

M. Schünemann<sup>1,2,3</sup>, C. M. B. Andrade<sup>1,2,3</sup>, R. A. Arenhart<sup>1</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>

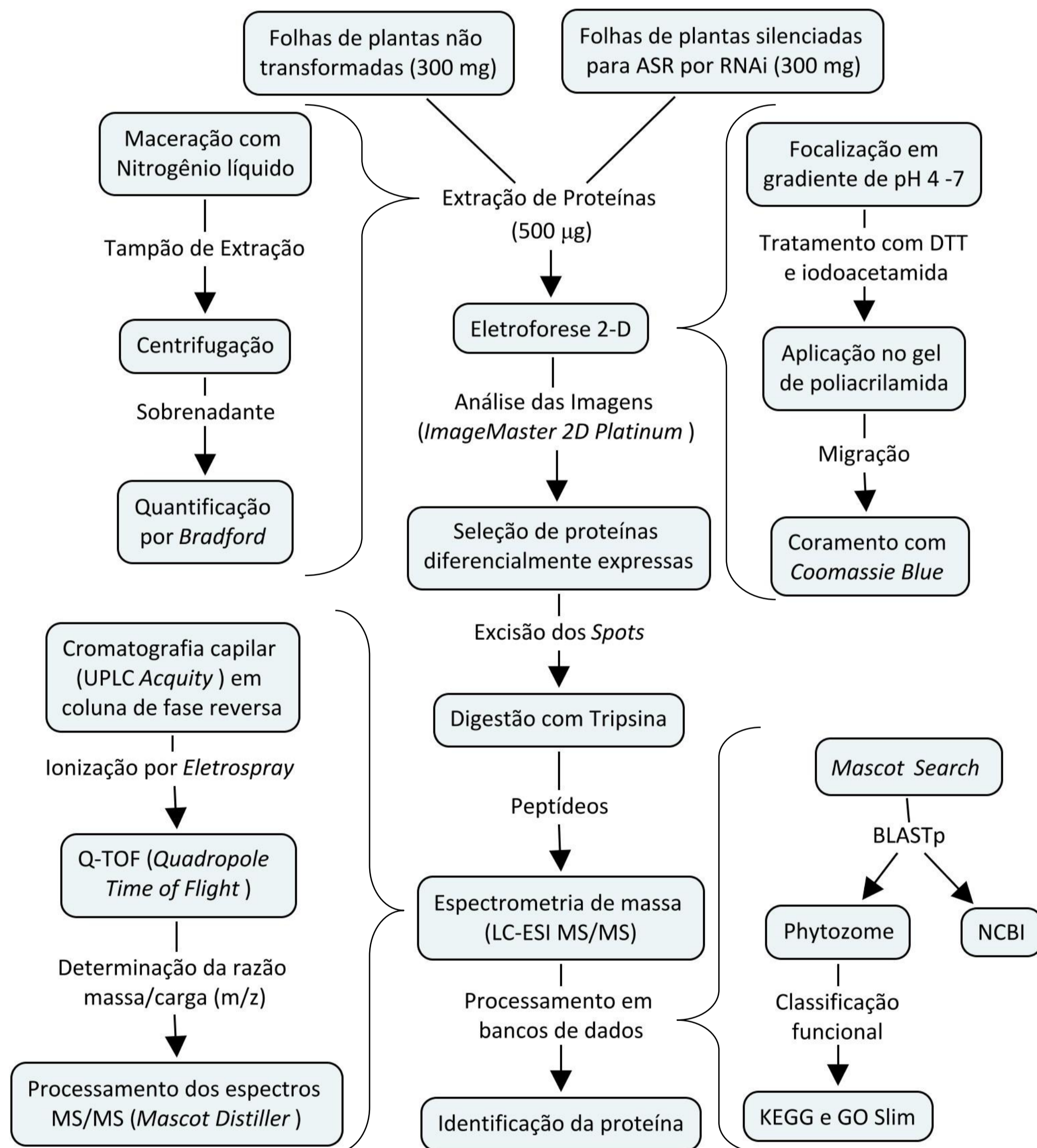
<sup>1</sup>Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, Departamento de Genética (UFRGS). <sup>2</sup>Laboratório de Genomas e Populações de Plantas e <sup>3</sup>Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massa, Centro de Biotecnologia (UFRGS). <sup>4</sup>Laboratório de Metabolismo do Estresse em Plantas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC).

## Introdução e Objetivo

Um dos obstáculos para a manutenção e estabilidade da produção nacional de arroz (*Oryza sativa*) reside na susceptibilidade dos genótipos existentes a estresses abióticos, que podem reduzir a produtividade da colheita de grãos em até 50% [1, 2]. Os genes ASR (*ABA, Stress and Ripening*) são induzidos por estresse e ácido abscísico (ABA) em plantas, e seus níveis de expressão são rapidamente aumentados em resposta à salinidade, seca e ao tratamento com alumínio [3, 5]. Essa família gênica é composta por 6 membros (*OsASR1* a *OsASR6*), sendo todos eles responsivos ao alumínio em plantas de arroz da subespécie *Japonica* [4]. Para realizar uma análise funcional dos genes ASR, uma linhagem transgênica silenciada por RNA de interferência (*RNAi*) para todos os membros da família foi obtida com plantas de arroz da subespécie *Japonica* cultivar Nippombare (considerada tolerante ao alumínio) [5]. As plantas silenciadas para os genes ASR apresentaram fenótipo alterado com relação ao desenvolvimento floral e forte susceptibilidade ao tratamento com excesso de alumínio.

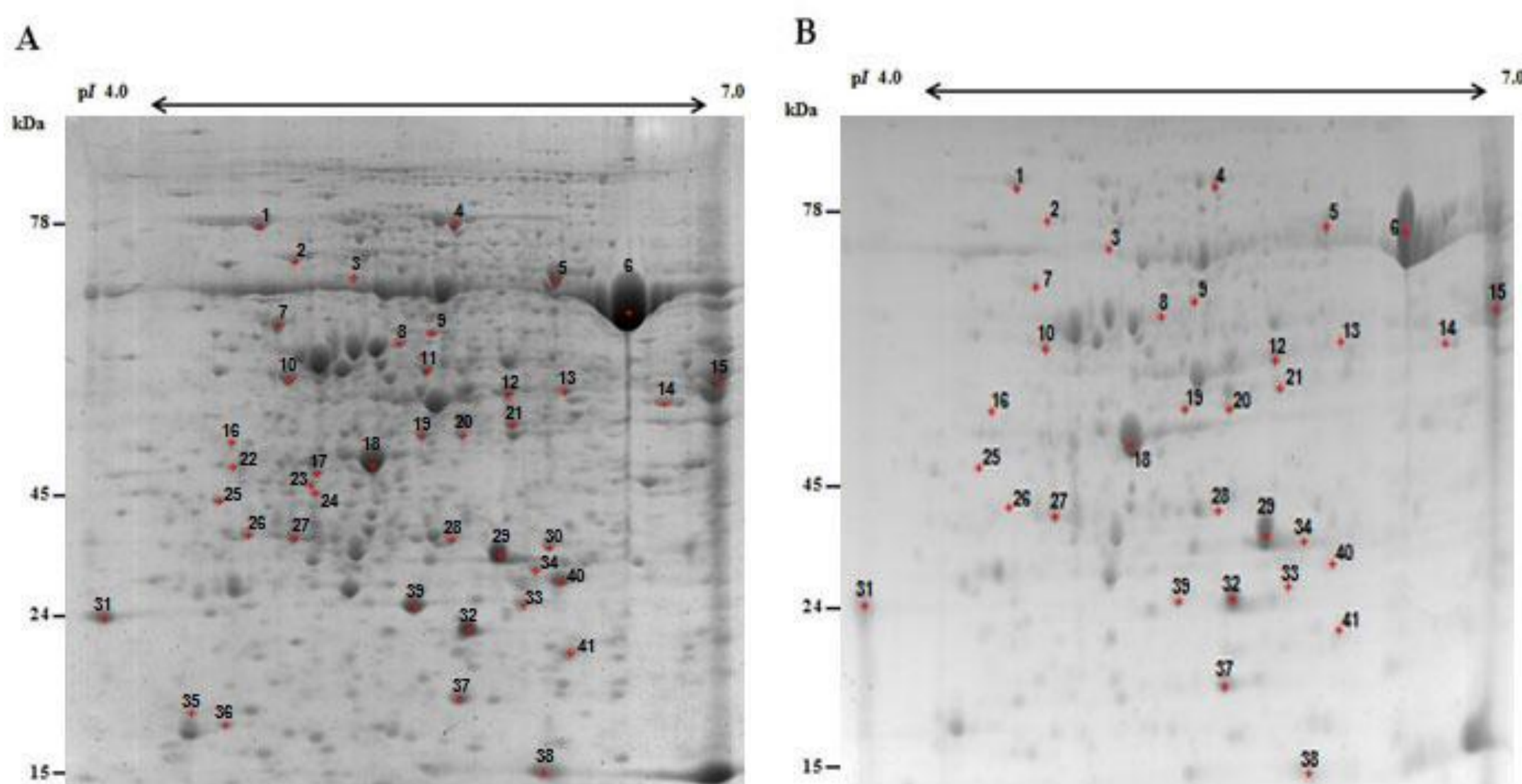
O objetivo deste estudo foi realizar uma abordagem proteômica para comparar o perfil de expressão proteico de plantas de arroz não transformadas e silenciadas, a fim de contribuir para o entendimento da função das ASR na resposta da planta ao alumínio.

## Métodos



## Resultados

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

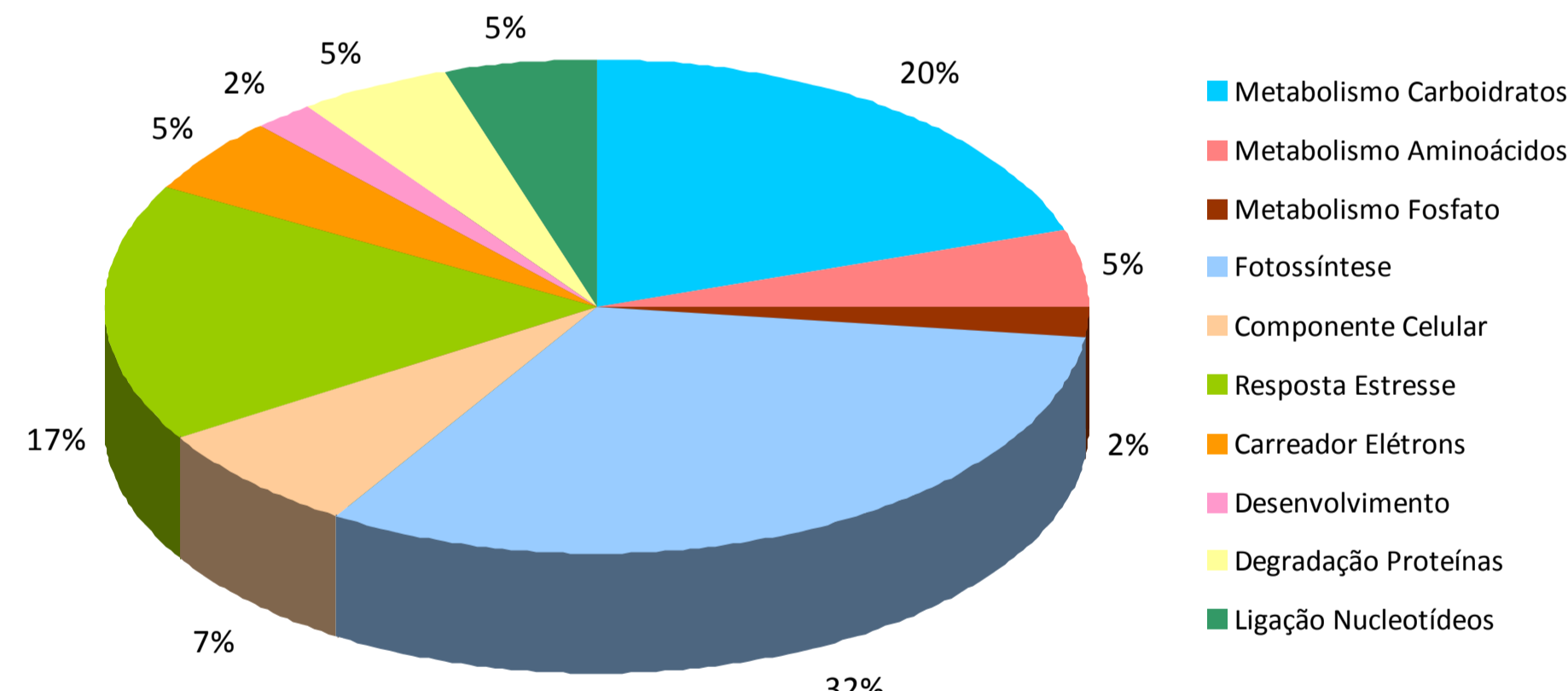


**Tabela 1:** Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de arroz (não transformadas e silenciadas para os genes ASR) identificadas por espectrometria de massa (LC-ESI MS/MS).

Nº Spot <sup>a</sup>	Δ Expressão <sup>b</sup>	Nome da Proteína	Teórico		Observado		Score <sup>c</sup>	S. P. (%) <sup>d</sup>	Nº Acesso (NCBI) <sup>e</sup>
			pI	P. M. (kDa)	pI	P. M. (kDa)			
<b>Degradação de Proteínas</b>									
1	↓	Heat shock protein 70 (hypothetical protein OsJ_17967)	5,12	74	4,77	78	962	36	gi 222631026
2	↓	Mitochondrial chaperonin (Os12g0277500)	5,12	61	4,93	73	699	43	gi 115488160
<b>Fotossíntese</b>									
3	↑	ATP synthase alpha/beta chain, C terminal domain (Os01g0711000)	5,03	54	5,21	70	231	28	gi 115439527
5	↓	ATP synthase CF1 alpha subunit	5,95	56	6,17	70	1234	54	gi 11466784
6	↓	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	6,22	53	6,51	66	935	40	gi 11466795
13	↓	ATP synthase gamma chain (Os07g0513000)	8,6	40	6,21	56	405	34	gi 115472339
18	↑	Putative oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (Os01g0501800)	6,1	35	5,30	48	1286	61	gi 115436780
21	↓	Putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	7,98	41	5,96	52	359	36	gi 141052915
27	↑	Chlorophyll A-B binding protein	4,73	24	4,93	37	529	60	gi 108864186
29	↑	Chloroplast 23 kDa polypeptide of photosystem II	5,56	20	5,90	34	900	67	gi 1164375543
32	↑	Putative photosystem I reaction center subunit IV	9,64	16	5,75	23	430	61	gi 134394725
36	↓	Putative ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (Os05g0427800)	4,88	16	4,61	18	56	13	gi 115464019
38	↓	Ribulose biphosphate carboxylase, small chain	5,89	15	6,11	15	551	88	gi 15696763
39	↓	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	7	26	5,50	25	314	36	gi 290585768
40	↓	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	7	26	6,19	29	245	30	gi 290585768
<b>Metabolismo de Carboidratos</b>									
4	↓	Putative transketolase	6,12	81	5,69	78	693	29	gi 28190676
10	↓	Sedoheptulose-1,7-biphosphatase precursor	5,83	43	4,90	57	662	40	gi 27804768
12	↑	Lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain (Os10g0478200)	5,75	36	5,94	56	388	49	gi 115482534
14	↓	Lactate/malate dehydrogenase, alpha/beta C-terminal domain (Os05g0574400)	8,22	36	6,68	55	612	70	gi 115465579
15	↓	Glycolate oxidase (Os03g0786100)	8,48	40	6,93	57	529	44	gi 115455773
16	↓	Putative uridylyltransferase-related	5,72	30	4,63	51	200	34	gi 187608845
26	↓	Putative ribose-5-phosphate isomerase	4,91	27	4,71	38	266	45	gi 34393836
30	↓	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	8,93	29	6,14	35	209	20	gi 14105561
<b>Ligação a Nucleotídeos</b>									
7	↓	RuBisCO activase small isoform precursor	5,59	52	4,86	64	675	61	gi 62733297
9	↓	Chloroplast translational elongation factor Tu	5,68	56	5,58	63	879	49	gi 218191089
<b>Componente Celular</b>									
8	↑	Actin (Os11g0163100)	5,31	42	5,43	60	167	27	gi 115484337
22	↓	Fibrillin-like protein	5,04	34	4,64	48	155	22	gi 29367475
24	↓	PAP fibrillin family domain containing protein (Os11g0595200)	8,92	28	5,03	46	141	14	gi 115486133
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>									
11	↓	Glutamine synthetase, catalytic domain (Os02g0735200)	5,51	39	5,56	58	198	19	gi 115448531
35	↓	Putative glycine cleavage system H protein (Os10g0516100)	4,92	17	4,45	18	162	28	gi 115482934
<b>Metabolismo de Fosfato</b>									
17	↓	Putative inorganic pyrophosphatase	5,8	32	5,04	48	121	16	gi 46805452
<b>Resposta ao Estresse</b>									
19	↓	Glyoxalase (hypothetical protein OsJ_26316)	5,53	35	5,53	51	330	41	gi 125602450
20	↑	Class III peroxidase (OsPrx111)	5,77	33	5,73	51	461	44	gi 20286
23	↓	Chloroplastic lipocalin (Os04g0626400)	6,23	38	5,01	47	65	11	gi 115460690
28	↓	Cytosolic Ascorbate Peroxidase - OsAPx1 (Os03g0285700)	5,42	27	5,67	37	381	54	gi 115452337
34	↑	Manganese superoxide dismutase	6,5	25	6,07	31	425	56	gi 601869
37	↑	Putative superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplast precursor	5,79	21	5,71	19	617	68	gi 42408425
41	↑	Putative superoxide dismutase 1	6,24	28	6,23	22	139	36	gi 108708142
<b>Carreador de Elétrons</b>									
25	↓	Oxidoreductase NAD-binding domain (Os02g0328300)	5,44	31	4,58	45	364	48	gi 115445869
31	↑	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain (anti-disease protein 1)	4,37	15	4,04	24	191	57	gi 18698985
<b>Desenvolvimento</b>									
33	↓	Germin-like protein 1	6,01	22	6,01	26	185	15	gi 4239821

<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 ASR. <sup>c</sup> Score do Mascot. <sup>d</sup> Porcentagem de sequenciamento da proteína. <sup>e</sup> Número de acesso do banco de dados do NCBI

**Figura 2:** Classificação funcional de 41 proteínas de folha de arroz (*Oryza sativa*). As proteínas identificadas foram classificadas por função de acordo com GO Slim (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) e KEGG pathways (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)



## Conclusões

Um total de 41 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas em função do silenciamento dos genes ASR, sendo que 12 tiveram sua expressão aumentada e 29 tiveram sua expressão reduzida. Destas proteínas com expressão diferencial, 32% estão envolvidas no processo de fotossíntese, 20% no metabolismo de carboidratos e 17% na resposta ao estresse. As demais proteínas estão funcionalmente associadas com metabolismo de aminoácidos, metabolismo do fosfato, desenvolvimento, degradação de proteínas, ligação a nucleotídeos, composição celular e transporte de elétrons.

Considerando-se o grande número de proteínas que tiveram a expressão alterada após o silenciamento das ASR, juntamente com estudos recentes que demonstram a capacidade das proteínas ASR de se ligarem ao DNA [6, 7, 8], pode-se sugerir que as mesmas atuem como fatores de transcrição, regulando a expressão de muitas proteínas relacionadas a resposta ao estresse da planta, entre outros processos (fotossíntese, metabolismo, etc.).

A identificação e a caracterização de proteínas relacionadas aos mecanismos de resistência das plantas a estresses abióticos, especialmente o estresse provocado pelo excesso de alumínio, poderão prover informações moleculares para o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas.

## Referências

- [1] *Science* (1982) 218: 443–448.
- [2] *American Society of Plant Physiologists* (2000) 1158–1249.
- [3] *Plant Mol Biology* (2003) 52: 873–891.
- [4] *Gene* (2006) 378: 74–83.
- [5] Dissertação de Mestrado (2008) <http://hdl.handle.net/10183/15471>
- [6] *Biochemical Journal* (2004) 381: 373–378.
- [7] *Physiology of Plants* (2005) 123: 314–320.
- [8] *Plant Physiology* (2005) 139: 836–846.