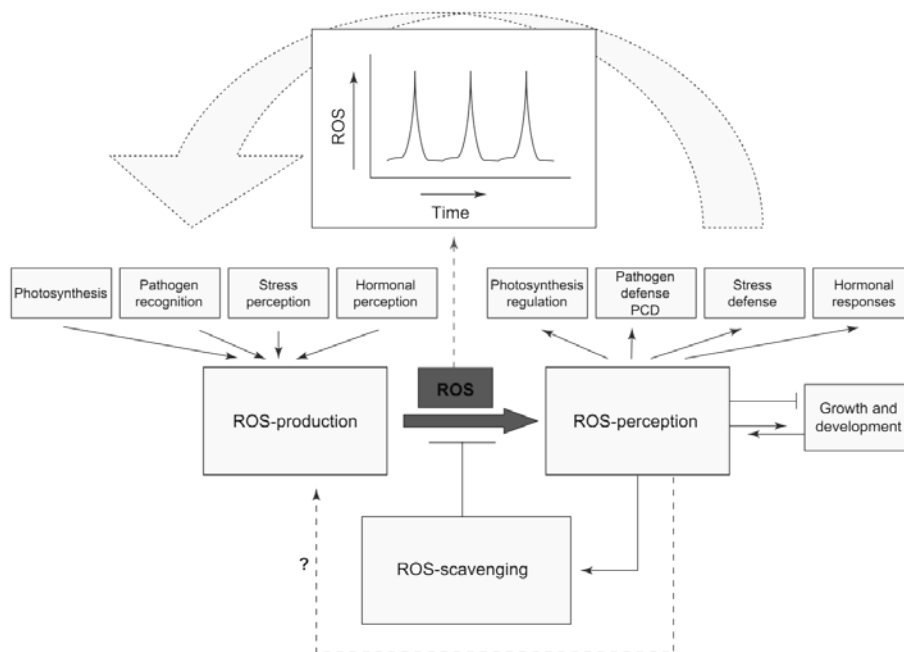


Figura 2: Modulação da sinalização celular pelas ERO em plantas. Diferentes sinais celulares levam ao aumento da produção de ERO, que são percebidas por diferentes sensores e ativam vias de resposta, podendo também afetar crescimento e desenvolvimento. Os níveis de ERO são controlados pelos antioxidantes até níveis não tóxicos, podendo ativar duas vias de sinalização: Via de fatores de transcrição ou via de ativação de Proteínas quinases para ativar fatores de transcrição, dependendo da natureza e duração do estresse, bem como da célula em questão (MITTLER *et al.*, 2004).

2.5. Sistemas antioxidantes em plantas

As plantas desenvolveram dois tipos de defesas antioxidantes para controlar os níveis de ERO: os mecanismos enzimáticos e os não enzimáticos. Entre as defesas enzimáticas estão as Superóxido dismutase, (SOD); catalase (CAT); ascorbato peroxidase (APX); glutatona redutase (GR); monodeidroascorbato redutase (MDHAR); deidroascorbato redutase (DHAR); glutatona peroxidase (GPX); guaiacol peroxidase (GOPX) e glutatona-S-transferase (GST). Entre as defesas não enzimáticas, compostos como ácido ascórbico (ASH); glutatona (GSH); compostos fenólicos; alcaloides e α -tocoferóis (XU *et al.*, 2006; GILL & TUTEJA, 2010).

As SOD convertem $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , que é então detoxificado pelas enzimas APX, PRX, GPX ou CAT; as APX participam do ciclo Ascorbato/glutatona (AsA/GSH); as PRX detoxificam peróxidos através de um mecanismo baseado em tióis; as GPX utilizam tioredoxinas como agentes redutores. (IQBAL *et al.*, 2006), e as CAT detoxificam o H_2O_2 em água e O_2 sem necessidade de um substrato doador de elétrons (APEL & HIRT, 2004).

2.6. Peroxidases

Peroxidases (EC 1.11.1.x) estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, desempenhando um papel regulatório nos processos de transdução de sinal na parede celular, metabolismo de auxina, resposta a estresses e crescimento celular. Representam um grande grupo de enzimas codificadas por famílias multigênicas, e catalisam a redução do peróxido usando uma grande variedade de substratos, como subunidades de ligninas, lipídeos de membrana e também cadeias laterais de alguns aminoácidos. Pelo seu papel multifuncional, sua atividade pode ser detectada em todas as etapas da vida de diversas plantas, desde a germinação da semente, até a senescência (PASSARDI *et al.*, 2005).

2.6.1. Glutatona Peroxidase

Glutatona Peroxidases (GPX) pertencem a uma ampla família de proteínas que, ao longo dos anos, foram descobertas em quase todos os reinos da vida (PASSARDI *et al.*, 2007). São peroxidases não heme, do grupo das tiol peroxidases, e catalisam a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos à água ou a álcoois

correspondentes, atenuando sua toxicidade (URSINI, 1995; ROUHIER & JACQUOT, 2005).

Ao contrário da maioria dos seus homólogos em animais, as GPX identificadas em plantas possuem cisteína em vez de selenocisteína no seu sítio ativo. Curiosamente, essas GPX não são dependentes de glutathione, mas sim da tioredoxina como doador de elétrons (KOH *et al.*, 2007). A presença das GPX em plantas já foi relatada por diversos autores, mas o papel individual de cada GPX em uma espécie de planta ainda não foi caracterizado.

2.7. Modelo de estudo

O arroz é um modelo de estudo para monocotiledôneas, assim como *Arabidopsis thaliana* é para as dicotiledôneas. Entre as razões para o seu uso como planta modelo estão o sequenciamento completo do seu genoma (SASAKI, 2005), a elevada sintonia com outros cereais como milho e trigo (GALE & DEVOS, 1998), a extensa bibliotecas de EST disponíveis e os avanços em protocolos de transformação mediados por *Agrobacterium tumefaciens*.

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz se destaca pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto em nível econômico quanto social, sendo considerado o produto de maior importância econômica em muitos países em desenvolvimento (BAÊTA-DOS-SANTOS, 2004).

Em condições de cultivo favoráveis, a produção mundial de arroz caminha para um novo recorde: entre os meses de junho e setembro de 2011, foi registrado um aumento de 3% da produção com base no ano de 2010 (FAO, 2011). São necessários mais estudos que possibilitem o aumento da produtividade deste cereal também em condições desfavoráveis.

3. Objetivos

A caracterização funcional de genes cujos produtos podem proteger as plantas contra danos oxidativos pode contribuir para o desenvolvimento de plantas mais resistentes e adaptadas ao meio ambiente. O objetivo geral deste trabalho é contribuir com a elucidação das funções dos produtos gênicos dessa família através de estudos de expressão desses genes.

Os objetivos específicos são:

- ❖ Analisar o perfil de expressão dos cinco genes de GPX presentes no genoma do arroz durante as fases vegetativa e reprodutiva das plantas.
- ❖ Avaliar as respostas desses genes aos estresses abióticos frio, seca, radiação UV, concentrações tóxicas de alumínio e variações no fotoperíodo.
- ❖ Clonar o promotor de *OsGpx3* no vetor pHGWFS7 para posterior estudo da expressão desse gene em diferentes órgãos e tecidos da planta.

4. Material e Métodos

Material vegetal

As plantas para a análise da expressão durante a fase vegetativa foram plantadas em vermiculita e permaneceram em sala de cultivo; já as plantas para a análise da fase reprodutiva foram cultivadas em casa de vegetação. Foram realizadas coletas de amostras da fase vegetativa das plantas aos 7, 14 e 30 dias, e de panículas nos estádios R2 a R9, baseado na escala de desenvolvimento proposta por Counce *et al.*, 2000 (Fig.1 – Anexo).

Para a análise de resposta a estresses abióticos, foi utilizado um banco de cDNA de plantas previamente submetidas às condições de estresse citadas:

- ❖ No experimento de seca, as plantas tratadas permaneceram em vasos contendo terra, na ausência de água durante 15 dias, enquanto que as plantas controle foram normalmente regadas.
- ❖ Para o experimento de exposição à luz ultravioleta B, foram realizados dois períodos de estresse de 4 horas, com um intervalo de 20 horas entre cada exposição. As coletas foram realizadas imediatamente após a segunda exposição

à luz UV-B, 6 horas após a interrupção da exposição e 24 horas após a interrupção da exposição.

- ❖ Para avaliar as diferenças na expressão dos genes *OsGPx* na luz e no escuro, precedeu-se da seguinte forma: após 12 horas de luz em um fotoperíodo de 12 horas, as plantas controle foram coletadas e as plantas tratadas foram separadas em dois lotes: um deles permaneceu no escuro por 12 horas e o outro permaneceu na luz durante o mesmo período.
- ❖ Para o estresse de frio, as plantas tratadas permaneceram durante 24 horas na temperatura de 10°C, enquanto que as plantas controle permaneceram a 28±2°C.
- ❖ No estresse por alumínio, as plantas controle permaneceram em solução hidropônica e as tratadas foram cultivadas na mesma solução hidropônica, com a adição de Cloreto de alumínio à solução, numa concentração final de 150µM de alumínio, durante 4 e 8 horas.

Análise da Expressão gênica

Procedeu-se com a extração de RNA e a síntese de cDNA das amostras das fases vegetativa e reprodutiva. Para a análise da expressão dos cinco genes de GPX durante o desenvolvimento e os estresses, foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando primers específicos para cada gene de GPX, assim como para os genes normalizadores (Apêndice C). Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Shmittgen, 2001).

Estudo do promotor do gene *OsGPx3*

Um fragmento de 2041pb acima do códon de início da tradução do gene *OsGPx3* foi amplificado por PCR, utilizando iniciadores específicos (Apêndice C). Esse fragmento foi clonado no vetor pENTR (Invitrogen) e então recombinado para o vetor de destino, pHGWFS7. Neste vetor, o promotor em estudo controla a expressão dos genes repórteres GFP (Green fluorescent protein) e GUS (β -glucuronidase). Posteriormente, pretende-se realizar a transformação de plantas com essa construção para verificar os tecidos onde esse gene está sendo expresso.

5. Trabalho experimental em formato de artigo científico

O trabalho foi escrito nos moldes do periódico "*Plant Science*".

Title:

Rice glutathione peroxidase genes are expressed throughout plant development and modulated under abiotic stress conditions

Type of paper: Original research paper

Author names and affiliations:**Leila Spagnolo Fonini**

Laboratório de Genética Vegetal. Instituto de Biociências. Departamento de Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Bento Gonçalves, 9500

Agronomia

91501-970 - Porto Alegre, RS, Brasil

leila.fonini@ufrgs.br

Gisele Passaia

Laboratório de Genética Vegetal. Instituto de Biociências. Departamento de Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Bento Gonçalves, 9500

Agronomia

91501-970 - Porto Alegre, RS, Brasil

gisapassaia@gmail.com

Márcia Margis-Pinheiro (Corresponding author)

Laboratório de Genética Vegetal. Instituto de Biociências. Departamento de Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Bento Gonçalves, 9500

Agronomia

91501-970 - Porto Alegre, RS, Brasil

marcia.margis@ufrgs.br

Phone number: +55 51 33089814

Abstract

Reactive Oxygen Species (ROS) are normally produced as a byproduct of the aerobic metabolism and the production can be increased during biotic and abiotic stress. In excess, these molecules can damage cells. To neutralize these compounds, aerobic organisms developed various enzyme systems, among them, enzymes of the Glutathione Peroxidase (GPX) family. Oxidative stress derived from ROS is a major factor of damage to plants exposed to adverse environmental conditions. To contribute to the elucidation of the functions of gene products of this family, we have determined the expression profile of the five GPX genes present in the rice genome. Samples were collected from roots and shoots of rice plants during the vegetative phase, and from panicles throughout the reproductive development. Also, rice plants were submitted to different abiotic stresses. Gene expression was determined using RT-qPCR. In general, the expression of GPX genes was modulated by dark, cold, UV-B and drought stresses. Also, it was observed that these genes are more expressed in intermediate stages of panicle development. Besides, our results indicate that this gene family could also be involved with plant morphological development. More studies are necessary to support these results.

Keywords

ROS, Glutathione peroxidase, Abiotic stress, Rice development

Abbreviations

ROS: Reactive Oxygen Species

GPX: Glutathione peroxidase (enzyme)

OsGpx: Glutathione peroxidase genes in *Oryza sativa L.*

$^1\text{O}_2$: Singlet oxygen

$\text{O}_2^{\bullet-}$: Superoxide radical

H_2O_2 : Hydrogen peroxide

$\bullet\text{OH}$: Hydroxyl radical

FDH: Formate dehydrogenase

eF1 α : Elongation factor 1 α

Ubi: Ubiquitin fusion protein

snu6: Small nuclear RNA 6

Highlights

¹ GPX genes are expressed throughout rice plant development

² GPX genes are more expressed at anthesis and grain filling phases of rice plants

³ GPX genes are modulated by abiotic stresses in rice

1. Introduction

Reactive Oxygen Species (ROS) such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) are normally generated as byproducts of aerobic metabolism. ROS are highly toxic due to their reactive properties, which results in severe damage to cellular macromolecules [1]. However, ROS are also known to play important roles in signal sensing and transduction in response to various biotic and abiotic stimuli and during developmental processes in both plants and animals [2][3][4].

All biologically relevant macromolecules are susceptible to damage by ROS [5]. ROS can induce DNA damages, including base deletion, pyrimidine dimers, cross-links, strand breaks and base modification [6], leading to physiological effects, such as reduction of protein synthesis, destruction of cell membranes and damages to photosynthetic proteins, affecting growth and development [7]. Protein oxidation can lead to site-specific amino acid modifications, fragmentation of the peptide chain, aggregation of cross-linked reaction products, altered electrical charge, loss of function and cross-linking [8].

The peroxidation of lipids is considered the most damaging process [6], it can decrease membrane fluidity, make easier for phospholipids to exchange between two halves of the bilayer, increase the leakiness of the membrane to substances that usually do not cross this barrier without a specific channel, and damage membrane proteins inactivating receptors, enzymes and ion channels. In vivo $\cdot\text{OH}$ attack of cell wall polysaccharides appears to be a mechanism by which ROS mediate diverse developmental processes of plants [9].

Plant growth and productivity is adversely affected by various abiotic and biotic stress factors, which limit growth and productivity. Abiotic stress is the major cause of crop failure worldwide [10].

Peroxidases (EC 1.11.1.x), which are encoded by multigenic families, are involved in several important physiological and developmental processes such as cross-linking of cell wall components, responses to stressful conditions, and cell elongation. Because of their multifunctional roles, peroxidase activity and expression can be detected throughout the whole life of several plants, from germination to senescence [11].

The presence of GPX in plants has been reported by several groups, but the roles of individual members of this family in a single plant species have not completely unveiled.

Many efforts have been made to understand the relationship between the formation of reactive species, the antioxidant system and plant development. The understanding of the antioxidant system may lead to new strategies for the development of plants more resistant to multiple stresses, minimizing losses due to the decrease in production.

The functional characterization of genes whose products can protect plants against oxidative damage may contribute to the development of cultivars resistant and adapted to the environment, and thus increase their productivity. To contribute to the elucidation of the role of GPX family in rice, we determined the expression pattern of the five rice GPX genes in response to abiotic stresses and during plant development.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

For all the experiments, seeds of rice (*Oryza sativa L. ssp. japonica cv. nipponbare* or *ssp. Indica*) were higienized in a solution of sodium hypochlorite 2%, washed with ultrapure sterile water, and germinated on plates containing absorbent paper and distilled sterile water at $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ in light absence during four days. After this, the plants were acclimated and then, transferred to soil at a green house, with temperature of $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ and a photoperiod of 12 hours in light and 12 hours in the dark. Samples were collected in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction with Trizol (Invitrogen).

2.1.1. RNA Extractions

Approximately 100mg of plant material were macerated in liquid nitrogen. Total RNA were extracted with 1mL of Trizol (Invitrogen). After vortexing, the material stayed for 5 minutes at room temperature. 200 μL of chloroform were added and the samples were shaken vigorously for 15 seconds. After incubating for 5 minutes at room temperature, samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C . The aqueous phases were collected and transferred to new microfuge tubes containing 0.5 mL of isopropanol and incubated for 10 minutes at room temperature. RNA was collected by centrifugation at 12,000 g for 10 minutes at 4°C . RNA was washed with 1 mL of ethanol 70% and then resuspended in 40 μL of ultrapure autoclavated water.

2.1.2. cDNA Synthesis

The synthesis of cDNA was performed with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Initially, RNA was treated with DNase according to manufacturer's protocol. Then, a mix containing 1 μL of oligonucleotide Poli 24TV (0.5 μM), 1 μL dNTP (10 μM) was prepared. To this mix, 1 μg of treated RNA was added. The reaction was incubated for 5 minutes at 65°C and immediately transferred to ice, where remained for 5 minutes. In another step, 27 μL of ultrapure distilled water and 10 μL of the M-MLV 5X Reaction Buffer were added. The material was

homogenized and 1 μL of the enzyme (200 U/ μL) M-MLV RT was added. After incubation of 2 hours at 37°C, the material was transferred to a bath at 70°C for 15 min. The final volume was diluted by adding 450 μL of ultrapure distilled water.

2.1.3. Real Time Quantitative PCR reactions

For RT-qPCR reactions, cDNAs were diluted again tenfold, and the reactions were performed with specific primers for each rice *Gpx* and for constitutive genes formate dehydrogenase (FDH, GenBank ID: u77637.1), Elongation factor 1 α (EF1 α , GenBank ID: AJ252135), Ubiquitin fusion protein (Ubi, GenBank AK103230) and Small nuclear RNA 6 (Snu6).

Reactions were performed with 2.5 ng/ μL cDNA, 0.2 μM forward and reverse primers, 0.1 mM of dNTPs, 1x PCR Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.1x Sybr Green and 0.25 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The PCR conditions included a initial step of desnaturation of 5 minutes at 94°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 94°C, 10 seconds at 60°C and 15 seconds at 72 °C. Melting curve was performed by 15 seconds at 95°C for desnaturation, 1 minute at 60°C for annealing, and measurement each 0.4°C up to 95°C. The method for evaluating the relative expression of GPX genes were $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [12]. All statistical analyzes were performed by Student's T test, with p<0.05 significance, using Microsoft Excel software.

2.2. Expression during plant development

Each sample consisted of a pool containing four plants. Each point represents a mean of four samples. For the vegetative phase, the samples were collected from roots and leaves of 7, 14 and 30 day-old plants. RT-qPCR reactions were normalized by FDH and EF1 α . For the reproductive phase, samples were collected from panicles of stages R2 to R9 and normalized using Snu6. According to Counce *et al.* [13], the stages of rice panicle are expressed in panicle initiation (R0), panicle differentiation (R1), flag leaf collar formation (R2), panicle exertion (R3), anthesis (R4), grain length and width expansion (R5), grain depth expansion (R6), grain dry down (R7), single grain maturity (R8), and complete panicle maturity (R9).

2.3. Drought stress

Plants were cultivated in commercial soil “Solomax” (Eucatex Química e Mineral, Ltda.) during four weeks at $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, with normal irrigation. After this period, plants were maintained without water during 15 days. The control plants were normally watered in the same period. Leaves of both lots of plants were sampled. RT-qPCR reactions were normalized by EF1 α and Ubi.

2.4. UV-B light stress

Plants were exposed to UV-B light for two periods of 4 hours with an interval of 20 hours between each UV-B exposure. Samples were collected immediately after the second irradiation, 6 hours and 24 hours after the end of the stress. Control plants remained under a normal photoperiod in absence of UV-B exposition. RT-qPCR reactions were normalized by EF1 α and Ubi.

2.5. Light and dark stress

After 12 hours of light, control samples were collected and treated plants were separated in two lots, one lot of plants remained in continuous light, and the second one in continuous darkness for 12 hours. RT-qPCR reactions were normalized by EF1 α , FDH and Ubi.

2.6. Cold stress

Plants were cultivated in a growth chamber during four weeks at $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Plants were exposed to 10°C for 24 hours. Control plants remained at $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Leaf samples were collected at the end of the treatment. The normalizer genes used in RT-qPCR experiments were EF1 α and FDH. Only for this experiment, subspecies *Indica* was utilized.

2.7. Aluminum stress

Four days-old seedlings were placed in plastic pots containing a hydroponic solution as described by Furlani & Furlani [14] and grown in a growth chamber at $28\pm 2^\circ\text{C}$ for 5 days. After this, was added AlCl_3 to a final concentration of $150\mu\text{M}$ aluminum to the treated plants. Control plants were maintained in the same hydroponic solution without aluminum. Shoots were collected after 4 and 8 hours of stress.

3. Results

3.1. GPX genes show a differential expression during development

During vegetative phase, *OsGpx4* was more expressed in leaves of 14 and 30 days-old plants (Fig. 1B). During reproductive phase, the whole *OsGPx* gene family presented a tendency of higher expression on the phases R4 to R7 (Fig. 2).

3.2. GPX genes are modulated under abiotic stresses

When exposed to low temperature, *OsGpx1*, *OsGpx3* and *are* upregulated and *OsGpx2* and *OsGpx 4* were not modulated (Fig. 3A). In response to drought stress, *OsGpx4* and *OsGpx5* seemed to be downregulated (Fig. 4). In general, *OsGpx* genes were modulated by light absence: *OsGpx1*, *OsGpx2*, *OsGpx4* and *OsGpx5* were upregulated in the dark, in comparison with plants that remained in the light (Fig. 5). Under UV-B light, all five genes of *OsGPX* were downregulated six hours after the end of the stress, and *OsGpx3* e and *OsGpx4* were downregulated since the end of stress (Fig. 6). Toxic concentrations of aluminum do not seem to modulate the expression of *OsGPX* genes (Fig. 7).

4. Discussion

Reactive oxygen species (ROS) were considered to be toxic byproducts of aerobic metabolism, which were detoxified by antioxidants. However, in recent years, it has become apparent that plants actively use ROS as signaling molecules to control processes such as programmed cell death, abiotic stress responses, pathogen defense and systemic signaling. In addition, key steps of the signal transduction pathway that senses ROS in plants have been identified. However, several questions concerning the relationships between ROS signaling, ROS stress and the production and scavenging of ROS in the different cellular compartments still remains. ROS signaling should be evaluated as an integrated signaling pathway with many different signaling networks.

In the present work, we demonstrated that GPX genes in rice are regulated under abiotic stresses and during plant development. Our results suggest that GPX family may be involved in rice plant morphological development. According to Counce [13], phases R4 to R7 are related to anthesis, caryopsis expansion and grain filling. Peroxidases could participate in the control of the H₂O₂ level and therefore be directly related to the control of the elongation process [11]. In Arabidopsis plants, a transgenic line deficient in chloroplastic GPX forms (*AtGpx1* and *AtGpx7*) showed leaf and chloroplast morphology alterations [15].

As part of antioxidant system, it would be expected that *Gpx* would have differential expression under abiotic stress; however, the genes were not upregulated in response to all treatments. Our results suggest that different stresses induce different routes of detoxification in plants. It would be also possible that GPX does not act directly as a peroxide detoxifying enzyme, but could act as a regulatory protein in signaling pathways.

Understanding how antioxidant metabolism is regulated in plant cells is challenging since these enzymes have substrates that also function as signal molecules and are represented by several isoforms targeted to different intracellular compartments. It seems that GPX participates on ROS detoxification and signaling pathways, however, these assumptions remain speculative as long as the *in vivo* functions of single peroxidases have not been determined.

This is the first study of all GPX genes expression during plant development and under stress conditions. More studies are necessary to better understand the evolution, the roles, and the regulations of this multifunctional enzyme.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq).

5. References

- [1] SCANDALIOS, J.G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, v.101, p.7-12, 1993.
- [2] DAT, J.; Vandenabeele, S.; Vranova, E.; Van-Montagu M.; Inzé, D.; Van-Breusegem, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress Responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.57, p.779-795, 2000.
- [3] BREUSEGEM, F.V.; Vranová, E.; Dat, J.F.; Inzé, D. *Plant Science*, v.161, p.405-414, 2001.
- [4] MITTLER, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegen, F. Reactive oxygen gene network of plants. *TRENDS in Plant Science*, v.9 (10), p.1360-1385, 2004.
- [5] JOB, C.; Rajjou, L.; Lovigny, Y.; Belghazi, M.; Job, D. Patterns of Protein Oxidation in Arabidopsis Seeds and during Germination. *Plant Physiology*, v.138, p. 790-802, 2005.
- [6] TUTEJA, N.; Singh, M. B.; Misra M. K.; Bhalla P. L.; Tuteja, R. Molecular Mechanisms of DNA Damage and Repair: Progress in Plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, V.36(4), P.337-397, 2001.
- [7] BRITT, A.B. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science*, v. 4, p. 1360-1385, 1999.
- [8] SCANDALIOS, J.G.; Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, p.995-1014, 2005.
- [9] MULLER, K; Linkies, A.; Vreeburg R. A.; Fry, S.C.; Krieger-Liszkay A.; Leubner-Metzger, G. In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cressseed germination and elongation growth. *Plant Physiology*, v. 150, p.:1855-1865, 2009.

- [10] Mahajan, S.; Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.444, p.139-158, 2005.
- [11] PASSARDI, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Reports*, v. 24, p. 255-265, 2005.
- [12] LIVAK, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, v.25 (4), p. 402-408, 2001.
- [13] COUNCE, P. A.; Keisling, T. C.; Mitchell A. J. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science*, v. 40 (2), p. 436-443, 2000.
- [14] FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e de seleção de plantas em condições nutricionais adversas. *Technical bulletin* Instituto Agronômico de Campinas, v.101, p. 1-34, 1998.
- [15] CHANG, C.C.C.; Ślesak, I.; Jordá, L.; Sotnikov, A. Melzer, M.; Miszalski, Z.; Mullineaux, P.M.; Parker, J.E.; Karpin'ska, B.; Karpin'ski, S. Arabidopsis Chloroplastic Glutathione Peroxidases Play a Role in Cross Talk between Photooxidative Stress and Immune Responses. *Plant Physiology*, v.150, p.670-683, 2009.

Figures

Figure 1

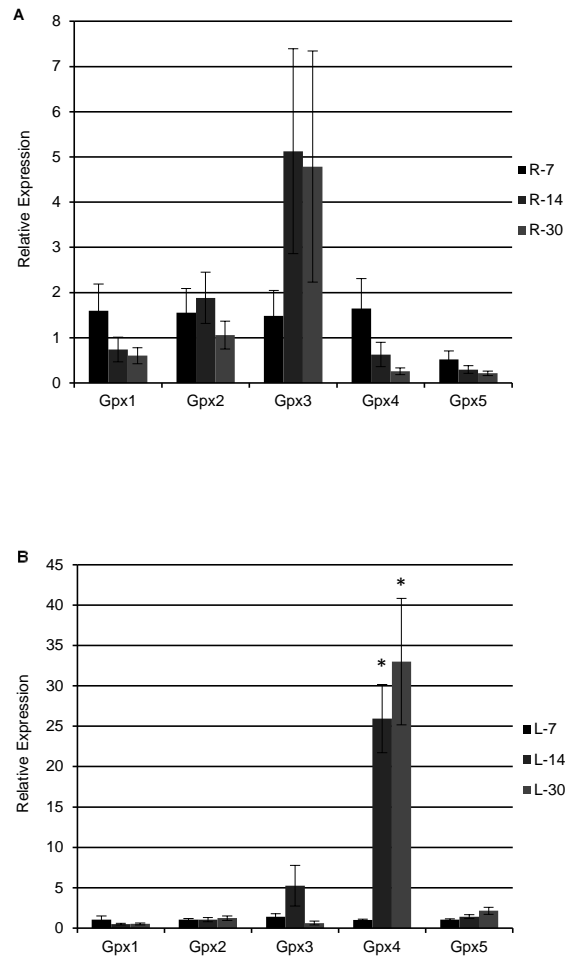


Figure 2

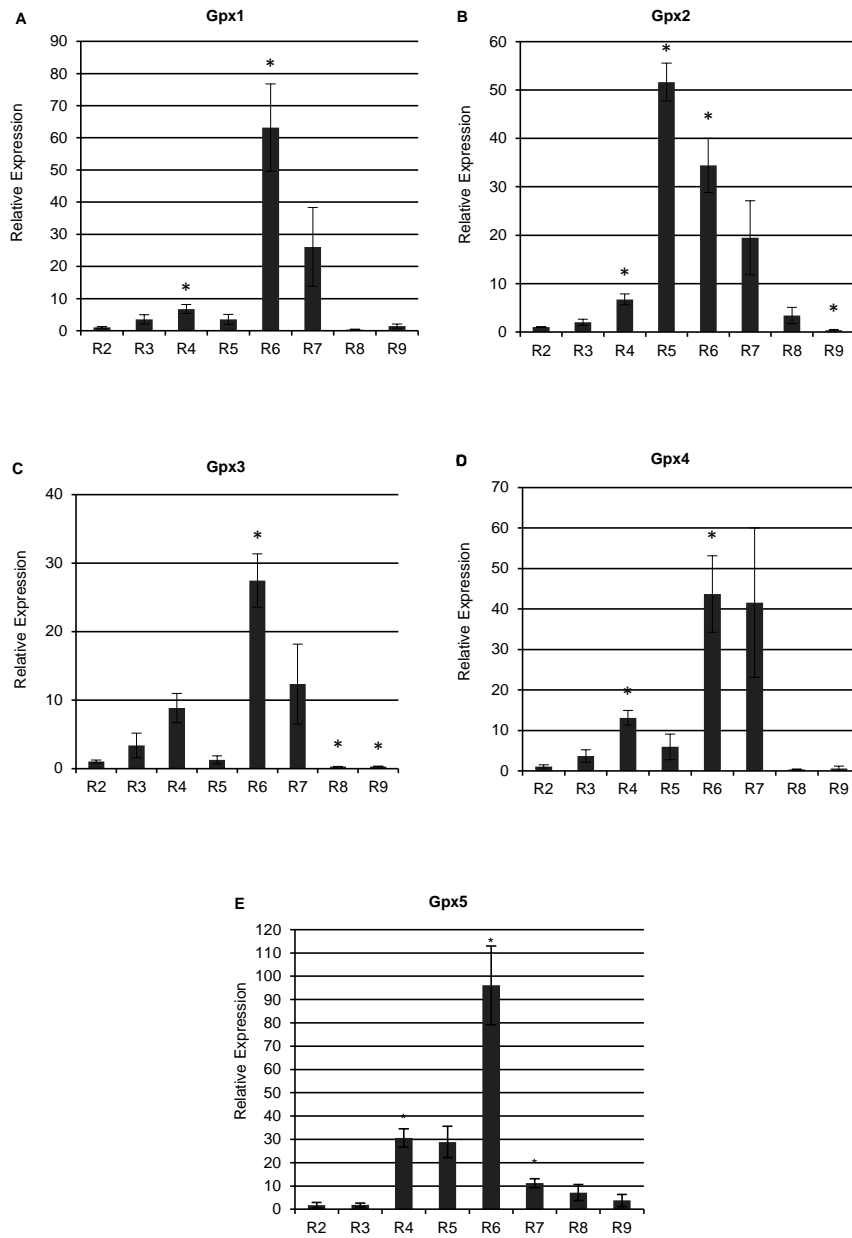


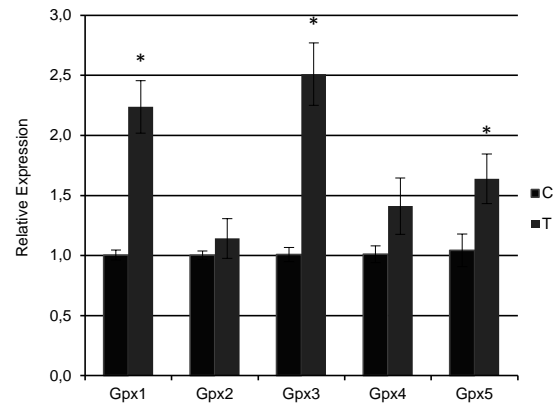
Figure 3

Figure 4

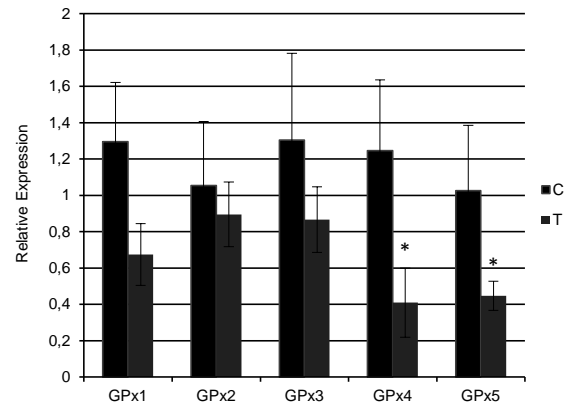


Figure 5

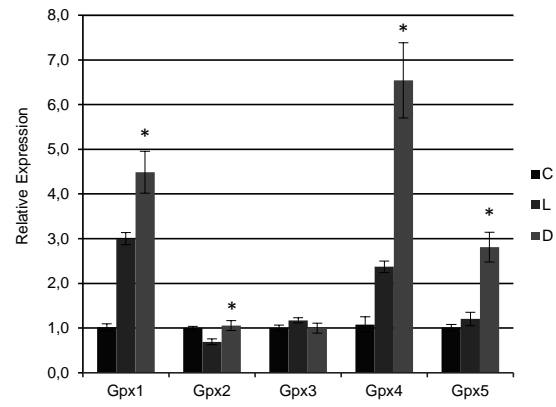


Figure 6

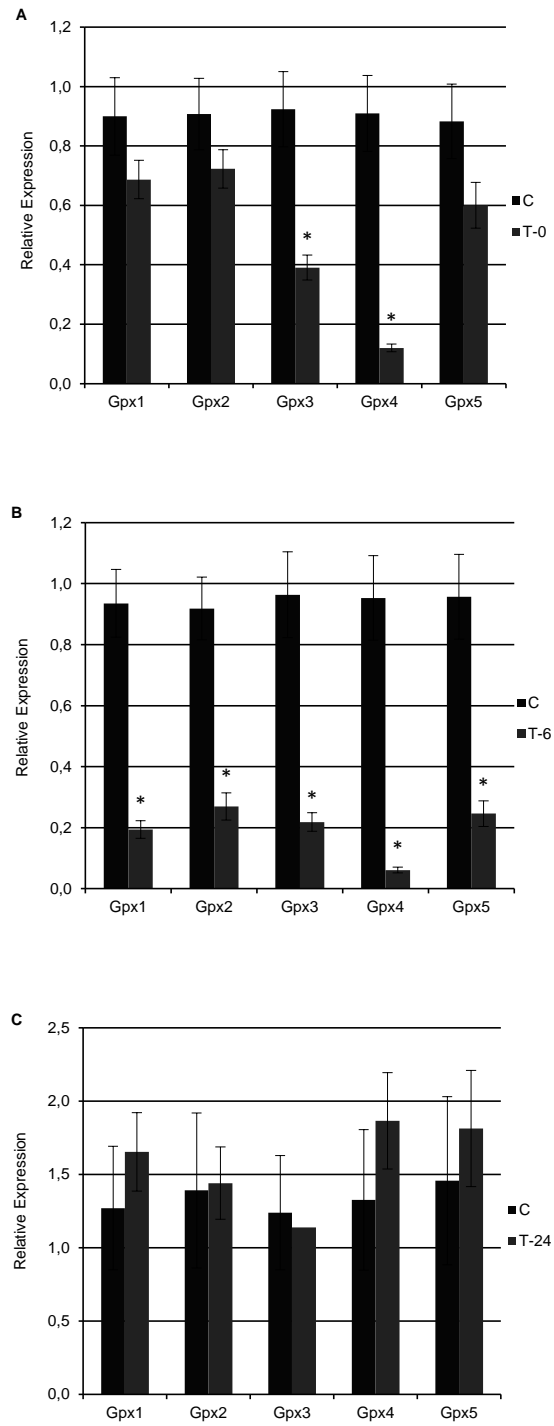


Figure 7

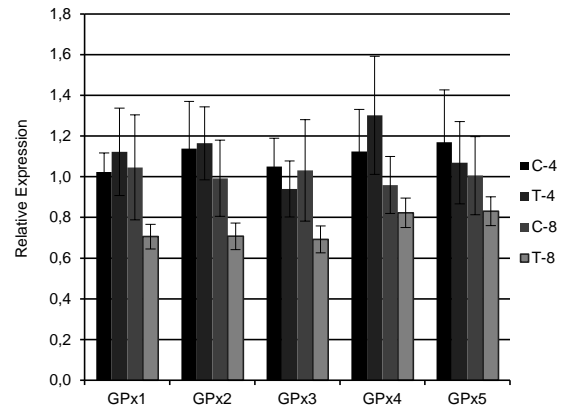


Figure 1**Relative expression of *OsGpx* during vegetative phase.**

A. Relative expression of *OsGpx* genes in roots. There were no differences between stages analyzed.

R-7, Roots of 7 day-old plants; R-14, Roots of 14 day-old plants; R-30, Roots of 30 day-old plants.

B. Relative expression of *OsGpx* genes in leaves. *OsGPX4* is more expressed in leaves of 14 and 30 day-old plants.

L-7, Leaves of 7 day-old plants; L-14, Leaves of 14 day-old plants; L-30, Leaves of 30 day-old plants.

All reactions were normalized with FDH and EF1 α .

* p<0.05

Figure 2**Relative expression of *OsGpx* during reproductive phase.**

A. Relative expression of *OsGpx1*. *OsGpx1* is more expressed in R4 and R6 stages.

B. Relative expression of *OsGpx2*. *OsGpx2* is more expressed in R4 to R6 stages.

C. Relative expression of *OsGpx3*. *OsGpx3* seems to be more expressed in R6 stages, while in R8 and R9, the expression is reduced.

D. Relative expression of *OsGpx4*. *OsGpx4* is more expressed in R4 and R6 stages.

E. Relative expression of *OsGpx5*. *OsGpx5* is more expressed in R4, R6 and R7 stages.

R2 to R9 represent the phases of reproductive development.

All reactions were normalized with snu6.

* p<0.05

Figure 3**Relative expression of *OsGpx* in plants exposed to cold stress**

A. Relative expression of rice plants exposed to 10°C. *OsGpx 1*, *OsApx3* and *OsApx5* were induced in leaves of rice plants exposed to cold stress.

C: Control plants; T: Stress treated plants.

All reactions were normalized with EF1 α and FDH.

* p<0.05

Figure 4**Relative expression of *OsGpx* in plants exposed to drought stress**

Gpx 4 and 5 had reduced expression under this condition.

C: Control plants; T: Stress treated plants.

All reactions were normalized with EF1 α and Ubi.

* p<0.05

Figure 5**Relative expression of *OsGpx* in plants on light or dark**

Gpx 1, 2, 4 and 5 seem to be induced in the dark when compared to plants that remained on light.

C- control plants; D- plants that stayed on the dark; L- plants that stayed on the light.

All reactions were normalized with EF1 α , FDH and Ubi.

* p<0.05

Figure 6**Relative expression of *OsGpx* in plants on UV-B light**

A. *Gpx* 3 and 4 were modulated immediately after the end of stress.

C: Control plants; T-0: Treated plants collected immediately after the end of stress.

B. All *Gpx* were modulated 6 hours after the end of stress.

C: Control plants; T-6: Treated plants collected 6 hours after the end of stress.

C. There is no difference in *Gpx* expression 24 hours after the end of stress.

C: Control plants; T-24: Treated plants collected 24 hours after the end of stress.

All reactions were normalized with EF1 α and Ubi.

* p<0.05

Figure 7**Relative expression of *OsGpx* in plants exposed to aluminum**

Gpx genes were not modulated under toxic concentrations of aluminum.

T-4: Stress treated plants for 4 hours, C-4: Control plants.

T-8: Stress treated plants for 8 hours, C-8: Control plants.

All reactions were normalized with EF1 α and Ubi.

6. Conclusões e Perspectivas

A regulação do metabolismo antioxidante em plantas é muito complexa, envolvendo uma série de famílias gênicas codificando enzimas envolvidas na detoxificação de ERO e na sinalização em resposta a estresses e antioxidantes. O mecanismo antioxidante ainda não está completamente elucidado, no entanto, autores sugerem um mecanismo compensatório entre os diferentes sistemas de defesa (MITTLER, 2002; BONIFÁCIO, 2011).

Nossos resultados sugerem que, em arroz, os genes que codificam GPX são regulados de forma complexa, indicando uma atuação em resposta a estresses abióticos e uma possível participação no desenvolvimento morfológico das plantas de arroz, que ainda deve ser confirmada.

Pretende-se concluir a análise do perfil de expressão desses genes através do estudo das suas sequências promotoras. Para isso, as sequências promotoras dos cinco genes estão sendo clonadas no vetor pENTR e recombinadas ao vetor pHGWFS7, que contém os genes repórteres GFP (Green Fluorescent protein) e GUS (β -glucuronidase). Neste trabalho, apresentamos a clonagem da sequência promotora do gene *OsGpx3* neste vetor. A clonagem foi confirmada por PCR (Apêndice A) com primers específicos para o promotor do gene da GPX3 (Apêndice C), e com primers para o gene Higromicina fosfotransferase, presente no vetor pHGWFS7 (Apêndice C). O próximo passo é a transformação de calos embriogênicos de arroz, possibilitando a determinação dos tecidos onde os genes são mais expressos.

7. Bibliografia Adicional

- [1] AGRAVAL, G. K.; Rakwal, R.; Jwa, N.S.; Agrawal, V.P. Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (*OsPHGPX*) gene in seedling leaves. *Gene*, v. 283, p.227–236, 2002.
- [2] BAÊTA-DOS-SANTOS, A.; Rabelo, R. R. Cultivo do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins (2004). Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoTocantins/index.htm>>. Acesso em 12 set. 2011.
- [3] BONIFACIO, A.; Martins, M.O.; Ribeiro, C.W.; Fontenele, A.V.; Carvalho, F.E.L.; Margis-Pinheiro, M.; Silveira, J.A.G. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, v.34 (10), p. 1705–1722, 2011.
- [4] CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, v.58, p.79-110, 1989.
- [5] DAVIES, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, v.3, p.17-25, 2004.
- [6] DEPÉGE, N.; Drevet, J.; Boyer, N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *European Journal of Biochemistry*, v. 253, p. 445–451, 1998.
- [7] DUAN, J.; KASPER, D.L. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*, v.21(4), p.401-409, 2011.
- [8] FALTIN, Z.; Holland, D.; Velcheva, M.; Tsapovetsky, M.; Roedel-Drevet, P.; Handa, A.K.; Abu-Abied, M.; Friedman-Einat, M.; Eshdat, Y.; Perl, A. Glutathione Peroxidase Regulation of Reactive Oxygen Species Level is Crucial for In Vitro Plant Differentiation. *Plant Cell Physiology*, v. 51(7), p.1151–1162, 2010.

Código de campo alterado

- [9] FAO – Food and agriculture organization of the United Nations. Crop Prospects and Food Situation, v.3, p.1-35, 2011.
- [10] FOYER, C. H.; Descourvières P.; Kunert, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environment*, v.17, p.507 – 523, 1994.
- [11] FOYER, C.H.; Noctor, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, v.17 (7), p.1866-1875, 2005.
- [12] FRY, S. C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, v. 332, p.507-515, 1998.
- [13] GALE, M.D.; Devos, K.M. Plant Comparative Genetics after 10 Years. *Science*, v.282, p.656-659, 1998.
- [14] GEÇHEV, T. S.; Van Breusegem, F.; Stone, J. M.; Denev, I.; Laloi, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioAssays*, v.28, p.1091-1101, 2006.
- [15] 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.
- [16] HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v.141, p.312-322, 2006.
- [17] HALLIWELL, B; Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007.
- [18] IQBAL, A.; Yabuta Y.; Takeda, T.; Nakano, Y.; Shigeoka, S. Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS Journal*, v.273, p.5589-5597, 2006.
- [19] KAMATA, H.; Hirata, H. Redox Regulation of Cellular Signaling. *Cellular Signaling*, v.11(1), p.1-14, 1998.

Código de campo alterado

Código de campo alterado









- [20] KERHER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, v.149, p.43-50, 2000.
- [21] MACH, J.M.; Greenberg, J.T. Free Radicals and Oxidative Stress. In: Noodén, L.D. (Ed). *Plant Cell Death Processes*. Elsevier, 2003, p.203-214.
- [22] MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, v.7 (9), p.405-410, 2002.
- [23] MØLLER, I.M.; Jensen, P.E.; Hansson, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, v.58, p.459-481, 2007.
- [24] MØLLER, I.M.; Kristensen, B. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.8, p. 730-735, 2004.
- [25] MULLINEAUX, P.M.; Karpinski S.; Jimenez, A.; Cleary S.P.; Robinson, C.; Creissen, G.P. Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant Journal*, v.13, p.375–379, 1998.
- [26] NAVROT, N.; Collin, V.; Gualberto, J.; Gelhaye, E.; Hirasawa, M.; Rey, P.; Knaff, D.B.; E., Issakidis; J.P., Jacquot; N., Rouhier. *Plant Physiology*, v.142(2), p.1364-1379, 2006.
- [27] Knaff, D.B.; Issakidis, E.; Jacquot, J.P.; and Rouhier, N. Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology*, v.142, p. 1364–1379, 2006.
- [28] NORDBERG, J.; Arnér, E.S.J.; Reactive Oxygen Species, Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine*, v.11, p. 1287-1312, 2001.
- [29] PAREEK, A.; Sopory, S.K.; Bohnert, H.J.; Govindjee. *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. 1^a ed. Springer, 2010.

- [30]PASSARDI, F.; Theiler, G.; Zamocky, M.; Cosio, C.; Rouhier, N.; Teixeira, F.; Margis-Pinheiro, M.; Ioannidis, V.; Penel, C.; Falquet, L.; Dunand, C. PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1605–1611, 2007.
- [31]POSPÍŠIL, P.; Arato, A.; Krieger-Liszkay, A.; Rutherford, A.W. Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry*, v. 43, p. 6783-6792, 2004.
- [32]RODRIGUEZ-MILLA, M.A.; Maurer, R.; Huete, A.R.; Gustafson, P. Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stress through diverse signalling pathways. *The Plant Journal*, v. 36, p.602-615, 2003.
- [33]ROUHIER, N. & Jacquot, J. P. The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 38, p. 1413-1421, 2005.
- [34]SASAKI, T. The map-based sequence of the Rice genome. *Nature*, v. 436, p.793-800, 2005.
- [35]SCHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. E. Shacter, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, v.32, p.307–326, 2000.
- [36]SHIMAMOTO, K.; Kyojuka, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 399-419, 2002.
- [37]SCHOPFER, P. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, v.28(6), p. 679-688, 2001.
- [38]SCHOPFER, P. Liszkay, A.; Bechtold, M.; Frahry, G.; Wagner, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, v.214, p. 821-828, 2002.
- [39]SCHWEITZER, C. & Schmidt, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews*, v. 103, p. 1685–1757, 2003.

- [40] URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K.D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHÉ, L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology*, v.252, p.38–53, 1995.
- [41] WISEMAN, H. HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, v.313, p.17-29, 1996
- [42] XU, G.; CHANCE, M. Radiolytic Modification and Reactivity of Amino Acid Residues Serving as Structural Probes for Protein Footprinting. *Analytical Chemistry*, v.77 (14), p. 4549-4555, 2005.
- [43] XU, S.; LI, J.; ZHANG, X.; WEI, H.; CUI, L. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turf grass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*, v.56, p. 274-285, 2006.

8. Anexo

8.1. Figura 1 – Estádios onde a coleta de amostras foi realizada (fases R2 a R9)

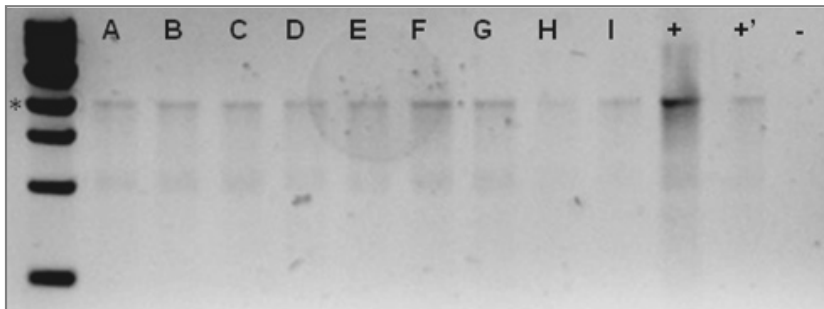
 <p style="text-align: center;">R2</p> <p style="text-align: center;">Panícula interna Formação do colar na folha bandeira</p>	 <p style="text-align: center;">R3</p> <p style="text-align: center;">Externalização da panícula</p>
 <p style="text-align: center;">R4</p> <p style="text-align: center;">Antese em uma ou mais flores da panícula</p>	 <p style="text-align: center;">R5</p> <p style="text-align: center;">Início da expansão da cariópse</p>
 <p style="text-align: center;">R6</p> <p style="text-align: center;">Pelo menos uma cariopse expandida</p>	 <p style="text-align: center;">R7</p> <p style="text-align: center;">Secamento do grão</p>
 <p style="text-align: center;">R8</p> <p style="text-align: center;">Casca amarela Maturidade do grão</p>	 <p style="text-align: center;">R9</p> <p style="text-align: center;">Casca marrom Maturidade completa da panícula</p>

Adaptado de Counce *et al.*, 2000.

9. Apêndice

A. Confirmação da clonagem do promotor de *OsGpx3* em pHGWFS7

Figura 1 - PCR com o primer específico para o promotor de *OsGpx3* (*pGpx3*)



Legenda:

* Banda 2kb (1kb DNA Ladder Biolabs)

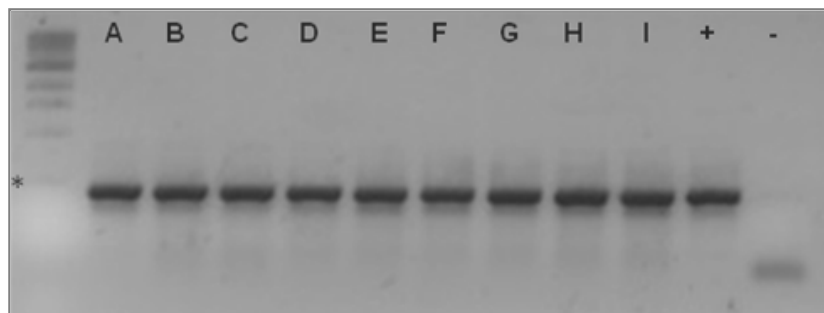
As letras A até I correspondem aos clones testados

+ Corresponde ao controle positivo (DNA WT)

+' Corresponde ao controle positivo (*pGpx3* clonado em pENTR)

- Corresponde ao Controle negativo

Figura 2 - PCR com o primer específico para o gene Higromicina fosfotransferase (*Hpt*)



Legenda:

* Banda 500kb (1kb DNA Ladder Biolabs)

As letras A até I correspondem aos clones testados

+ Corresponde ao Controle positivo, o vetor pHGWFS7 vazio

- Corresponde ao Controle negativo

B. Alinhamento entre a sequência obtida do fragmento clonado e a sequência do promotor de *Gpx3*.

Score = 1094 bits (592), Expect = 0.0
 Identities = 654/684 (96%), Gaps = 3/684 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1282 TGAGGTGGGCATCCAAACAGCCCTATATGCACCCGATGGCTCGAAAGGGaaaaaggaaa 1341
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 716 TGAGG-GGGCATCCAAACAGCCCTATATGCACAAGA-AGCTCGAAAGGGAAAAAGGAAA 659

Query 1342 aaaTCCTGCCGATACAAGGAAAAGAAGAATGTCAGCACTTTTTTAGATAATGaaaaaaaa 1401
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 658 AAAATCCTGCCGATACAAGGAAAAGAAGAATGTCAGC-CCTTTTTAGATAATGAAAAAAAA 600

Query 1402 aGAGAATATCAGCACTTATTAGGCGAGCAATAGAATTGCGCGCGTAAACAGTGACGTGAA 1461
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 599 AGAGAATATCAGCACTGATTAGGCGAGCAATAGAATTGCGCGCGTAAACAGTGACGTGAA 540

Query 1462 TCGGCCTGAAAGCCACGGTACGTGCGGCCGGCGTTCGCGTTCGCTGACGACAATGAGA 1521
          || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 539 TCCACCTGAAAGCCACGGTACGTGCGGCCGGCGTTCGCGTTCGCTGATGACAATGAGA 480

Query 1522 ATAGACGCTTCTAGAACATACAGAACAACTTCTTTTCGCTGCTCGTGATGTTCCGTTCA 1581
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 479 ATAGACGCTTCTAGAACATACAGAACAACTTCTTTTCGCTGCTCGTGATGTTCCGTTCA 420

Query 1582 CATTTCACAGCCGTTTATTAGAGAGAGATCACGAAAACTCCCCAAAAATGGCGTGGGCT 1641
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 419 CATTTCACAGCCGTTTATTAGAGAGAGATCACGAAAACTCCCCAAAAATGGCGTGGGCT 360

Query 1642 ACGACTACGAGGCTAAGATACCAGGGTTTATCCTTCTCCTCGTTGTATCTGCTTGACCG 1701
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 359 ACGACTACGAGGTTAAGATACCAGGGAAAATCATTATCCTCGTCGTATATGCTTGACCG 300

Query 1702 ATATCAGTCAGAAAAAAAAAAGAAAGAAAGTTTGCCTAAACGTGTTTTTCAATTTTCA 1761
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 299 ATATCAGTCAGAAAAAAAAAAGAAAGAAAGTTTGCCTAAACGTGTTTTTCAATTTTCA 240

Query 1762 GTACTCTACGTACTCCGTACAGTTGGATGCCGATCGGACGGCGGAGTGCAGCTCGTTGA 1821
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 239 GTACTCTTACGTACTCGGTACAGTTGGATGCCGATCGGACGGCGGAGTGCAGCTCGTTGA 180

Query 1822 CCCAGCCGATTTTCGTTACACGTTGGCGGCGCGGACGCGGGACGTGGCGGGGAAGCC 1881
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 179 GCCAGCCGATTTTCGCTCCCACGTGGCGGCGCGGACGCGGGACGTGGCGGGGAAGCC 120

Query 1882 CCCACCACCACTGGGCCAACGCCGAGGGCAACGCGTCCACACTTCGCGCGCATCGC 1941
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 119 CCCGCCACCACTGGGCCAACGCCGAGGGCAACGCGTCCACACTTCGACGGGCATCGC 60

Query 1942 TTTACAGGCAACCTCAACCAACA 1965
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 59 TTTACAGGCAACCTCAACCAACA 36
  
```

C. Oligonucleotídeos iniciadores

efla (RT-qPCR)

F: 5' TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT
R: 5' GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA

FDH (RT-qPCR)

F: 5' CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC
R: 5' TTCCAATGCATTCAAAGCTG

Ubi (RT-qPCR)

F: 5' ACCACTTCGACCGCCACTACT
R: 5' ACGCCTAAGCCTGCTGGTT

Gpx1 (RT-qPCR)

F: 5' AGCAACCTGCACTTATGCACT
R: 5' CAGCAAAATTTATTGACATGA

Gpx2 (RT-qPCR)

F: 5' CTGGTTGGGTAGGCACTGTT
R: 5' TGCAAACACAAACCTTAGGCTAC

Gpx3 (RT-qPCR)

F: 5' TTGCATTGAGCACTTGGAAC
R: 5' AGGGGCAAAGTGATGCAGTA

Gpx4 (RT-qPCR)

F: 5' CTGTACATATGCCTTGCCCTCA
R: 5' GTTACAGGGGCCAGATAAGC

Gpx5 (RT-qPCR)

F: 5' AAGATTGAGAATGATATCCAGAAGC
R: 5' GCAAACCACATTCTTACGAAC

pGpx3 (Promotor)

F: 5' CACCTAAGGTGGTTTGGACATCGTT
R: 5' TCGCGCTTTATAGCGGTAAG