

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel



Tese

**Bases moleculares da resposta a estresses ambientais
em vegetais: arroz, tomate e pêssego**

Camila Pegoraro

Pelotas, 2012

Camila Pegoraro

**Bases moleculares da resposta a estresses ambientais em
vegetais: arroz, tomate e pêssego**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Dr. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI

Co-orientadores: Dr. Cesar Valmor Rombaldi – FAEM/UFPeI

Dr. Luciano Carlos da Maia – FAEM/UFPeI

Dr. Livio Trainotti – UNIPD

Pelotas, 2012.

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

P376b Pegoraro, Camila

Bases moleculares da resposta a estresses ambientais em
vêgetais: arroz, tomate e pêssego / Camila Pegoraro;
orientador Antonio Costa de Oliveira; co-orientadores Cesar
Valmor Rombaldi, Luciano Carlos da Maia e Livio Trainotti -
Pelotas, 2012. 229f.: il.- Tese (Doutorado) –Programa de
Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas,
2012.

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI (presidente)

Dr. Cesar Valmor Rombaldi – FAEM/UFPeI

Dra. Roberta Manica Berto – FAEM/UFPeI

Dr. Sandro Bonow – EMBRAPA Clima Temperado

Dra. Vera Maria Quecini – EMBRAPA Uva e Vinho

Agradecimentos

A Deus pela vida, força e proteção em todas os momentos.

A toda minha família, principalmente meus pais Isaias e Iraci e meu irmão Cassiano pelo amor, incentivo e apoio.

Ao meu noivo Marcos pelo amor, paciência e compreensão.

Aos meus orientadores professores Antonio, Cesar e Luciano pela transmissão de conhecimentos, incentivo, apoio, ajuda, compreensão, amizade e confiança.

Aos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento Adriana, Daisy, Daniel, Daniela, Diego, Elisane, Francieli, Frederico, Gabriela, Glacy, Henrique, Leomar, Letícia, Mateus, Monalise, Naciele, Rafael, Renata, Rodrigo, Sidney, Solange, Vivian, Viviane, Taciane, Taiane, Tatiane, em especial aos colegas Mariana e Railson pela amizade, convivência e troca de experiências.

Aos estagiários do Centro de Genômica e Fitomelhoramento Bianca, Carolina, Cristiano, Daiana, Eder, Ederson, Fabiane, Fernando (*In Memoriam*), Helaine, Michel, Pagiel, Raissa, Ricardo, Rodrigo e Victoria, pela amizade e convivência.

Aos colegas do *Laboratorio di Biologia Molecolare* Alessandro, Alice, Anna, Nicola, Margueritta, Rahim e Rossela, pela receptividade, amizade, apoio e ajuda.

Aos colegas Alice, Aline, Daniel, Liliane, Mariana, Railson, Roberta e Taciane pelo auxílio na realização das atividades.

A todos meus amigos pelo apoio e incentivo.

À professora da UFRGS Marcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis pela ajuda no trabalho de transformação genética.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/FAEM-UFPel pela oportunidade de realização do curso de doutorado, e a *Università degli Studi di Padova* pela possibilidade de doutorado sanduíche.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de doutorado e ao CNPq pelo financiamento da bolsa de doutorado sanduíche.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

PEGORARO, Camila. **Bases moleculares da resposta a estresses ambientais em vegetais: arroz, tomate e pêssego**. 2012. 226p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Estresses ambientais representam grandes ameaças à agricultura e, por consequência, à segurança alimentar, uma vez que limitam a produtividade da maioria das plantas cultivadas. Buscando identificar as respostas das plantas frente a estresses abióticos e suas relações com a tolerância sob diferentes condições ambientais, conceitos e técnicas de biologia molecular, biologia celular e genética vêm sendo continuamente utilizadas. A identificação de genes responsivos a estresses pode ser utilizada na obtenção de plantas tolerantes a condições ambientais adversas através de manipulação genética ou cruzamentos direcionados entre diferentes genótipos. Desta forma, este estudo teve como objetivo estabelecer o perfil de expressão de genes pertencentes às famílias *ERF*, *HSP*, *HSF*, *TIM/TOM* e *TIC/TOC*, em arroz e tomate sob condições de estresse por deficiência de O₂. Além disso, buscou-se estabelecer o perfil transcricional de pêssegos sob condição de estresse por frio. Os resultados obtidos demonstram que em arroz, alguns membros da família *ERF* apresentam expressão específica de acordo com o agente estressor, enquanto que outros apresentam sobreposição de expressão entre os estresses, além disso, dentro da família *ERF* alguns genes apresentam regulação complexa e outros regulação simples. Em arroz, alguns genes codificadores de proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC apresentaram altos níveis de expressão 24 horas após estresse por anoxia. Entretanto, após 72 horas sob condições de anoxia, ocorreu a inibição da expressão da maioria dos genes pertencentes a estes complexos, sugerindo que possa haver uma interrupção no transporte de proteínas para a mitocôndria e cloroplasto durante este período de estresse. Ao comparar cultivares de arroz tolerante e sensível ao alagamento, verificou-se que houve um acúmulo de transcritos dos genes codificadores de HSPs em ambas as cultivares. Entretanto, a maioria dos genes avaliados foi mais responsiva ao estresse por anoxia na cultivar sensível, do que na cultivar tolerante, sugerindo que genes *HSPs* têm relação importante na resposta ao estresse por anoxia, mas não estão diretamente envolvidos na tolerância. Em frutos de tomate armazenados sob hipoxia dois genes codificadores de sHSPs foram altamente

induzidos por baixos níveis de oxigênio, indicando uma ação primária destes genes na manutenção da homeostase celular após este estresse. Em pêssegos, a aplicação de ácido giberélico atua na prevenção de danos ocasionados pelo frio através da indução de genes associados ao metabolismo de lipídios, à degradação da parede celular e à síntese de trealose.

Palavras-chave: expressão gênica, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Prunus persica*, estresses abióticos.

Abstract

PEGORARO, Camila. **Molecular basis of response to environmental stresses in plants: rice, tomato and peach**. 2012. 226p. Thesis (Doctoral degree) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Abiotic stresses represent large threats to agriculture and food security, since they limit the productivity of the majority of cultivated plants. In order to identify the responses of plants to abiotic stresses and their associations with tolerance under different environmental conditions, concepts and techniques in molecular biology, cell biology and genetics have been used. The identification of genes responsive to stresses can be used to obtain plants tolerant to adverse environmental conditions by genetic transformation or directed crosses. Thus, this study had the objective the establishing of expression profiles of gene belonging to the *ERF*, *HSP*, *HSF*, *TIM/TOM* and *TIC/TOC* families in rice and tomato under low O₂ stress. Also, the transcriptional profile of peaches under cold stress as obtained. The results indicate that in rice, some members of the *ERF* family present specific expression according to the stressing agent, while others have overlapping expression among different stresses. Besides, within the *ERF* family, some genes do present a complex regulation and others a simple regulation. In rice, some genes encode proteins belonging to the TIM/TOM and TIC/TOC complexes present high expression levels 24 hours after anoxia stress. However, after 72 hours under anoxia, the majority of genes were inhibited, suggesting an interruption on the transport of proteins to the mitochondria and chloroplast during the stress period. When the *HSP* expression profiles of flooding tolerant and sensitive rice cultivars were compared, transcript accumulation occurred for both cultivar types. However, the majority of genes evaluated were more responsive in the sensitive cultivar than in the tolerant, indicating that *HSPs* have an important association in the response to anoxia stress but are not directly involved in the tolerance. In tomato fruits stored under hypoxia, two *sHSPs* genes were highly induced by low oxygen levels, indicating a primary action of these genes on keeping cell homeostasis after the stress. In peaches, the application of gibberellic acid acts on preventing the damaged caused by cold by the induction of genes associated to lipid metabolism, cell wall degradation and trehalose synthesis.

Keywords: gene expression, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Prunus persica*, abiotic stress.

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO II – Regulação e perfil de expressão de genes *ERFs* em condições de estresse

- Figura 1 Perfil de expressão de genes *ERFs* em plantas de arroz submetidas a diferentes estresses. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. A: grupo 1; B: grupo 271
- Figura 2 Especificidade de expressão para genes induzidos (A) e reprimidos (B). Os diagramas foram gerados utilizando-se o programa *Venny*72
- Figura 3 Acúmulo de transcritos de genes *ERFs* em arroz da cultivar Nipponbare em diferentes condições de estresses (abióticos - sal e anoxia, e biótico - *Magnaporthe grisea*).....80
- Figura 4 Dendograma construído a partir das sequências de aminoácidos das proteínas *ERFs* em arroz. Os números nos nós correspondem ao valor de *bootstrap*.....82

4. CAPÍTULO III - Acúmulo de transcritos dos genes codificadores de subunidades dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em plantas de arroz sob estresse por anoxia

- Figura 1 Perfil de expressão digital dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TIC, baseado em dados de *microarray*, em coleótilos de arroz cv. Nipponbare em diferentes estresses abióticos. A expressão é apresentada como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. O gene da *UBIQUITINA* foi utilizado como controle. *TIM*: translocase de membrana interna da mitocôndria; *TOM*:

translocase de membrana externa da mitocôndria; *TIC*: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; *TOC*: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto..... 96

Figura 2 Acúmulo de mRNA dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em folhas arroz cv. Nipponbare submetidas ao estresse por anoxia. O acúmulo de transcritos é representado em diferentes escalas usando o programa *Multi Experiment Viewer (TIGR MeV)*. O acúmulo de mRNAs de cada gene nos controles 24 e 72 horas foram utilizados como calibradores para determinar a acúmulo de mRNA sob estresse por anoxia. *TIM*: translocase de membrana interna da mitocôndria; *TOM*: translocase de membrana externa da mitocôndria; *TIC*: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; *TOC*: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto..... 97

Figura 3 Perfil de expressão digital dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TIC, baseado em dados de *microarray*, em arroz em diferentes órgãos da planta. A expressão é apresentada como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. *TIM*: translocase de membrana interna da mitocôndria; *TOM*: translocase de membrana externa da mitocôndria; *TIC*: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; *TOC*: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto. *Seedling*: plântula; *Coleoptile*: coleóptilo; *Inflorescence*: inflorescência; *Panicle*: panícula; *Spikelet*: espiguetas; *Rachilla*: ráquis, *Floret*: flor; *Stamen*: estame; *Anther*: antera; *Pistil*: pistilo; *Stigma*: estigma; *Ovary*: ovário; *Seed*: semente; *Embryo*: embrião; *Shoot*: broto; *Culm*: colmo; *Leaf*: folha; *Crow*: coroa; *Rhizome*: rizoma; *Roots*: raízes; *Root tip*: ponta da raiz..... 100

Figura 4 Perfil de expressão digital dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TIC, baseado em dados de *microarray*, em arroz durante diferentes estádios de desenvolvimento. A expressão é

apresentada como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. *TIM*: translocase de membrana interna da mitocôndria; *TOM*: translocase de membrana externa da mitocôndria; *TIC*: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; *TOC*: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto. *Germination*: germinação; *Seedling*: plântula; *Heading stage*: espigamento; *Flowering stage*: florescimento; *Milk stage*: grão leitoso; *Dough stage*: formação final do grão..... 101

5. CAPÍTULO IV - Perfil de expressão de genes *HSPs* em arroz sob condições de estresse por anoxia

Figura 1 Acúmulo de transcritos do gene *ADH* (*Álcool desidrogenase*) em raízes de plântulas de arroz das cultivares Nipponbare e IPSL 2070, sob condições de anoxia por diferentes períodos (0, 24, 48 e 72 horas)..... 112

Figura 2 Acúmulo de transcritos de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) em raízes de plântulas de arroz das cultivares IPSL 2070 (A) e Nipponbare (B) submetidas ao estresse por anoxia. Os níveis de transcritos foram representados em uma escala de 0-50, usando o programa *Multi Experiment Viewer (TIGR MeV)*. O controle (0h) serviu como calibrador para determinar os níveis de expressão relativa em cada período de estresse analisado..... 112

Figura 3 Perfil de expressão de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) baseado em dados de *microarray*, em plantas de arroz da cultivar Nipponbare sob estresse por anoxia. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, obtido através do programa *Genevestigator*..... 115

Figura 4 Perfil de expressão de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) baseado em dados de *microarray*, em diferentes estádios de desenvolvimento de

plantas de arroz. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, obtido através do programa *Genevestigator*. A expressão do gene da *UBIQUITINA* foi utilizada como controle. *Germination*: germinação; *Seedling*: plântula; *Heading stage*: espigamento; *Flowering stage*: florescimento; *Milk stage*: grão leitoso; *Dough stage*: formação final do grão..... 116

Figura 5 Perfil de expressão de genes *HSPs* baseado em dados de *microarray*, em diferentes órgãos de plantas de arroz. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, obtido através do programa *Genevestigator*. *Seedling*: plântula; *Coleoptile*: coleóptilo; *Inflorescence*: inflorescência; *Panicle*: panícula; *Spikelet*: espiguetas; *Rachilla*: ráquis, *Floret*: flor; *Stamen*: estame; *Anther*: antera; *Pistil*: pistilo; *Stigma*: estigma; *Ovary*: ovário; *Seed*: semente; *Embryo*: embrião; *Shoot*: broto; *Culm*: colmo; *Leaf*: folha; *Crow*: coroa; *Rhizome*: rizoma; *Roots*: raízes; *Root tip*: ponta da raiz..... 117

Figura 6 Motivos de sHSPs (*Small heat shock proteins*) identificados em arroz baseado na sequência de proteínas, obtidos a partir de análises no programa *Meme*. Os motivos foram plotados de acordo com a posição dentro da sequência. 118

6. CAPÍTULO V - Efeito do armazenamento em hipoxia sobre o acúmulo de transcritos de genes *HSPs* durante o amadurecimento de frutos de tomate

Figura 1 Coloração do epicarpo em frutos de tomate em condições de normoxia e hipoxia. **A**: Colheita/Normoxia (N), **B**: Normoxia + 1 dia (N-1d), **C**: Normoxia + 3 dias (N-3d), **D**: Normoxia + 5 dias (N-5d), **E**: Hipoxia durante 3 dias (H), **F**: Após Hipoxia + 1 dia (H-1d), **G**: Após Hipoxia + 3 dias (H-3d), **H**: Após Hipoxia + 5 dias (H-5d). 128

Figura 2 Acúmulo de transcritos em frutos de tomate cv. FlavorTop em diferentes condições de armazenamento. A expressão gênica foi representada em diferentes escalas, usando o programa *Multi Experiment Viewer (TIGR MeV)*. O acúmulo de mRNA da **N** (Colheita/Normoxia) serviu como calibrador para determinar os níveis de transcritos dos genes avaliados, onde **N-1d**: Normoxia + 1 dia, **N-3d**: Normoxia + 3 dias, **N-5d**: Normoxia + 5 dias, **H**: Hipoxia durante 3 dias, **H-1d**: Após Hipoxia + 1 dia, **H-3d**: Após Hipoxia + 3 dias e **H-5d**: Após Hipoxia + 5 dias. Os genes avaliados neste estudo foram **ADH**: álcool desidrogenase, **PDC**: piruvato decarboxilase, **LDH**: lactato desidrogenase, **ACO1**: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase, **HSF3**: fator de choque de calor, **HSPs**: proteína de choque térmico 70, 90 e 110, e **sHSPs**: pequena proteína de choque térmico 17.6, 17.7, 21 e 23.6..... 129

7. CAPÍTULO VI – Protocolo para construção dos plasmídios Ubi:HSFA4d e 35S:HSFA4d para transformação de plantas de arroz e tomate visando tolerância a diferentes estresses abióticos

Figura 1 Vetor de entrada pENTR/D-TOPO.....	143
Figura 2 Vetor de destino pH7WG2,0-Ubi para monocotiledôneas.....	144
Figura 3 Vetor de destino pH7WG2,D,1 para dicotiledôneas.....	144
Figura 4 Amplificação do gene <i>OsHsfA4d</i> . Marcador utilizado: <i>Low DNA Mass Ladder</i>	147
Figura 5 Produto de PCR do gene <i>OsHsfA4d</i> purificado. Marcador utilizado: <i>Low DNA Mass Ladder</i>	147

Figura 6 DNA plasmidial do pENTR/D-TOPO + <i>OsHsfA4d</i> . Marcador utilizado: <i>1Kb DNA Ladder</i>	147
Figura 7 Amplificação do gene <i>OsHsfA4d</i> a partir do DNA plasmidial do pENTR/D-TOPO + <i>OsHsfA4d</i> . Marcador utilizado: <i>1Kb Plus DNA Ladder</i>	148
Figura 8 Alinhamento da sequência clonada no vetor de entrada.....	148
Figura 9 Amplificação do gene <i>OsHsfA4d</i> a partir do DNA plasmidial pH7WG2,0-Ubi + <i>OsHsfA4d</i> e pH7WG2,D,1 + <i>OsHsfA4d</i> . Marcador utilizado: <i>Low DNA Mass Ladder</i>	149
Figura 10 Amplificação do gene <i>OsHsfA4d</i> a partir do DNA plasmidial <i>A. tumefaciens</i> transformada com as construções Ubi: <i>OsHsfA4d</i> e 35S: <i>OsHsfA4d</i> . Marcador utilizado: <i>Low DNA Mass Ladder</i>	149
Figura 11 - Plantas de arroz em meio de seleção (meio MS acrescido de higromicina 20 mg L ⁻¹).....	150
Figura 12 Plantas de arroz putativamente transformadas em meio de enraizamento (meio MS acrescido de sacarose 80 g L ⁻¹)	150
Figura 13 Plantas de arroz putativamente transformadas em processo de aclimatação. A: plântula em água; B: plântulas em solo:vermiculita (2:1) e C: plântulas em sala de crescimento	150

8. CAPÍTULO VII - Perfil de expressão gênica em pêssegos tratados com ácido giberélico na pré-colheita e armazenados sob baixas temperaturas na pós-colheita

- Figura 1 Análise da qualidade das amostras de RNA. **A:** 2000 ng de RNA total em gel de agarose 1%. **B:** 200 ng de RNA em eletroforese capilar. O pico menor representa o 18S e o pico maior representa o 28S. O eixo X representa o tempo de retenção, e o eixo Y representa a fluorescência. O valor de RIN representa a integridade do RNA. GA₃: frutos colheita tratados com GA₃; C: frutos colheita controle; C-CS frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente; GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente... ..164
- Figura 2 Distribuição dos tratamentos através da análise de componentes principais. Os componentes 1 e 2 representam 87,2% da variação. GA₃: frutos colheita tratados com GA₃; C: frutos colheita controle; C-CS frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente; GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente..... 166
- Figura 3 Representação de genes induzidos e reprimidos nas diferentes condições experimentais. C_GA₃: frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle; C_C-CS: frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle; GA₃_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃; C-CS_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente 166
- Figura 4 Genes induzidos (A) e reprimidos (B) específicos em cada condição experimental. C_GA₃: frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle; C_C-CS: frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos

colheita controle; GA₃_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃; C-CS_ GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente 167

- Figura 5 Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_GA₃ (frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 171
- Figura 6 Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_C-CS (frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 172
- Figura 7 Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3). 173
- Figura 8 Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 174

- Figura 9 Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_GA₃ (frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 176
- Figura 10 Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_C-CS (frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3). 176
- Figura 11 Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzidos e reprimidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 177
- Figura 12 Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzidos e reprimidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3). 177
- Figura 13 Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_GA₃ (frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle).

Down-regulated: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 180

Figura 14 Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_C-CS (frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 181

Figura 15 Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e reprimidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3). 182

Figura 16 Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e reprimidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3)..... 183

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO II – Regulação e perfil de expressão de genes *ERFs* sob condições de estresse

Tabela 1 Iniciadores utilizados para análises de qPCR.	66
Tabela 2 Genes <i>ERFs</i> identificados em arroz.....	67
Tabela 3 Grupos gênicos formados de acordo com o perfil de expressão de genes <i>ERFs</i> sob diferentes condições de estresse.....	74
Tabela 4 Número de ocorrências de elementos <i>cis</i> em promotores de genes considerados com regulação complexa e com regulação simples.....	75
Tabela 5 Número de ocorrência dos elementos <i>cis</i> significativos dentro da família ERF.....	76
Tabela 6 Elementos <i>cis</i> comuns entre os grupos gênicos formados de acordo com o perfil de expressão.....	78

4. CAPÍTULO III - Acúmulo de transcritos dos genes codificadores de subunidades dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em plantas de arroz sob estresse por anoxia

Tabela 1 Genes avaliados no programa <i>Genevestigator</i> e por qPCR.....	94
--	----

5. CAPÍTULO IV - Perfil de expressão de genes *HSPs* em arroz sob condições de estresse por anoxia

Tabela 1 Iniciadores específicos utilizados para análises de qPCR.....	110
--	-----

6. CAPÍTULO V - Efeito do armazenamento em hipoxia sobre o acúmulo de transcritos de genes *HSPs* durante o amadurecimento de frutos de tomate

Tabela 1 Lista de iniciadores específicos utilizados para análises de qPCR 126

Tabela 2 Coloração da epiderme de frutos de tomate submetidos a condições de normoxia e hipoxia 127

Tabela 3 Localização celular dos genes estudados 132

7. CAPÍTULO VI – Protocolo para construção dos plasmídios *Ubi:HSFA4d* e *35S:HSFA4d* para transformação de plantas de arroz e tomate visando tolerância a diferentes estresses abióticos

Tabela 1 Iniciadores utilizados para amplificação do gene *OsHsfA4d*..... 141

8. CAPÍTULO VII - Perfil de expressão gênica em pêssegos tratados com ácido giberélico na pré-colheita e armazenados sob baixas temperaturas na pós-colheita

Tabela 1 Características de pêssegos Chimarrita não tratados (controle) e tratados com GA₃ (GA₃), na colheita, 2 e 4 dias após armazenamento em temperatura ambiente (RT) e após armazenamento a frio (CS)..... 163

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xx
1 INTRODUÇÃO GERAL	25
2 CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica	28
2.1 Melhoramento Genético.....	28
2.2 Cultura do arroz.....	29
2.3 Cultura do tomateiro.....	31
2.4 Cultura do pessegueiro.....	33
2.5 Estresses abióticos.....	35
2.6 ERFs.....	36
2.7 HSPs e HSFs.....	39
2.8 TIM/TOM e TIC/TOC.....	42
2.9 Elementos regulatórios da transcrição.....	46
2.10 Referências Bibliográficas.....	47
3 CAPÍTULO II - Regulação e perfil de expressão de genes <i>ERFs</i> em diferentes condições de estresse em arroz	59
3.1 Introdução.....	60
3.2 Material e Métodos.....	62
3.3 Resultados e Discussão.....	66
3.4 Conclusão.....	82
3.5 Referências Bibliográficas.....	83
4 CAPÍTULO III - Acúmulo de transcritos dos genes codificadores de subunidades dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em plantas de arroz sob estresse por anoxia	89
4.1 Introdução.....	90
4.2 Material e Métodos.....	93
4.3 Resultados e Discussão.....	95

4.4 Conclusão	102
4.5 Referências Bibliográficas	102
5 CAPÍTULO IV - Perfil de expressão de genes <i>HSPs</i> em arroz sob condições de estresse por anoxia	106
5.1 Introdução	107
5.2 Material e Métodos	109
5.3 Resultados e Discussão	112
5.4 Conclusão	118
5.5 Referências Bibliográficas	118
6 CAPÍTULO V - Efeito do armazenamento em hipoxia sobre o acúmulo de transcritos de genes <i>HSPs</i> durante o amadurecimento de frutos de tomate	122
6.1 Introdução	122
6.2 Material e Métodos	124
6.3 Resultados e Discussão	127
6.4 Referências Bibliográficas	133
7 CAPÍTULO VI – Protocolo para construção dos plasmídios <i>Ubi:HSFA4d</i> e <i>35S:HSFA4d</i> para transformação de plantas de arroz e tomate visando tolerância a diferentes estresses abióticos	138
7.1 Introdução	139
7.2 Material e Métodos	141
7.3 Resultados	146
7.4 Considerações finais	151
7.5 Referências Bibliográficas	151
8 CAPÍTULO VII - Perfil de expressão gênica em pêssegos tratados com ácido giberélico na pré-colheita e armazenados sob baixas temperaturas na pós-colheita.....	154
8.1 Introdução	155
8.2 Material e Métodos	158
8.3 Resultados	162
8.4 Discussão.....	191
8.5 Conclusão	199
8.6 Referências Bibliográficas	199

9 CAPÍTULO VIII - Conclusões gerais.....	206
10.0 ANEXOS	208
11.0 VITAE.....	229

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os vegetais estão continuamente expostos a estresses abióticos e bióticos no ecossistema de cultivo, bem como nos biomas em que coevoluíram. Para sobreviver, se adaptar, assim como para tornar-se domesticadas sob estas condições, as plantas desenvolveram e continuam desenvolvendo complexos mecanismos para perceber os sinais externos e emitir respostas frente a estes estresses. Estes mecanismos iniciam com a percepção do estímulo, seguindo pela transdução do sinal até a regulação da expressão gênica, bem como a regulação bioquímico-fisiológica do processo. As alterações das taxas parciais de O₂ (oxigênio) e CO₂ (dióxido de carbônico), dos teores de salinidade, de radiação UV, assim como as alterações de temperatura e aporte hídrico estão entre os estresses ambientais mais importantes que causam danos às culturas. Estresses ambientais afetam o crescimento e desenvolvimento e, por consequência, a produtividade de plantas cultivadas. Entretanto, algumas destas variáveis abióticas, podem ser utilizadas como meios de prolongamento da vida de prateleira de frutos e vegetais. O frio e/ou hipoxia quando são utilizados como forma de armazenamento pós-colheita de frutos, ainda que em algumas situações causem danos significativos, podem apresentar resultados positivos. Deste modo percebe-se que os agentes estressores, dependendo da intensidade com que são aplicados, do modelo de estudo, estágio de desenvolvimento, e interação com outros fatores bióticos ou abióticos, podem resultar em respostas variadas.

Embora em intensidades e frequências variadas, no ambiente natural, condições de anoxia ocorrem em situações de completa submersão, onde a disponibilidade de O₂ e CO₂ é diminuída, resultando no déficit de energia causado pela inibição da respiração. Em áreas compactadas, situação típica de algumas regiões do Sul do Rio Grande do Sul (RS), onde o solo é hidromórfico, condições de submersão podem ocorrer em determinadas épocas do ano, quando a frequência de precipitações é mais elevada do que o normal, prejudicando o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas locais.

Outro agente estressor, de ocorrência frequente na Região Sul do RS, são as baixas temperaturas. O frio é um dos fatores ambientais mais comuns que limitam a distribuição geográfica e a época de cultivo de muitas espécies de plantas. A maioria das espécies vegetais de importância econômica, como arroz, milho, tomate, soja, algodão e culturas de frutíferas como bananeira, mamoeiro e mangueira são sensíveis ao frio, e este estresse pode prejudicar a sua qualidade e produtividade. Além disso, existem algumas plantas que, embora tolerem bem as condições de clima temperado, produzem frutos sensíveis ao frio, como é o caso do pessegueiro, macieira, pereira, marmeleiro, nespereira, ameixeira, entre outras.

A utilização do arroz (*Oryza sativa* L.) como modelo para estudos de mecanismos de tolerância ao estresse ocasionado pela restrição de O₂ constitui-se em excelente opção, tendo em vista que é um material genético com variabilidade de comportamento frente a este evento, apresentando genótipos adaptados ao cultivo irrigado e genótipos adaptados ao cultivo de sequeiro. Uma vez que a maioria das plantas de importância econômica não tolera condições de alagamento, principal causa ambiental de falta de O₂, o desenvolvimento de variedades tolerantes a estas condições torna-se necessário. Desta forma, o conhecimento adquirido da identificação de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância a deficiência de O₂ em arroz pode ser transferido para outras espécies cultivadas sensíveis a hipoxia/anoxia, visando o desenvolvimento de genótipos tolerantes a esta condição adversa.

Embora o arroz seja uma espécie vegetal de interesse agrícola com maiores avanços em termos de genômica estrutural e funcional, não se constitui num bom modelo para estudos de expressão gênica e de metabólitos em frutos. No caso de estudos de anoxia, toma maior importância o tomate (*Lycopersicon esculentum* M.), e no caso particular de danos por frio, o fruto com maior expressividade é pêssego (*Prunus persica* L. Batsch.). A utilização do tomate como modelo para estudos de estresse por anoxia é uma alternativa vantajosa, pois dentre as demais espécies hortícolas é a que possui maior disponibilidade de informações (Sol Genomics Network - <http://solgenomics.net/>). Estudos das vias moleculares relacionadas com a maturação, não só permitem o entendimento do controle genético e hormonal sobre o processo de amadurecimento como também facilitam o alvo da engenharia

genética e o melhoramento vegetal na busca de melhores características sensoriais e funcionais. No caso de estudos relacionados aos danos ocasionados pelo frio, o pêssego é considerado um bom modelo, uma vez que necessita de armazenamento a frio durante sua comercialização, e apresenta perda de qualidade devido ao desenvolvimento de distúrbios fisiológicos ocasionados por baixas temperaturas.

2 CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

2.1 Melhoramento genético

O melhoramento de plantas “É a arte e a ciência de melhorar geneticamente plantas para o benefício da humanidade”. A arte do melhoramento depende da habilidade do melhorista de observar diferenças nas plantas que podem ter importância econômica. Com o avanço da tecnologia, o melhoramento tem perdido muito de seu aspecto artístico e tem se baseado cada vez mais na ciência (POEHLMANN e SLEPER, 1995).

Atualmente, o desenvolvimento de cultivares superiores mais produtivas, com maior qualidade e mais tolerantes a condições adversas, assim como a adaptação de genótipos em novos ambientes de cultivo são os principais objetivos do melhoramento de plantas. Entretanto, para que estes objetivos sejam alcançados é necessário a presença de variabilidade genética, eficiência na seleção dos genótipos mais promissores e ajuste das melhores constituições genéticas ao ambiente de cultivo. Entretanto, a identificação da variabilidade é um dos fatores limitantes para o melhorista, pois a avaliação de um determinado caracter pode ser confundida pela ação do ambiente e por interações alélicas ou gênicas (CARVALHO et al., 2003).

O uso de ferramentas de biotecnologia, como marcadores moleculares, associadas a genes de interesse torna possível a identificação de genótipos portadores de alelos promissores sem a ação do ambiente (MAIA, 2007). Assim, o estudo da expressão de um gene em determinada condição é fundamental para correlacionar com a resposta da planta e com mecanismos de tolerância. Desta forma, para que os melhoristas consigam desenvolver genótipos capazes de suportar diferentes estresses sem que haja perdas na produtividade, é necessário compreender as mudanças que ocorrem na célula em condições de estresse. Neste sentido, a identificação de genes responsivos a estresses ambientais em diferentes genótipos pode auxiliar no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008).

2.2 Cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma espécie diplóide, com $x=12$ cromossomos ($2n=24$ cromossomos), pertencente à família Poaceae. É uma planta anual e com reprodução por autogamia. Tem como centro de origem a China, e centro de domesticação a região da Índia e Mianmar. A espécie *Oryza rufipogon* é considerada o ancestral selvagem do arroz (BAUTISTA et al., 2001). O gênero *Oryza* compreende 20 espécies selvagens e duas espécies cultivadas (*Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*) (VAUGHAN et al., 2003). A espécie *Oryza sativa* foi dividida em três subespécies, *indica*, *japonica* e *javanica* (LONDO et al., 2006) e a espécie *Oryza glaberrima* foi dividida em duas subespécies, *nivara* (anual) e *rufipogon* (perene) (VAUGHAN et al., 2003). *Oryza sativa* é cultivada na Ásia, Américas, Europa e alguns países da África, enquanto que *Oryza glaberrima* é cultivada no oeste da África (LINARES, 2002).

De acordo com o Lee (1993) existem quatro ecossistemas de cultivo de arroz, o ecossistema de cultivo irrigado (áreas niveladas com controle da água e inundação durante crescimento das plantas), o ecossistema de sequeiro em várzea (falta de controle da água e problemas com enchentes e secas), o ecossistema de sequeiro (terrenos inclinados com escoamento de água), e o ecossistema de áreas propensas a enchentes (até cinco meses de submersão completa).

No Brasil, os dois ecossistemas de cultivo predominantes são o irrigado e o sequeiro. O Rio Grande do Sul (RS), que utiliza o ecossistema de cultivo irrigado, tem importância fundamental na produção de arroz nacional, sendo responsável por 63,95% da produção de arroz do Brasil (CONAB, 2011). Na safra 2011/2012 houve uma redução na área de cultivo no RS devido à dificuldade de comercialização, preços pouco atrativos, aumento do custo de produção e falta de água nos reservatórios. O cultivo de sequeiro, cuja área no Brasil equivale ao irrigado está diminuindo a cada safra, no entanto, esta diminuição não foi percebida na produção nacional, pois o arroz de cultivo irrigado apresenta constante aumento de produtividade (CONAB, 2012).

O arroz é um dos cereais mais cultivados no mundo, ficando atrás apenas do milho. Com relação à produção mundial, o principal produtor de arroz é a China, com uma produção de 197,2 milhões de toneladas, o Brasil aparece em 9º lugar, com uma produção de 11,3 milhões de toneladas (FAO, 2012).

O arroz é uma das principais culturas para alimentação humana no mundo, e além de servir como alimento para milhões de pessoas, é uma fonte de renda e de empregos (FAO, 2012). Um quinto da população mundial depende do cultivo de arroz para sua subsistência. Na maioria dos países em desenvolvimento, o arroz é considerado segurança alimentar, e está intimamente ligada a segurança política (IRRI, 2012).

O constante aumento da população mundial requer um aumento na produtividade da cultura, uma vez que não há espaço disponível para expandir a área cultivada. Além disso, a produtividade de arroz é reduzida pela presença de diferentes estresses bióticos e abióticos durante o cultivo. Desta forma, para aumentar a produtividade do arroz nestas condições é necessária a obtenção de novas variedades, provenientes de trabalhos de biotecnologia e melhoramento genético (BRESOLIN, 2010).

A utilização da biotecnologia auxilia na identificação de genótipos de arroz com maior potencial de rendimento, maior estabilidade de produção e adaptabilidade as mudanças climáticas globais, além de resistência durável a pragas e patógenos e tolerância a estresses abióticos (BRESOLIN, 2010). Com relação à utilização de biotecnologia na obtenção de novos genótipos, o arroz é uma espécie privilegiada, pois possui seu genoma completamente sequenciado. Além disso, devido ao tamanho pequeno de seu genoma e a presença de sintenia e colinearidade com os demais cereais, o arroz é considerado uma espécie modelo dentro da família Poaceae (BENNETZEN e FREELING, 1993; DEVOS, 2005), permitindo a transferência de informações científicas para as espécies menos estudadas (VARSHNEY et al., 2006).

Em condições naturais ou experimentais, as plantas podem ser submetidas à disponibilidade de O₂ (oxigênio) variando desde os teores normais (normoxia), passando pela deficiência (hipoxia) ou até mesmo pela ausência (anoxia) (SOUZA e SODEK, 2002). Em condições de completa submersão, ocorre uma diminuição

na difusão de O_2 de 10^4 vezes, o que resulta em um efeito drástico nas atividades bioquímicas do metabolismo vegetal, como respiração e fotossíntese. A inibição destes processos pode estimular mudanças como, alongação do pecíolo e entrenó, alterações na estrutura e anatomia das células das folhas e raízes, desenvolvimento de raízes adventícias, formação de aerênquimas, e troca da respiração aeróbica por respiração anaeróbica. Além disso, a falta de O_2 pode apresentar efeitos letais, devido ao alto consumo de carboidratos e acúmulo de produtos tóxicos no citosol ou dano na integridade das membranas (FUKAO et al., 2006).

O arroz é uma das poucas culturas que consegue germinar e crescer em solos permanentemente alagados, devido à capacidade de desenvolver uma rede interligada de espaços com gás (aerênquimas), que facilita a difusão de O_2 da parte aérea para as partes submersas da planta. A submergência induz a biossíntese de ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), o qual é convertido em etileno, através da utilização de O_2 produzido pela fotossíntese ou oriundo do ambiente aquoso. Este hormônio tem um papel importante na resposta de adaptação ao estresse por alagamento, ou seja, contribui para coordenar a morte celular programada para formação de aerênquimas, induz a formação de raízes adventícias durante a hipoxia e promove a alongação de entrenós e pecíolos para estender os órgãos fotossintéticos acima da superfície da água através do aumento do teor de ácido giberélico endógeno e a sensibilidade a este hormônio (KENDE et al., 1998). Este mecanismo é denominado estratégia de escape, a qual coloca a parte aérea acima do nível da água, permitindo que a planta retome a atividade metabólica aeróbica.

Neste sentido, o arroz torna-se um modelo vegetal interessante para estudos visando à identificação de genes associados com o mecanismo de tolerância ao estresse por baixos níveis de O_2 .

2.3 Cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma espécie diplóide, com $x=12$ cromossomos ($2n=24$ cromossomos), pertencente à família Solanaceae e apresenta reprodução por autogamia. O centro de origem do tomate é uma região que

compreende o México, o Equador e a Bolívia. Sua domesticação ocorreu no México, e tem como ancestral selvagem a espécie *Solanum cerasiforme* (RICK e HOLLE, 1990).

O tomateiro é uma das culturas hortícolas mais importantes do mundo. Com relação à produção mundial, o principal produtor de tomate é a China, com uma produção de 41,8 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a 9ª posição, com uma produção média de 3,6 milhões de toneladas (FAO, 2012). Esta hortaliça apresenta um alto consumo per capita devido ao seu uso versátil na culinária. Além disso, o consumo do tomate tem aumentado ainda mais devido às propriedades nutricionais e funcionais conferidas pelas vitaminas (C e E) e outros compostos antioxidantes (licopeno, fenóis e flavonoides) (DÍAZ de LEÓN-SÁNCHEZ et al., 2009).

Práticas agrícolas que alteram o ambiente de plantas ou frutos podem influenciar na composição metabólica destes. Neste sentido, o alagamento ou irrigação em solos com drenagem deficiente, ou áreas úmidas, deixam as raízes em ambiente com deficiência de O₂. A diminuição de O₂ não é responsável diretamente pelas mudanças metabólicas, mas é capaz de induzir uma cascata de sinalização que resulta em mudanças na expressão gênica (RICARD et al., 2006). A consequência imediata da falta de O₂ é a redução da respiração, com diminuição da produção de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) levando a diminuição da relação ATP/ADP (adenosina difosfato), resultando em distúrbios no crescimento e desenvolvimento da planta (GHARBI et al., 2007).

Em tomateiros, a falta de O₂ afeta o funcionamento normal da raiz por limitar a respiração aeróbica, causando epinastia das folhas e reduzida taxa fotossintética. Além disso, o alagamento afeta a síntese e transporte de citocininas que são requeridas para o desenvolvimento normal da parte aérea da planta (HO, 1988). Como os frutos são órgãos que importam minerais e fotoassimilados das folhas e das raízes, seu crescimento pode ser afetado pela limitação de O₂ (HO, 1996; HORCHANI et al., 2010).

No entanto, baixas taxas de O₂, quando aplicadas diretamente nos frutos após a colheita, podem ser utilizadas como meios de prolongamento da vida de prateleira (LARA et al., 2010). Baixos níveis de O₂, assim como baixas temperaturas quando são utilizados durante o armazenamento pós-colheita de frutos, ainda que

em algumas situações causem injúrias, podem apresentar resultados positivos. Desta forma, verifica-se que os estresses ambientais, dependendo da intensidade com que são aplicados, da espécie, estágio de desenvolvimento, e interação com outros estresses abióticos, podem resultar em respostas variadas (MITTLER, 2006).

O O_2 está fortemente relacionado à taxa de respiração na colheita, assim, se a concentração interna de O_2 diminui, a respiração também diminui. Além disso, o O_2 é requerido para a biossíntese de etileno, e conseqüentemente, baixos níveis de O_2 vão afetar a concentração de etileno (LURIE e PESIS, 1992). A redução da produção de etileno e da respiração resulta na ampliação da vida pós-colheita de frutos, e em alguns casos na prevenção de desordens fisiológicas (PEGORARO et al., 2010). Neste sentido, baixas taxas de O_2 tem sido aplicadas com sucesso em diferentes frutos, como complemento ou alternativa à refrigeração. Contudo, o ambiente hipóxico pode provocar efeitos prejudiciais como amadurecimento anormal, escurecimento da polpa e alta produção de etanol e acetaldeído (FALLIK et al., 2003).

Muitos estudos têm sido realizados em plantas visando identificar as respostas bioquímicas e moleculares do estresse por anoxia/hipoxia, sendo o alagamento a condição ambiental associada ao déficit de O_2 (BAILEY-SERRES et al., 2008; BAILEY-SERRES et al., 2010; FUKAO et al., 2006; FUKAO et al., 2008; FUKAO et al., 2011). No entanto, em frutos, embora muitos estudos indiquem o uso de atmosfera controlada no atraso do amadurecimento, somente poucos estudos têm analisado as respostas moleculares e as mudanças metabólicas neste órgão em relação ao tratamento anaeróbico (PASENTSIS et al., 2007). Uma vez que o tomate apresenta seu genoma completamente sequenciado e apresenta sensibilidade a baixas taxas de O_2 , torna-se um modelo interessante para analisar as respostas moleculares induzidas pela anoxia/hipoxia em frutos.

2.4 Cultura do pessegueiro

O pessegueiro *Prunus persica* (L.) Batsch. é uma espécie diplóide, com $x=08$ cromossomos ($2n=16$ cromossomos), pertencente à família Rosaceae, e apresenta reprodução por autogamia. O centro de origem e domesticação do pessegueiro

ocorreu na China (FAUST e TIMON, 1995), e seu ancestral selvagem é *Prunus consociiflora* Schneid (DAS et al., 2011).

Com relação à produção mundial, o principal produtor de pêssegos é a China, com uma produção de 10,7 milhões de toneladas, e o Brasil aparece em 14º lugar, com uma produção de 220,7 mil toneladas (FAO, 2012). No Brasil, o pessegueiro é uma espécie amplamente cultivada nas regiões Sul e Sudeste, tendo o RS como principal produtor. Na região Sul, as cultivares para consumo *in natura* (polpa branca e fundente) mais difundidas são a Chimarrita e a Chiripá (MEDEIROS e RASEIRA, 1998). Frutos de ambas as cultivares caracterizam-se por apresentarem alta perecibilidade quando comparados aos demais frutos de clima temperado, e até mesmo quando comparados com pêssegos de cultivares para indústria (polpa amarela e não fundente).

O pessegueiro, assim como as demais frutíferas de clima temperado, caracteriza-se pela queda das folhas como consequência da redução das suas atividades metabólicas, entrando em dormência no final do ciclo, em resposta aos primeiros frios. Para que inicie um novo ciclo vegetativo, é necessária a sua exposição a um período de baixas temperaturas, para que ocorra a superação da dormência (PETRI et al., 1996). Neste sentido, o frio torna-se um fator limitante durante o ciclo biológico do pessegueiro, uma vez que, a falta de baixas temperaturas durante o repouso hibernar repercute em distúrbios fisiológicos, que por sua vez comprometem a capacidade de brotação e frutificação.

Apesar de o frio ser um fator ambiental positivo para a planta, apresenta efeitos indesejados nos frutos, os quais necessitam de armazenamento em baixas temperaturas para estender o período pós-colheita. O frio inibe o amadurecimento devido à redução do metabolismo, prolongando a vida de prateleira. Entretanto, pêssegos armazenados em baixas temperaturas (20-25 dias) podem desenvolver distúrbios fisiológicos, como lanosidade e escurecimento interno, os quais reduzem a qualidade pós-colheita, resultando em grandes perdas econômicas (CRISOSTO et al., 1999).

Um grande número de estudos já foi desenvolvido buscando elucidar os mecanismos moleculares que regem o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos ocasionados pelo frio, entretanto, a causa exata ainda não foi determinada, além

disso, os resultados encontrados, algumas vezes, acabam entrando em contradição (GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; VIZOSO et al., 2009; PEGORARO et al., 2010).

Desta forma, novos estudos moleculares, como estabelecimento de perfis transcricionais, podem ser utilizados na compreensão dos mecanismos que levam às injúrias ocasionadas pelo frio em frutos de pêssegos. A identificação de genes diretamente associados com o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos poderá ser utilizada em estudos que visem à obtenção de genótipos de pêssegos capazes de produzir frutos tolerantes ao frio, seja por técnicas de transformação genética ou através de cruzamentos direcionados. Além disso, estes genes poderão ser utilizados como marcadores para seleção de genótipos capazes de produzir frutos tolerantes.

2.5 Estresses abióticos

Em geral, estresses abióticos (anoxia/hipoxia, frio, seca, calor, salinidade, metais pesados, radiação UV-B, dentre outros) induzem uma série de modificações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em plantas. Para evitar perdas ocasionadas por estresses ambientais, é de fundamental importância compreender as respostas das plantas frente a estresses que perturbam o equilíbrio homeostático celular e molecular, a fim de identificar um mecanismo comum para tolerância ao estresse múltiplo (SHANKER e VENKATESWARLU, 2011).

Somente 3,5% da área total cultivada no mundo não é afetada por algum tipo de estresse ambiental. As respostas das plantas a estresses abióticos são dinâmicas e complexas, e podem ser reversíveis ou irreversíveis, e estas respostas dependem do tecido ou do órgão afetado, e do tempo de exposição ao estresse (CRAMER et al., 2011). Nestas condições, as plantas ativam três classes de genes, os genes codificadores de enzimas com funções conhecidas ou com função estrutural, genes que codificam proteínas com funções desconhecidas e genes que codificam proteínas reguladoras (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008).

ROS (espécies reativas de oxigênio) e RNS (espécies reativas de nitrogênio) são moléculas primárias de resposta a estresse, as quais são capazes de modificar a atividade enzimática e a regulação gênica (MITTLER et al., 2011). Hormônios

também são reguladores importantes na resposta a estresses abióticos. Os principais hormônios envolvidos em resposta a estresses abióticos são o ABA (ácido abscísico) e o etileno (GODA et al., 2008). O ABA atua como sinalizador em resposta a estresse osmótico (seca, desidratação, salinidade), enquanto que o etileno atua como sinalizador em resposta a seca, ozônio, alagamento, calor, danos por frio, injúrias, e luz UV-B (CRAMER et al., 2011).

Dentre os genes que são ativados em resposta a estresses destacam-se genes de ação simples e genes regulatórios. Os genes de ação simples são os genes codificadores de proteínas envolvidas na síntese de osmoprotectantes (prolina, glicinabetaina, poliaminas, trealose, manitol e galactinol), genes codificadores de proteínas envolvidas na desintoxicação (genes codificadores de proteínas do sistema antioxidante que atuam na desintoxicação de ROS), genes codificadores de proteínas abundantes na embriogênese tardia - proteínas LEA (sequestram íons durante a desidratação celular), genes codificadores de proteínas de transporte (proteínas vacuolares), genes codificadores de proteínas multifuncionais para biossíntese de lipídios e genes codificadores de proteínas de choque térmico - *heat shock proteins* (responsáveis pela homeostase celular). Os genes regulatórios codificam fatores de transcrição (AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, Cys2His2 zinc-finger e WRKY) e genes que atuam na cascata de transdução de sinal (sinalizadores de Ca^{2+} e cascata de proteínas *kinases-MAPK*) (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008).

Uma abordagem aprofundada que combina os aspectos moleculares, fisiológicos e metabólicos de resposta a estresses abióticos é necessária para o melhor entendimento do efeito da ativação gênica e de seus produtos a curto e longo prazo, e para relacionar a expressão gênica com a tolerância a estresses.

2.6 ERFs

ERFs (fatores transcrição responsivos ao etileno - *Ethylene responsive factors*) pertencem à superfamília AP2/ERF, a qual contém também as famílias AP2 e RAV (RIECHMANN et al., 2000). A superfamília AP2/ERF é definida pelo domínio AP2/ERF, composto por aproximadamente 60 aminoácidos, envolvido na

associação ao DNA (ALLEN et al., 1998). A família AP2 contém dois domínios AP2/ERF, a família ERF contém apenas um domínio AP2/ERF, e a família RAV, além da presença de um domínio AP2/ERF contém um domínio B3, conservado em outros fatores de transcrição de plantas (VP1/ABI3) (NAKANO et al., 2006). A família ERF pode ser dividida em duas subfamílias, a subfamília ERF e a subfamília CBF/DREB (SAKUMA et al., 2002).

ERFs estão presentes em plantas e apresentam função *trans* ativação, atuando na última etapa da transdução de sinal (OHME-TAKAGI e SHINSHI, 1995). A maioria dos ERFs se liga especificamente ao motivo *GCC-Box* com domínio GCCGCC para modular a expressão de uma grande variedade de genes responsivos ao etileno, indicando que uma cascata de sinalização é envolvida na sinalização deste hormônio (OHME-TAKAGI e SHINSHI, 1995). Alguns ERFs atuam como ativadores de transcrição dependentes do *GCC-Box* e outros atuam como ativadores de repressores que inibem a transcrição de determinados genes e de outros fatores de transcrição (FUJIMOTO et al., 2000). Além do etileno, hormônios como ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmônico e brassinosteróides (SAKUMA et al., 2002), assim como espécies reativas de O₂ também atuam na sinalização dos genes *ERFs* (ABOGADALLAH, 2010).

Os genes *ERFs* foram identificados primeiramente em *Nicotiana tabacum*, como elementos que se ligam às proteínas responsivas ao etileno (*ethylene-responsive element binding proteins* - EREBPs) (OHME-TAKAGI e SHINSHI, 1995). Estes autores identificaram os genes *EREBP1*, 2, 3 e 4, que apresentam em comum o domínio AP2/ERF, o qual se liga especificamente ao elemento *cis GCC-Box* da região promotora de proteínas de resposta ao ataque de patógenos. A partir deste estudo, o domínio AP2/ERF passou a ser utilizado na identificação de genes *ERFs* em diferentes espécies (NAKANO et al., 2006).

A cascata de transdução de sinais para a ativação dos *ERFs* inicia-se pelos receptores da membrana do retículo endoplasmático. Na ausência de etileno, os cinco receptores de membrana (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4) atuam como reguladores negativos da sinalização do etileno por ativação de CTR1 (*constitutive triple response1*). CTR1 atua inibindo EIN2 (*ethylene insensitive*), que seria responsável pela inibição de EBF1/2 (*EIN3-binding F-box protein*). Como EBF1/2

estão ativos, inibem EIN3/EIL1 que seriam os responsáveis pela ativação dos *ERFs* através da ligação na região promotora (PERE) destes genes. Quando o etileno está presente, os cinco receptores de membrana inibem CTR1, o qual não vai inibir EIN2, e este atuará na inibição de EBF1/2, permitindo a ação de EIN3/EIL1, que se ligarão na região promotora dos *ERFs*, os quais ativarão outros genes responsivos ao etileno (DUGARDEYN e VAN DER STRAETEN, 2008) com funções importantes na resposta das plantas a diferentes estádios de desenvolvimento, assim como em diferentes condições de estresses.

Muitos *ERFs* apresentam importância na tolerância a diferentes estresses abióticos. A superexpressão dos genes *DREB1A* e *DREB1B* promove o aumento de tolerância aos estresses por frio e seca em *Arabidopsis* (SAKUMA et al., 2006). Em arroz, o gene *AtERF024* quando superexpresso aumenta a eficiência do uso da água aumentando a tolerância à seca (KARABA et al., 2007). Outro *ERF*, o gene *JERF3* quando superexpresso em *Nicotiana tabacum* aumenta a tolerância à salinidade (WU et al., 2008). O *TERF1* é um gene de tomate, que quando superexpresso em arroz aumenta a tolerância à seca e salinidade (GAO et al., 2005). A superexpressão de *WXP1* em alfafa (*Medicago sativa*) resulta em aumento de tolerância a seca (ZANG et al., 2005). Em arroz, a presença do gene *SUB1A-1* é responsável pela tolerância a condições de submergência completa durante longos períodos (XU et al., 2006).

Devido à importância das proteínas pertencentes à família ERF em processos celulares, como transdução de sinal de hormônios, respostas a estresses bióticos e abióticos, regulação do metabolismo, e processos de desenvolvimento em várias espécies, genes *ERFs* são considerados interessantes para os cientistas de plantas, e a sua investigação em resposta a estresses ambientais é muito importante para a obtenção de plantas resistentes a condições ambientais adversas, mantendo a alta produtividade.

2.7 HSPs e HSFs

Em todos os organismos, a homeostase celular em condições ótimas e adversas de crescimento e desenvolvimento pode ser assegurada por uma família de proteínas altamente conservada entre as espécies, as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSPs). Estas proteínas foram descobertas em glândulas salivares da mosca das frutas (*Drosophila*) como resposta a estresse por calor (ASHBURNER e BONNER, 1979), mas atualmente é amplamente conhecido que estas proteínas são induzidas por inúmeros outros estresses (SÜLE et al., 2004). HSPs são chaperonas moleculares que regulam o dobramento, localização, acúmulo e degradação de proteínas em diferentes espécies de eucariotos e procariotos, desempenhando um papel amplo em muitos processos celulares (FEDER e HOFMANN, 1999). Em todos os organismos, a indução de HSPs é rápida e intensa, e o efeito de proteção das HSPs pode ser atribuído à atuação conjunta destas proteínas. A maioria das HSPs é codificada pelo genoma nuclear, mas a sua função pode ser em diferentes compartimentos da célula, incluindo citoplasma, mitocôndria, cloroplasto e retículo endoplasmático.

Em plantas, transcritos dos genes *HSPs* são acumulados em resposta a um grande número de fatores estressantes como arsenito, etanol, metais pesados, estresse por água, luz, hormônios, ácido abscísico, injúrias (ataque de pragas e patógenos), salinidade, calor, frio e baixas taxas de O₂ (SÜLE et al., 2004). Estudos prévios demonstram que as HSPs têm um papel crucial na proteção das células vegetais contra estresses ambientais e no reestabelecimento da homeostase celular (WANG et al., 2004).

As proteínas HSPs foram divididas em duas categorias, as que são constitutivamente expressas e as que são induzidas por estresse (VIERLING, 1991), e de acordo com seu peso molecular aproximado, as HSPs foram agrupadas em famílias, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, sHSPs (*small heat shock protein*) (SANMIYA et al., 2004), e cochaperonas HSP40 ou DNAJ (QIU et al., 2006).

A família HSP100 ou proteases caseinolíticas tem a capacidade de promover a dissociação de proteínas agregadas numa reação dependente de ATP (PARSELL et al., 1994). Esta remodelagem pode ser útil em múltiplas funções, como a

regulação da atividade de complexos proteicos, desdobramento de proteínas para facilitar a ação de proteases, e facilitar o redobramento de proteínas desnaturadas agregadas (BURTON e BAKER, 2005). Evidências *in vivo* e *in vitro* indicam que a função de proteção desta classe de chaperonas é resultado da sua atividade de solubilizar proteínas em cooperação com as chaperonas HSP70 (GOLOUBINOFF et al., 1999). Baseado na presença de um ou dois domínios de ligação de ATP, as proteínas HSP100 são divididas em duas principais classes, onde os membros da classe I (HSP100 tipo A, B, C e D) contêm dois domínios de ligação de ATP, e membros da classe II (HSP100 tipo M, N, X, e Y) contêm somente um domínio de ligação de ATP (AGARWAL et al., 2001).

A família HSP90 é muito abundante, altamente conservada, e essencial para a viabilidade da célula. Proteínas HSP90 contêm dois domínios altamente conservados, o domínio de ligação de ATP na região N-terminal, e uma região de ligação altamente rica em ácido glutâmico (KRISHNA e GLOOR, 2001). Estas proteínas são encontradas em diferentes compartimentos da célula, e são responsáveis pelo redobramento de proteínas desnaturadas e pelo dobramento de proteínas recém sintetizadas. Além disso, atuam na regulação de várias moléculas de sinalização celular (YAMADA et al., 2007).

As proteínas HSP70 além de assistir ao redobramento de proteínas nativas sob condições de estresse, têm papel essencial na prevenção da agregação de proteínas (BECHTOLD et al., 2008). HSP70 se ligam a proteínas desnaturadas, forçando seu redobramento para forma nativa, evitando a agregação das proteínas (FEDER e HOFMANN, 1999). A diversidade dos membros HSP70 é explicada pela presença de homólogos distintos no citosol, no lúmen, no retículo endoplasmático, e na matriz das mitocôndrias e cloroplastos. Os homólogos de HSP70 localizados no retículo endoplasmático são chamados de proteínas de ligação (BiP) (VIERLING et al., 1991). Membros da família HSP70 são caracterizados por um domínio de ligação de ATP na região N-terminal (EFEOGLU, 2009).

Membros família HSP60 são codificados por genes nucleares, mas atuam nas mitocôndrias e cloroplastos. HSP60 são chaperonas que ajudam no dobramento de proteínas e na montagem das subunidades de complexos proteicos. Adicionalmente, HSP60 cooperam com outras chaperonas, principalmente a HSP70 no transporte

celular. Cada monômero da HSP60 é identificado pela presença de três domínios estruturais, A (apical), I (intermediário) e E (equatorial) (BROCCHIERI e KARLIN, 2000).

Ao contrário das outras classes de HSPs, as sHSPs são incapazes de atuar no dobramento de proteínas não nativas de maneira individual, sendo necessário a formação de complexos com outras HSPs (WANG et al., 2004). Todos os membros da família sHSP apresentam um domínio de 90 aminoácidos na região C-terminal, chamado de domínio *α -crystalin* ou domínio de choque por calor (SUN et al., 2002). Em plantas, estas proteínas são codificadas por genes nucleares, e são divididas em três classes. As CI, CII e CIII são localizadas no citosol ou no núcleo, e as classes CIV, CV e CVI são localizadas nos cloroplastos, retículo endoplasmático e mitocôndria (EFEOGLU, 2009).

Proteínas HSP40 ou DNAJ são cochaperonas da maquinaria HSP70, tendo um papel importante na ativação da atividade ATPase da HSP70, estabilizando sua ligação com as outras proteínas. Embora as proteínas DNAJ sejam menos abundantes que as HSP70, podem atuar cataliticamente, interagindo transientemente, servindo a mais que uma HSP70 ao mesmo tempo. DNAJ são caracterizadas por diferentes tipos de domínios, como o domínio J, domínio *Zinc-finger*, e um domínio presente na região C-terminal (RAJAN e D'SILVA, 2009).

A transcrição da maioria dos genes codificadores de HSPs é regulada por fatores de transcrição de choque de calor (*Heat shock factors* - HSFs), localizados no citoplasma (HU et al., 2009). HSFs são componentes finais da rota de transdução de sinais que media a ativação de genes de resposta ao calor e a um grande número de estressores químicos (NAKAI, 1999). Estes fatores de transcrição reconhecem motivos de ligação palindrômicos, chamados elementos de estresse por calor (HSEs - 5'-AGAAnnTTCT-3') conservados em promotores de genes induzidos por estresse por calor em todos os eucariotos (NOVER et al., 2001).

Em plantas, existem três classes de HSFs, a classe A, B e C, agrupadas de acordo com peculiaridades na região HR-A/B (*Hydrophobic heptad repeats*). A região HR-A/B é caracterizada pela presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, responsável pela polimerização dos HSFs (NOVER et al., 1996). A região HR-A/B de HSFs da classe B é similar aos HSFs de outros organismos (não

plantas), e os HSFs das classes A e C apresentam a região HR-A/B estendida, devido à inserção de 21 aminoácidos na classe A, e 7 aminoácidos na classe C (NOVER et al., 2001).

Embora haja uma considerável diferença no tamanho e na sequência dos HSFs, sua estrutura básica é conservada entre os eucariotos (NOVER et al., 2001). Próximo à região N-terminal, o domínio DBD (*DNA binding domain*) é altamente conservado entre os HSFs, sendo constituído de um feixe helicoidal (H1, H2 e H3) e quatro cadeias antiparalelas de folha β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$). O núcleo hidrofóbico deste domínio assegura o posicionamento preciso do domínio H2-T-H3 (hélice-giro-hélice) requerido para o reconhecimento dos HSEs (SCHULTHEISS et al., 1996). O domínio DBD em plantas é codificado por duas partes separadas por um íntron, o qual é inserido antes da parte que codifica o motivo de ligação H2-T-H3 (NOVER et al., 2001).

Estudos demonstram que a superexpressão de *HSFs* em plantas resultou em aumento da tolerância a calor, sal, estresse osmótico e frio (LI et al., 2003; OGAWA et al., 2007). Além do controle de respostas a estresse por calor, salinidade e frio, HSFs estão envolvidos na resposta de defesa ao ataque de patógenos, estresse oxidativo, metais pesados, desidratação, e em certos processos de desenvolvimento e diferenciação (WANG et al., 2009).

A coexpressão de *HSFs* em resposta a diferentes estresses abióticos indica que estes fatores de transcrição podem regular múltiplos mecanismos. Desta forma, os *HSFs* são considerados uma família gênica importante, e seu potencial de resposta a diferentes estresses podem ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais (MITTAL et al., 2009).

2.8 TIM/TOM e TIC/TOC

Mitocôndrias e cloroplastos são organelas especializadas em sintetizar ATP. Na mitocôndria, a síntese de ATP ocorre através da energia liberada pela cadeia de transporte de elétrons e pela fosforilação oxidativa, enquanto que no cloroplasto, a síntese de ATP se dá através da energia liberada na fotossíntese. Embora ambas as organelas contenham seu próprio DNA, ribossomos e componentes requeridos

para síntese proteica, a maioria das proteínas presentes nos cloroplastos e mitocôndrias são codificadas pelo genoma nuclear e importadas a partir do citosol (ALBERTS et al., 2002).

A coordenação do núcleo com cloroplastos e mitocôndrias é crucial para a sobrevivência da célula. O mecanismo de regulação entre o núcleo e os cloroplastos e as mitocôndrias se dá de maneira anterógrada (núcleo para organela) e retrógrada (organela para núcleo). Na regulação anterógrada os mecanismos que coordenam a expressão gênica nas organelas em resposta a estímulos endógenos ou ambientais são percebidos pelo núcleo, enquanto que na regulação retrógrada, mecanismos transmitem sinais originados nas organelas para regular a expressão gênica nuclear, o qual pode atuar na regulação anterógrada (WOODSON e CHORY, 2009).

Em mitocôndrias existem dois subcompartimentos, o espaço da matriz interna e o espaço intermembranas. Estes compartimentos são formados por duas membranas mitocondriais, a membrana interna que apresenta invaginações extensas e cristas, incluindo o espaço da matriz, e a membrana externa que está em contato com o citosol. Cloroplastos também apresentam os mesmos dois subcompartimentos e um subcompartimento adicional, o espaço dos tilacóides, o qual está rodeado pela membrana dos tilacóides (ALBERTS et al., 2002).

Aproximadamente 95% das proteínas encontradas na mitocôndria de plantas são codificadas pelo genoma nuclear. Estas proteínas são traduzidas nos ribossomos presentes no citosol, e após a tradução são transportadas para as organelas. O processo de importação requer uma interação específica entre sinais alvo, frequentemente localizados na região N-terminal das proteínas e os componentes denominados aparatos de importação (BRAUN e SCHMITZ, 1999). Após a síntese, as proteínas que serão enviadas para a mitocôndria, permanecem desdobradas, ou seja, não adquirem a forma nativa antes de chegarem ao destino final. Este processo é coordenado pelas chaperonas citosólicas, ou por outras proteínas que se ligam diretamente ao peptídeo sinal (ALBERTS et al., 2002).

Existem três principais tipos de proteínas que fazem parte do aparato de importação, as translocases que estão presentes na membrana interna e externa da mitocôndria, as enzimas de processamento, as quais removem os sinais alvo assim que as proteínas tenham chegado ao seu destino, as chaperonas que estão

presentes no citosol e mantêm as proteínas desdobradas durante a importação, assim como as chaperonas e chaperoninas presentes dentro das mitocôndrias que estão envolvidas na translocação de membranas, redobramento e montagem das proteínas importadas (BRAUN e SCHMITZ, 1999). O complexo de translocases de membrana externa da mitocôndria foi denominado TOM (*translocase of the outer membrane*), enquanto que o complexo de translocases de membrana interna da mitocôndria foi denominado TIM (*translocase of the inner membrane*). As siglas TIM e TOM são seguidas pelo peso molecular específico de cada complexo (PFANNER et al., 1996).

O complexo TOM consiste de dois tipos funcionais diferentes de proteínas, as proteínas receptoras de superfície, importantes para o reconhecimento específico de precursores mitocondriais, e as proteínas integradas nas membranas, formando um poro para assistir a translocação entre membranas (BRAUN e SCHMITZ, 1999). Este complexo é necessário para a importação de todas as proteínas mitocondriais codificadas pelo núcleo. Inicialmente, o complexo TOM atua transportando as sequências sinais para o espaço intermembranas, e ajuda a inserir proteínas transmembrana na membrana externa (ALBERTS et al., 2002). O complexo TIM transporta algumas destas proteínas para o espaço da matriz, enquanto ajuda a inserir proteínas transmembranares na membrana interna. A translocação de proteínas através do complexo TOM requer ATP, enquanto que a translocação de proteínas através do complexo TIM requer, além de ATP, um potencial eletroquímico, normalmente é estabelecido pela cadeia de transporte de elétrons (GASSER et al., 1982).

Na membrana interna, existe também o complexo OXA (*oxidase assembly*) que media a inserção de proteínas que foram sintetizadas dentro da mitocôndria, além de ajudar a inserir algumas proteínas que foram inicialmente transportadas através dos complexos TOM e TIM (ALBERTS et al., 2002).

Nos cloroplastos, a importação de proteínas codificadas pelo núcleo se assemelha em muitos aspectos com as mitocôndrias. Ambos os processos ocorrem após a tradução, utilizam complexos de translocação em cada uma das membranas, requerem energia, e sequências anfipáticas na região N-terminal que são removidas após o uso. Porém, enquanto que na mitocôndria o gradiente eletroquímico na

membrana interna dirige a translocação, no cloroplasto o gradiente eletroquímico está presente somente na membrana dos tilacóides e não na membrana interna. E nos cloroplastos, além do consumo de ATP, a hidrólise de GTP (guanosina trifosfato) é necessária para que haja a importação de proteínas (ALBERTS et al., 2002).

Nos cloroplastos, a importação de proteínas ocorre através de dois complexos proteicos hetero-oligoméricos, localizados no envelope da membrana externa e interna. O complexo de translocons do envelope da membrana externa do cloroplasto é denominado TOC (*translocon at the outer envelope of chloroplasts*), enquanto que o complexo de translocons do envelope da membrana interna do cloroplasto é denominado TIC (*translocon at the inner envelope of chloroplasts*). O complexo TOC consiste de cinco subunidades, TOC159, TOC34, e TOC64, responsáveis pela ligação das proteínas (QBADOU et al., 2006; STENGEL et al., 2007), TOC75, que constitui o poro de translocação (SCHNELL et al., 1994), e TOC12, localizado no espaço intermembranas onde forma um complexo com TOC64 e TIC22 (BECKER et al., 2004). O complexo TIC é constituído por 7 subunidades, TIC110, TIC62, TIC55, TIC40, TIC32, TIC22, e TIC20 (BENZ et al., 2008). A proteína mais abundante do complexo TIC é a TIC110, a qual forma o canal central de translocação (BALSERA et al., 2008). TIC62, TIC32, e TIC55 atuam como subunidades reguladoras da atividade redox, além disso, TIC55 é um membro das oxigenases CAO/PAO (CALIEBE et al., 1997). TIC32 e TIC62 pertencem à família das desidrogenases de cadeia curta (STENGEL et al., 2008).

O processo de importação de proteínas para o cloroplasto através dos complexos TOC e TIC é muito importante para a célula, entretanto, pode ocorrer a entrada de proteínas nos cloroplastos por vias alternativas. Muitas proteínas da membrana externa, incluindo a maioria das proteínas do complexo TOC não apresentam peptídeo de trânsito e se inserem na membrana externa espontaneamente (JARVIS, 2008).

Mudanças no desenvolvimento e nas condições ambientais das plantas levam a mudanças na regulação da importação de proteínas para os cloroplastos. A fosforilação dos peptídeos de trânsito no citosol influencia a taxa de importação de proteínas para esta organela (MARTIN et al., 2006). A regulação da importação de

proteínas do complexo TOC pode ser feita através da ligação de GTP/GDP (guanosina difosfato) e por inativação dos receptores através de fosforilação (BECKER et al., 2004), e a regulação do complexo TIC se dá por sinalização de Ca^{2+} (STENGEL et al., 2009).

2.9 Elementos regulatórios da transcrição

Os organismos vivos respondem a estímulos externos através da ativação ou inativação de genes em resposta a determinado estímulo. Para esta alteração é necessária a participação de fatores de transcrição ou elementos *trans acting*, que se ligam em regiões específicas do DNA, denominadas *cis acting regulatory elements* (CARE), coordenando a iniciação da transcrição (KORNBERG, 2007).

Os elementos *trans* reconhecem e se ligam a sequências específicas de DNA, influenciando o início da transcrição. São classificados de acordo com o domínio de ligação no DNA, onde fatores de transcrição que possuem estruturas de reconhecimento semelhantes pertencem à mesma família. Além destes fatores de transcrição, existem os fatores de transcrição coativadores ou corepressores, que não possuem o domínio de reconhecimento do DNA, mas se ligam a proteínas que o reconheçam. Os fatores de transcrição atuam sinergicamente, assim o nível de transcrição dependerá de quais fatores de transcrição estão ativos (ALBERTS et al., 2002).

Os elementos *cis* são motivos conservados curtos, de cinco a 20 nucleotídeos, encontrados na região promotora dos genes (ROMBAUTS et al., 2003), nos íntrons e próximos à região 3' (DORSETT, 1999). Elementos *cis* são interruptores moleculares envolvidos na regulação transcricional de uma rede dinâmica de genes que controlam vários processos biológicos, incluindo resposta a estresses abióticos, hormônios e processos de desenvolvimento (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI 2005).

A região promotora é dividida em duas partes, a região proximal e a região distal. Na região proximal ocorre o acoplamento do complexo da RNA polimerase II para direcionar a transcrição a níveis basais (BERK, 1999). A parte distal da região

promotora contém os elementos *cis* que regulam a expressão espaço temporal dos genes (FESSELE et al., 2002).

De acordo com a localização, os elementos *cis* são classificados em promotor mínimo (ligação da RNA polimerase II e fatores de transcrição gerais), elementos *cis* proximais (auxiliam a ligação da RNA polimerase II) e elementos *cis* independentes de distância (silenciadores, estimuladores e isoladores, que influenciam a taxa de transcrição) (MASTON et al., 2006).

A identificação de elementos *cis* em regiões promotoras de genes, com perfis de expressão diferencial sob determinadas condições de estresse, pode ser utilizada no entendimento da regulação das redes gênicas durante condições ambientais adversas.

2.10 Referências Bibliográficas

- ABOGADALLAH, G.M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling and Behavior**. v. 5, p. 369-374. 2010.
- AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; SAHI C.; GALLIE, D.R.; GROVER, A. *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. **Cell Stress and Chaperones**. v. 6, p. 219-224. 2001.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTE, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
- ALLEN, M.D.; YAMASAKI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TATENO, M.; SUZUKI, M. A novel mode of DNA recognition by a beta sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. **EMBO Journal**. v. 17, p. 5485-5496. 1998.
- ASHBURNER, M.; BONNER, J.J. The induction of gene activity in drosophila by heat shock. **Cell**. v. 17, p. 241-54. 1979.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L.A.C.J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review in Plant Biology**. v. 59, p. 313-339. 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L.A.C.J. Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 13, p. 489-494. 2010.

- BALSERA, M.; GOETZE, T.A.; KOVACS-BOGDAN, E.; SCHURMANN, P.; WAGNER, R.; BUCHANAN, B.B.; SOLL, J.; BOLTER, B. Characterization of TIC110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca^{2+} and a stromal regulatory disulfide bridge. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 30, p. 2603-2616. 2008.
- BAUTISTA, N.S.; SOLIS, R.; KAMIJIMA, O.; ISHII, T. RAPD, RFLP and SSLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice. **Genes and Genetic Systems**. v.76, p.71-79. 2001.
- BECHTOLD, U.; RICHARD, O.; ZAMBONI, A.; GAPPER, C.; GEISLER, M.; POGSON, B.; KARPINSKI, S.; MULLINEAUX, P.M. Impact of chloroplastic and extracellular sourced ROS on high light responsive gene expression in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 121-133. 2008.
- BECKER, T.; HRITZ, J.; VOGEL, M.; CALIEBE, A.; BUKAU, B.; SOLL, J.; SCHLEIFF, E. Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. **Molecular and Cellular Biology**. v. 15, p. 5130-5144. 2004.
- BENNETZEN, J.L.; FREELING, M. Grasses as a single genetic system: Genome composition, collinearity and compatibility. *Trends in Genetics*. v. 9, p. 259-261. 1993
- BENZ, P.; SOLL, J.; BÖLTER, B. Chloroplast protein import – The Tic complex: composition, function and regulation. **FEBS Journal**. v. 276, p.1166-1176. 2008.
- BERK, A.J. Activation of RNA polymerase II transcription. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 11, p. 330-335.1999.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K.K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**. v. 27, p. 411-424. 2008.
- BRAUN, H-P.; SCHMITZ, U.K. The protein-import apparatus of plant mitochondria. **Planta**. v. 209, p. 267-274. 1999.
- BRESOLIN, A.P.S. **Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**. 2010. 144p. Tese. (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

- BROCCHIERI, L.; KARLIN, S. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. **Protein Science**. v. 9, p. 476-486. 2000.
- BURTON, B.M.; BAKER, T.A. Remodeling protein complexes: insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase. **Protein Science**. v. 14, p. 1945-1954. 2005.
- CALIEBE, A.; GRIMM, R.; KAISER, G.; LUBECK, J.; SOLL, J.; HEINS, L. The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. **The EMBO Journal**. v. 16, p. 7342-7350. 1997.
- CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. S.; SILVA, S.A. **Condução de populações no melhoramento genético de plantas**. Editora e Gráfica Universitária - UFPel, 2003.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 01 dezembro 2011.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 02 abril 2012.
- CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**. 11:163. 2011.
- CRISOSTO, C.; MITCHELL, F.; JU, Z. Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. **HortScience**, v. 34, p. 1116-1118. 1999.
- DAS, B.; AHMED, N.; SINGH, P. *Prunus* diversity- early and present development: A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**. v. 3, p. 721-734. 2011.
- DEVOS, K. Updating the "Crop Circle." **Current Opinion in Plant Biology**. v.8, p.155-162. 2005.
- DÍAZ De LEON-SANCHEZ, F.C.; PELAYO-ZALDIVAR, F.; RIVERA-CABRERA, M.; PONCE-VALADEZ, X.; AVILA-ALEJANDRE, F.J.; FERNANDEZ, H.B.; ESCALONA-BUENDIA, PEREZ-FLORES, L.J. Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 54, p. 93-100. 2009.

- DORSETT, D. Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. **Current Opinion in Genetics and Development**. v. 9, p. 505-514. 1999.
- DUGARDEYN, J.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**. v. 175. p. 59-70. 2008.
- EFEUGLU, B. Heat shock proteins and heat shock response in plants. **Gazi University Journal of Science**. v. 2, p. 67-75. 2009.
- FALLIK, E.; POLEVAYA, Y.; TUVIA-ALKALAI, S.; SAHLOM, Y.; ZUCKERMAN, H. A 24h-anoxia treatment reduces decay development while maintaining tomato fruit quality. **Postharvest Biology and Technology**. v. 29, p. 233-236. 2003.
- FAO - *Food and Agriculture Organization* of the United Nations. Disponível em <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>. Acesso em 02 abril 2012.
- FAUST, M.; TIMON. B. Origin and dissemination of peach. **Horticultural Reviews**. v. 17, p. 331-379. 1995.
- FEDER, E.M.; HOFMAN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperons, and the stress response. **Annual Review of Physiology**. v. 61, p. 243-282. 1999.
- FESSELE, S., MAIER, H., ZISCHEK, C., NELSON, P.J., WERNER, T. Regulatory context is a crucial part of gene function. **Trends in Genetics**. v. 18, p. 60-63. 2002.
- FUJIMOTO, S.Y.; OHTA, M.; USUI, A.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. **The Plant Cell**. v. 12, p. 393-404. 2000.
- FUKAO, T; XU, K.; RONALD, PC.; BAILEY-SERRES, J. A Variable Cluster of Ethylene Response Factor–Like Genes Regulates Metabolic and Developmental Acclimation Responses to Submergence in Rice. **The Plant Cell**. v. 18, p. 2021-2034. 2006.
- FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 16814-16819. 2008.

- FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES, J. The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. **The Plant Cell**. v. 23, p. 412-427. 2011.
- GAO, S.; ZHANG, H.; TIAN, Y.; LI, F.; ZHANG, Z.; LU, X.; CHEN X.; HUANG, R. Expression of TERF1 in rice regulates expression of stress-responsive genes and enhances tolerance to drought and high-salinity. **Plant Cell Reports**. v. 27, p.1787-1795. 2008.
- GASSER, S.M.; DAUM, G.; SCHATZ, G. Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 257, p. 13034-13041. 1982.
- GHARBI, I.; RICARD, B.; ROLIN, D.; MAUCOURT, M.; ANDRIEU, M.H.; BIZID, E.; SMITI, S.; BROUQUISSE, R. Effect of hexokinase activity on tomato root metabolism during prolonged hypoxia. **Plant Cell and Environment**. v. 30, p. 508-517. 2007.
- GODA, H.; SASAKI, E.; AKIYAMA, K.; MARUYAMA-NAKASHITA, A.; NAKABAYASHI, K.; LI, W.; OGAWA, M.; YAMAUCHI, Y.; PRESTON, J.; AOKI, K.; KIBA, T.; TAKATSUTO, S.; FUJIOKA, S.; ASAMI, T.; NAKANO, T.; KATO, H.; MIZUNO, T.; SAKAKIBARA, H.; YAMAGUCHI, S.; NAMBARA, E.; KAMIYA, Y.; TAKAHASHI, H.; HIRAI, M.Y.; SAKURAI, T.; SHINOZAKI, K.; SAITO, K.; YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. **The Plant Journal**. v. 55, p. 526-542. 2008.
- GOLOUBINOFF, P.; MOGK, A.; ZVI, A.P.B.; TOMOYASU, T.B.; BUKAU, B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, p. 13732-13737. 1999.
- GONZÁLEZ-AGÜERO, M., PAVEZ, L., IBÁÑEZ, F., PACHECO, I., CAMPOS-VARGAS, R., MEISEL, L. A., ORELLANA, A., RETAMALES, J., SILVA, H., GONZÁLEZ, M., CAMBIAZO, V. Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 1973-1986, 2008.
- HO, L.C. The physiological basis for improving dry matter content and calcium status in tomato fruit. **Applied Agricultural Research**. v. 3, p. 275-281. 1988.

- HO, L.C. The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. **Journal of Experimental Botany**. v. 47, p. 275-281. 1996.
- HORCHANI, F.; STAMMITTI-BERT, L.; BALDET, P.; BROUQUISSE, R.; ROLIN, D.; ASCHI-SMITI, S.; RAYMOND, P.; GALLUSCI, P. Effect of prolonged root hypoxia on the antioxidant content of tomato fruit. **Plant Science**. v. 179, p. 209-218. 2010.
- HU W.; HU, G.; HAN, B. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. **Plant Science**. v. 176, p. 583-590. 2009.
- IRRI - The International Rice Research Institute. Disponível em <http://irri.org/>. Acesso em 02 de abril de 2012.
- JARVIS, P. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. **New Phytology**. v. 179, p. 257-285. 2008.
- KARABA, DIXIT, S.; GRECO, R.; AHARONI, A.; TRIJATMIKO, K.R.; MARSCH-MARTINEZ, N.; KRISHNAN, A.; NATARAJA, K.N.; UDAYAKUMAR M.; PEREIRA A. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.104, p.15270-15275. 2007.
- KENDE, H.; VAN DER KNAAP, E.; CHO, H.T. Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. **Plant Physiology**. v. 118, p. 1105-1110. 1998.
- KRISHNA, P.; GLOOR, G. The Hsp90 family of proteins in thaliana. **Cell Stress and Chaperones**. v. 6, p. 238-246. 2001.
- KORNBERG, R. D. The molecular basis os eukaryotic transcription. **Proceedings of the National Academy os Sciences**. v. 104, p. 12995-12961, 2007.
- LARA, M.V.; BUDDE, C.O.; PORRINI, L.; BORSANI, J.; MURRAY, R.; ANDREO, C.S.; DRINCOVICH, M.F. Peach (*Prunus Persica*) Fruit Response to Anoxia: Reversible Ripening Delay and Biochemical Changes. **Plant Cell Physiology**. v. 52, p. 392-403. 2011.
- LINARES, O.F. African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 99, p. 16360-16365. 2002.
- LEE, B. Filling the world's rice bowl. **International Rice Research Institute**. 1993.

- LI, H-Y.; CHANG, C-S.; LU, L-S.; LIU, C-A.; CHAN, M-T.; CHARNG, Y-Y. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor gene (*AtHsfA1b*) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 44, p. 129-140. 2003.
- LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T-Y.; SCHAALL, B, A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.103, p. 9578-9583. 2006.
- LURIE, S.; PESIS, E. Effect of acetaldehyde and anaerobiosis as postharvest treatments on the quality of peaches and nectarines. **Postharvest Biology and Technology**. v. 1, p. 317-326. 1992.
- MAIA, L.C. **Desenvolvimento de ferramenta e análise *in silico* da ocorrência de microssatélites (simple sequence repeat) no genoma do arroz**. 2007. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MARTIN, T.; SHARMA, R.; SIPPEL, C.; WAEGEMANN, K.; SOLL, J.; VOTHKNECHT, U.C. A protein kinase family in *Arabidopsis* phosphorylates chloroplast precursor proteins. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, p. 40216-40223. 2006.
- MASTON, G.A.; EVANS, S.K.; GREEN, M.R. transcriptional regulatory elements in the human genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 7, p. 29-59, 2006.
- MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C. A cultura do pessegueiro. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: **Embrapa-CPACT**, 251p. 1998.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN, B.F. ROS signaling: the new wave? **Trends Plant in Science**. v. 16, p. 300-309. 2011.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, p. 15-19, 2006.
- MITTAL, D.; CHAKRABARTI, S.; SARKAR, A.; SINGH, A.; GROVER, A. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in

- response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, p. 785-795. 2009.
- NAKAI, A. New aspects in the vertebrate heat stress factor system: HsfA3 and HsfA4. **Cell Stress Chaperones**. v. 4, p. 86-93. 1999.
- NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. **Plant Physiology**. v. 140, p. 411-432. 2006.
- NOVER, L.; SCHARF, K.D.; GAGLIARDI, D.; VERGNE, P.; CZARNECKA-VERNER, E.; GURLEY, W.B. The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. **Cell Stress Chaperones**. v. 1, p. 215-223. 1996.
- NOVER, L.; BHARTI, K.; DORING, P.; MISHRA, S.K.; GANGULI, A.; SCHARF, K.D. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress Chaperones**. v. 6, p. 177-189. 2001.
- OGAWA, D.; YAMAGUCHI, K.; NISHIUCHI, T. High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 3373-3383. 2007.
- OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **The Plant Cell**. v. 7, p. 173-182. 1995.
- PARSELL, D.A.; KOWAL, A.S.; SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Protein disaggregation mediated by heat stress protein 104. **Nature**. v. 372, p. 475-478. 1994.
- PASENTSIS, K.; FALARA, V.; PATERAKI, I.; GERASOPOULOS, D.; KANELLIS, A.K. Identification and expression profiling of low oxygen regulated genes from Citrus flavedo tissues using RT-PCR differential display. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 2203-2216. 2007.
- PEGORARO, C.; ZANUZO, M.R.; CHAVES, F.C.; BRACKMANN, A.; GIRARDI, C.L.; LUCCHETTA, L.; NORA, L.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C.V. Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 19-26, 2010.

- PETRI, J.L. **Dormência e indução da brotação de frutíferas de clima temperado.** Florianópolis: Epagri. 1996.
- PFANNER, N.; DOUGLAS, M.G.; ENDO, T.; HOOGENRAAD, N.J.; JENSEN, R.E.; MEIJER, M.; NEUPERT, W.; SCHATZ, G.; SCHMITZ, U.K.; SHORE, G.C. Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. **Trends in Biochemical Sciences.** v. 21, p. 51-52. 1996.
- POEHLMANN, J.M.; SLEPER, D.A. Breeding wheat. In: **Breeding field crops.** Ames: Iowa State University Press, p. 259-277. 1995.
- QBADOU, S.; BECKER, T.; MIRUS, O.; TEWS, I.; SOLL, J.; SCHLEIFF, E. The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. **The EMBO Journal.** v. 25, p. 1836-1847. 2006.
- QIU, X.B.; SHAO, Y.M.; MIAO, S.; WANG, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v. 63, p. 2560-2570. 2006.
- RAJAN, V.B.V.; D'SILVA, P. *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. **Functional and Integrative Genomics.** v. 9, p. 433-446. 2009.
- RICARD, B. ASCHI-SMITI, S. GHARBI, I. BROUQUISSE, R. Cellular and molecular mechanisms of plant tolerance to waterlogging, in: B. Huang (Ed.), *Plant-Environment Interactions*, Taylor and Francis, Boca Raton/London/New York, pp.177-208. 2006.
- RIECHMANN, J.L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O.J.; SAMAHA, R.R.; CREELMAN, R.; PILGRIM M.; BROUN, P.; ZHANG, J.Z.;GHANDEHA,RI D.; SHERMAN, B.K.; YU, G. *Arabidopsis* transcription factors: genome wide comparative analysis among eukaryotes. **Science.** v. 290, p. 2105-2110. 2000.
- RICK, C.M.; HOLLE, M. Andean *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme: genetic variation and its evolutionary significance. **Economic Botany.** v. 44, p. 69-78. 1990.
- ROMBAUTS, S., FLORQUIN, K., LESCOT, M., MARCHAL, K., ROUZE, P., PEER, Y.V. Computational Approaches to Identify Promoters and cis-Regulatory Elements in Plant Genomes. **Plant Physiology.** v. 132, p. 1162-1176. 2003.

- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 290, p. 998-1009. 2002.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A Involved in Drought-Responsive Gene Expression. **The Plant Cell**. v.18, p.1292-1309. 2006.
- SANMIYA, K.; SUZUKI, K.; EGAWA, Y.; SHONO, M. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. **FEBS Letters**. v. 557, p. 265-268. 2004.
- SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic stress response in plants. Physiological, biochemical and genetic perspectives**. 346p. 2011.
- SCHNELL, D.J.; KESSLER, F.; BLOBEL, G. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. **Science**. v. 266, p. 1007-1012. 1994.
- SCHULTHEISS, J.; KUNERT, O.; GASE, U.; SCHARF, K.D.; NOVER, L.; RUTERJANS, H. Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24. **European Journal Biochemistry**. v. 236, p. 911-921. 1996.
- SOUZA, C.A.F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.14, p.83-94, 2002
- STENGEL, A.; SOLL, J.; BOLTER, B. Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 388, p. 765-772. 2007.
- STENGEL, A.; BENZ, P.; BALSERA, M.; SOLL, J.; BOLTER, B. TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p. 6656-6667. 2008.
- STENGEL, A.; BENZ, P.; BUCHANAN, B.B.; SOLL, J.; BOLTER, B. Preprotein Import into Chloroplasts via the Toc and Tic Complexes Is Regulated by Redox Signals in *Pisum sativum*. **Molecular Plant**. v. 2, p. 1181-1197. 2009.

- SÜLE, A.; VANROBAEYS, F.; HAJÓS, G.; VAN BEEUMEN, J.; DEVREESE, B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. **Phytochemistry**. v. 65, p. 1853-1863. 2004.
- SUN, W.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1577, p. 1-9. 2002.
- VARSHNEY, R.K.; HOISINGTON, D.A.; TYAGI, A.K. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. **Trends in Biotechnology**. v.4, p.490-499. 2006.
- VAUGHAN, D.A., MORISHIMA, H., KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 6, p. 139-146. 2003.
- VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 579-620. 1991.
- VIZOSO, P.; MEISEL, L.A.; TITTARELLI, A.; LATORRE, M.; SABA, J.; CAROCA, R.; MALDONADO, J.; CAMBIAZO, V.; CAMPOS-VARGAS, R.; GONZALEZ, M.; ORELLANA, A.; SILVA, H. Comparative EST transcript profiling of peach fruits under different post-harvest conditions reveals candidate genes associated with peach fruit quality. **BMC Genomics**, 10:423, 2009.
- WANG, C.; ZHANG, Q.; SHOU, H. Identification and expression analysis of *OsHsfs* in rice. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**. v. 10, p. 291-300. 2009.
- WANG, W.; VINO CUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**. v. 9, p. 244-252. 2004.
- WU, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; WANG, X.C.; HUANG, R. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of Tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. **Plant Physiology**. v.148, p.1953-1963. 2008.
- WOODSON, J.D.; CHORY, J. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. **Nature Reviews Genetic**. v. 9, p. 383-395. 2008.
- XU, K.; XU, X.; FUKAO, T.; CANLAS, P.; MAGHIRANG-RODRIGUEZ, R.; HEUER, S.; ISMAIL, A.M.; BAILEY-SERRES, J.; RONALD, P.C.; MACKILL, D.J. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**. v. 442, p. 705-708. 2006.

YAMADA, K.; FUKAO, Y.; HAYASHI, M.; FUKAZAWA, M.; SUZUKI, I.; NISHIMURA, M. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 37794-37804. 2007.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stressresponsive promoters. **TRENDS in Plant Science**. v.10, p. 88-94. 2005.

ZHANG, X.; ZHANG, Z.; CHEN, J.; CHEN, Q.; WANG, XC.; HUANG, R. Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. **Planta**. v.222, p.494-501. 2005.

3 CAPÍTULO II

Regulação e perfil de expressão de genes *ERFs* em diferentes condições de estresse em arroz

Camila Pegoraro, Daniel da Rosa Farias, Liliane Marcia Mertz, Luciano Carlos da Maia, Cesar Valmor Rombaldi, Antonio Costa de Oliveira

Resumo: Estresses bióticos e abióticos causam grandes reduções na produtividade de plantas cultivadas. A resposta a estes estresses se dá por meio da indução de múltiplas rotas de sinalização, onde um grande número de genes é induzido ou reprimido. Dentre os genes de resposta a estresses ambientais destacam-se os genes da família *ERF*. Os níveis de mRNAs para os diferentes *ERFs* é regulado por diferentes hormônios e moléculas, produzidos em diferentes condições de estresse. Neste estudo, com o objetivo de identificar a resposta de genes *ERFs* frente a diferentes estresses ambientais em arroz, avaliou-se o perfil de expressão destes genes sob estresse por anoxia, sal e *Magnaporthe grisea*. Além disso, visando caracterizar a regulação de genes *ERFs*, identificaram-se elementos *cis* reguladores na região promotora e buscou-se relacionar a presença destes elementos com determinado perfil de expressão. Os resultados obtidos neste estudo indicam que alguns membros da família *ERF* apresentam expressão específica, enquanto que outros apresentam expressão comum entre os diferentes estresses ambientais, e dentro da família *ERF*, a regulação da expressão dos genes se dá de forma complexa para alguns genes e de forma simples para outros, demonstrando o alto nível de divergência funcional destes genes.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; fatores de transcrição; elementos *cis*; estresses bióticos e abióticos.

3.1 Introdução

Estresses bióticos e abióticos são fatores que afetam negativamente a produtividade das plantas cultivadas. Entretanto, durante a evolução as plantas desenvolveram mecanismos capazes de perceber as mudanças do ambiente e regular a indução ou repressão de uma variedade de genes. A maioria dos produtos destes genes faz parte de rotas metabólicas de resposta a estresse, fazendo com que a planta se adapte a condições ambientais adversas (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006).

Uma rede regulatória complexa está envolvida na indução de genes em resposta a estresses (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006), e um grande número destes genes foi identificado usando análises de microarranjos e ferramentas de proteômica diferencial em várias espécies de plantas. Na maioria dos casos, estes processos são coordenados por fitohormônios como etileno e ácido abscísico (FUJIMOTO et al., 2000).

Dentre os genes que estão relacionados à resposta e à tolerância a estresses ambientais, destacam-se os genes pertencentes à família *ERF* (*Ethylene Responsive Factors*). Apesar do nome, genes *ERFs*, além de serem regulados por etileno, respondem também a outras moléculas como ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmônico, ácido giberélico e à interação entre estes hormônios (SAKUMA et al, 2002). Genes *ERFs* são definidos pelo domínio AP2/ERF, que consiste de aproximadamente 60 aminoácidos e estão envolvidos na ligação ao DNA. O elemento *cis GCC-Box* (AGCCGCC) é reconhecido pela maioria dos membros da família ERF (OHME-TAKAGI e SHINSHI, 1995), entretanto, apesar da alta conservação da sequência de aminoácidos do domínio de ligação dos *ERFs*, estes podem ainda se ligar especificamente a outros motivos (NAKANO et al., 2006; SASAKI et al., 2007; WELSCH et al., 2007; MAEO et al., 2009).

Reguladores de transcrição pertencentes à família ERF têm envolvimento em muitos processos do desenvolvimento (ELLIOTT et al., 1996; BOUTILIER et al., 2002), respostas a estresses bióticos (YAMAMOTO et al., 1999) e também abióticos (STOCKINGER et al., 1997; LIU et al., 1999; XU et al., 2006). Recentemente, 122 e

139 genes *ERFs* foram identificados em *Arabidopsis* e arroz, respectivamente, revelando a conservação da família ERF em plantas (NAKANO et al., 2006).

A família ERF apresenta membros bastante conhecidos e caracterizados, com alta importância biológica e econômica, como os elementos DREBs (*dehydration responsive element binding*) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 1994), relacionados ao estresse por frio, seca e salinidade. A expressão constitutiva de *DREB1a* e *DREB1b* em plantas de *Arabidopsis* induziu a expressão de genes *COR* (*cold-regulated*) e aumentou a tolerância ao congelamento em plantas (GILMOUR et al., 2000; GILMOUR et al., 2004). Resultados similares foram observados para a ação constitutiva da proteína DREB2, sob condições de estresses por desidratação e alta salinidade (LIU et al., 1998; SAKUMA et al., 2006).

Além dos genes *DREB*, outros *ERFs* são muito importantes na natureza. Por exemplo, a introdução ou a superexpressão de diferentes genes *ERFs* resulta em aumento da tolerância aos estresses por hipoxia/anoxia (XU et al., 2006; LICAUSI et al., 2010) e seca (DUBOUZET et al., 2003). Em algumas variedades de arroz, o alelo *SUB1A-1* induz a regulação negativa da ação etileno, fazendo com que as plantas sejam capazes de sobreviver em condições de submersão completa por períodos prolongados (XU et al., 2006). Além de conferir tolerância à anoxia, o alelo *SUB1A-1* tem a capacidade de conferir tolerância ao estresse por seca e ao estresse por desubmersão (período de recuperação após o estresse por anoxia) em arroz. Essa capacidade é devida à redução da perda de água pelas folhas, diminuição da peroxidação de lipídios, indução de genes associados com aclimação à desidratação e à redução do conteúdo de espécies reativas de oxigênio dos tecidos aéreos durante a seca e a desubmersão (FUKAO et al., 2011). Similarmente, plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *HRE1* (gene pertencente ao mesmo grupo do *SUB1A*) mostraram aumento na tolerância à anoxia (LICAUSI et al., 2010). Embora a função de alguns genes *ERFs* esteja elucidada, a regulação da expressão da maioria dos genes desta família ainda não é conhecida. Devido à relativa elevada similaridade entre as sequências de *ERFs*, ainda há dificuldade para se estudar a expressão relativa de cada gene em diferentes estádios de desenvolvimento e frente a hormônios, elicitores e estresses.

A expressão gênica é amplamente controlada na fase de transcrição, onde a interação entre fatores de transcrição e elementos *cis* na região promotora de um gene desempenha um papel crucial (BRIVANLOU e DARNELL, 2002). Desta forma, a presença destes elementos pode determinar a resposta das plantas frente a condições de estresses, uma vez que atuam como reguladores de resposta. A identificação de elementos *cis* na região promotora de genes *ERFs* pode auxiliar no entendimento da regulação da transcrição destes genes sob diferentes condições de estresse. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo identificar elementos *cis* na região promotora de genes *ERFs* em arroz e identificar a relação da presença destes elementos com determinado perfil de expressão.

3.2 Material e Métodos

Perfil de expressão digital de genes *ERFs*

Membros da família ERF de arroz (*Oryza sativa* L.) foram identificados a partir de uma lista disponibilizada por Nakano et al. (2006). O perfil de expressão digital dos genes *ERFs* foi obtido usando ferramentas do programa *Genevestigator* (<http://www.genevestigator.ethz.ch>) (ZIMMERMANN et al., 2008) para diferentes condições de estresses bióticos e abióticos em plantas de arroz. Os estresses abióticos avaliados foram: (1) anoxia: coleótilos de plântulas Nipponbare germinadas a 28°C, no escuro, com menos de 10µg mL⁻¹ de O₂ comparados com coleótilos de plântulas Nipponbare germinadas a 28°C no escuro (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007); e, (2) sal: base de plântulas FL478 submetidas a NaCl e CaCl₂ (5:1) durante 3 dias comparadas com plantas FL478 com 30 dias não tratadas (WALIA et al., 2005). Avaliou-se, também, o acúmulo de transcritos de genes *ERFs* sob condições de estresse por *Magnaporthe grisea* três e quatro dias após a infecção (3 e 4dpi) (RIBOT et al., 2008).

Neste estudo, foram considerados induzidos os genes com expressão log₂ acima de 0.5 e reprimidos os genes com expressão log₂ abaixo de -0.5. A especificidade e sobreposição da expressão foram identificadas através da utilização de diagramas de Venn (OLIVEROS, 2007).

Identificação de elementos *cis* na região promotora de genes *ERFs*

A sequência correspondente à região promotora de cada membro da família *ERF* foi obtida no banco de dados *RAP-DB - The Rice Annotation Project* (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Neste estudo utilizaram-se sequências com 1000pb, recortadas antes da UTR 5'. A região promotora de cada gene foi submetida à análise para identificação de elementos *cis*.

A identificação destes elementos foi feita utilizando-se um programa desenvolvido por Maia et al. (Dados não publicados). Inicialmente o programa identificou os elementos *cis* conhecidos de acordo com o portal *PLACE - Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (HIGO et al., 1999). Posteriormente, para verificar se os elementos encontrados não estão presentes na região promotora ao acaso, uma análise estatística foi realizada, utilizando-se o teste Z. Para o cálculo do valor Z, foi calculada a diferença do número de ocorrência do motivo para cada região *upstream* dos genes (OP) pelo número de ocorrência no genoma (OG) e dividida pelo desvio padrão (DP), $Z=(OP-OG)/DP$. Deste modo, o cálculo de probabilidade (p) para cada motivo foi realizado da seguinte forma, $p = 1 - z$ (tabelado, a 5% de probabilidade). Os elementos que apresentaram valor de p igual ou inferior a 5% foram considerados como ocorrência não aleatória (ROMBAUTS et al., 2003). De acordo com o número de ocorrências de elementos *cis*, os *ERFs* foram classificados em genes de regulação complexa (ocorrência de elementos *cis* acima da média geral de ocorrências mais um desvio padrão), genes de regulação simples (ocorrência de elementos *cis* abaixo da média geral de ocorrências menos um desvio padrão) e genes de regulação normal (os genes que ficaram entre estes limites). Além disso, verificaram-se os elementos *cis* de maior ocorrência entre os genes.

Associação da expressão gênica com a presença de elementos *cis*

Visando relacionar a presença de determinado elemento *cis* com determinado perfil de expressão, os elementos significativos foram comparados com o perfil de expressão obtido em cada condição de estresse. Para esta comparação, os genes foram agrupados, quanto ao perfil de expressão, pelo método de Tocher, utilizando-se uma matriz gerada através da distância Euclidiana. Para esta análise de agrupamento utilizou-se o programa GENES (<http://www.ufv.br/dbg/genes/gdown1.htm>). Posteriormente verificou-se a presença de elementos *cis* comuns na região promotora de genes pertencentes ao mesmo grupo.

Expressão gênica de *ERFs* por qPCR

Para análise de expressão gênica, três experimentos foram conduzidos no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Para ambos os tratamentos plântulas de arroz da cultivar Nipponbare com 15 dias foram submetidas a diferentes estresses: (1) estresse por anoxia durante 0, 24, 48 e 72 horas, (2) estresse salino (150 mM NaCl) durante 0, 8, 16 e 24 horas, e (3) estresse biótico por *Magnaporthe grisea* (1.6×10^5 esporos.mL⁻¹) durante 0, 3 e 4 dias após a infecção (dpi).

O RNA total foi extraído a partir de 0.1 g de folhas (*M. grisea*) e raízes (sal e anoxia) de plântulas de arroz utilizando-se o reagente *Trizol* (InvitrogenTM), segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Para degradação de DNAs contaminantes, as amostras foram tratadas com *DNase I* (InvitrogenTM). A quantidade e qualidade do RNA total foram avaliadas por espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose. Cada amostra foi reversamente transcrita em cDNAs usando o kit comercial *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (InvitrogenTM), e a qualidade do cDNA foi confirmada por PCR usando oligonucleotídeos correspondentes ao gene da *Actina*.

Três genes *ERFs* foram selecionados aleatoriamente para avaliação em qPCR. Os iniciadores correspondentes aos genes estudados (tab. 1) foram desenhados a partir de sequências depositadas no banco de dados *RAP-DB* usando o programa Vector^{NTI} Advance 11 (InvitrogenTM). O critério utilizado para seleção dos iniciadores consistiu em tamanho de *amplicon* entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60%, e temperatura de anelamento entre 60 e 65°C, de acordo com as recomendações da Applied Biosystems[®].

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para análises de qPCR

Iniciadores	Senso	Antisenso
Os02g43790	5'TCACGCGCGCTCCTCAACTT3'	5'AGAAGAGCCGGAGCTCGCC3'
Os01g21120	5'AGGAGCTGCTCGCGTACGAGAA3'	5'AGCGACGGCAGCTCGTAGTCTT3'
Os09g11480	5'CATCCACGGCCACAAGGCAA3'	5'TCGTCGAGCAGGAAGCAGAACG3'
<i>ACTINA</i>	5'CAGCCACACTGTCCCCATCTA3'	5'AGCAAGGTCGAGACGAAGGA3'

Somente iniciadores que apresentaram curva de dissociação com pico único e eficiência de amplificação próxima a 100% foram utilizados neste estudo. As análises de qPCR foram realizadas em equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems[®]) usando corante *SYBR[®] Green* (InvitrogenTM). A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 20 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de três etapas (95°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min) e extensão final a 72°C por 5 min. A quantificação relativa da expressão de cada gene foi obtida conforme descrito por Pfaffl, (2001). Para cada gene analisado, o gene da *Actina* foi utilizado como normalizador, e o tempo zero de todos os experimentos foram utilizados como calibradores.

Similaridade entre as proteínas ERFs

Para identificar a similaridade entre as proteínas ERFs, as sequências de aminoácidos correspondente a cada gene estudado foram alinhadas no programa *Mega* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 5

(<http://www.megasoftware.net/>). Para gerar o dendograma utilizou-se a matriz PAM (*Point Accepted Mutation*) e *bootstrap* de 100 replicatas.

3.3 Resultados e Discussão

Identificação de genes *ERFs*

Os genes *ERFs* analisados neste estudo foram primeiramente descritos por Nakano et al. (2006), que identificaram 139 genes *ERFs* em arroz a partir do banco de dados TIGR (*MSU Rice Genome Annotation Project Team*). Dos 139 genes identificados, 114 apresentaram perfil de expressão a partir de dados de microarranjos depositados no programa *Genevestigator* (Fig. 1, tab. 2). Os estresses avaliados neste estudo foram anoxia, sal (abiótico) e *Magnaporthe grisea* (biótico). Os genes foram divididos em dois grupos para facilitar a visualização dos resultados. O primeiro grupo foi composto por 54 genes e o segundo grupo foi composto por 60 genes.

Tabela 2 - Genes *ERFs* identificados em arroz

Genes MSU TIGR				
Os04g44670	Os04g48330 ^a	Os06g08340	Os05g41780	Os02g43820
Os02g42580	Os03g02650	Os02g10760 ^a	Os01g58420	Os10g41330 ^f
Os03g09170	Os10g38000	Os02g55380 ^a	Os04g57340 ^a	Os04g46240 ^e
Os08g31580	Os09g35030	Os04g56150 ^a	Os04g52090	Os02g34260 ^a
Os02g51670	Os02g45450	Os12g39330	Os06g47590	Os01g64790 ^a
Os09g20350 ^c	Os06g03670	Os07g10410	Os05g41760	Os04g34970
Os06g11860	Os01g73770	Os07g38750	Os02g06330 ^d	Os04g32620
Os10g22600	Os08g43200 ^b	Os01g12440	Os02g09650 ^{af}	Os11g06770
Os05g49700 ^a	Os08g43210 ^b	Os01g46870	Os07g47330	Os12g07030
Os06g07030	Os04g48350	Os06g06540 ^e	Os02g38090	Os02g34270 ^{ad}
Os04g55520	Os09g35010 ^f	Os05g25260	Os08g07700	Os09g28440
Os03g15660	Os09g35020 ^a	Os07g12510	Os02g32040 ^a	Os02g52670
Os06g09690 ^{ad}	Os02g43940	Os03g60120	Os04g32790	Os08g36920
Os02g54050	Os04g46400	Os10g25170	Os03g64260	Os05g36100 ^c
Os08g35240 ^a	Os04g46440	Os03g08460	Os05g49010	Os08g42550
Os06g11940 ^e	Os02g43970	Os05g29810	Os05g37640 ^c	Os02g32140 ^a
Os06g09810 ^d	Os10g41130	Os03g08470	Os07g22770	Os01g04020
Os06g09790 ^d	Os04g46410	Os09g11480	Os09g39850	Os09g13940 ^a
Os06g09760 ^{ad}	Os06g36000	Os03g08500	Os03g05590	Os08g27220 ^b
Os06g10780 ^d	Os02g13710	Os07g42510	Os10g30840 ^{ad}	Os12g41030 ^{ad}
Os02g52880	Os01g10370	Os03g22170	Os08g44960 ^d	Os12g41040 ^d
Os06g09730 ^{ad}	Os01g07120	Os07g47790	Os09g39810	Os12g41060
Os01g66270 ^a	Os03g07830	Os01g21120	Os04g18650	Os06g42910
Os05g34730	Os05g27930	Os03g08490	Os07g22730	Os06g42990 ^e
Os11g13840 ^a	Os05g39590	Os02g54160	Os02g43790	Os08g41030
Os02g35240	Os08g45110	Os06g09390	Os01g54890	_{-ad}
Os04g36640 ^a	Os05g28350	Os09g26420	Os04g46220	_{-ad}
Os02g45420	Os06g40150	Os09g11460	Os04g46250	

^a Não apresentam informações no banco GENEVESTIGATOR.

^b Genes diferentes no MSU TIGR correspondem ao mesmo gene no RAP-DB.

^c Genes iguais no MSU TIGR correspondem a genes diferentes no RAP-DB.

^d Não tem gene correspondente no RAP-DB.

^e Não tem descrição e/ou erro de anotação/montagem no RAP-DB.

^f Não tem sequência de proteína no RAP-DB.

Perfil de expressão de genes *ERFs* sob condições de estresse

Estudos previos sugerem que o etileno atua em uma rota de sinalização complexa, composta por cascatas de fosforilação, redes de regulação transcricional e mudanças em mRNAs e proteínas. A interação do etileno com outras moléculas sinalizadoras vai determinar quais genes responsivos ao etileno serão ativados em determinada célula e em determinado período, resultando em diversidade de respostas observadas destes genes (STEPANOVA e ALONSO, 2009).

Ao analisar o perfil de expressão digital dos genes *ERFs* em arroz (Fig. 1) pode-se verificar que parte dos genes *ERFs* responde ao estresse por *M. grisea* três dias após infecção (3dpi). Nesta condição verificou-se a indução de 28 genes

(*LOC_Os02g43790*, *LOC_Os01g73770*, *LOC_Os08g36920*, *LOC_Os09g35010*, *LOC_Os03g09170*, *LOC_Os04g52090*, *LOC_Os06g03670*, *LOC_Os09g35030*, *LOC_Os02g45450*, *LOC_Os01g21120*, *LOC_Os04g46400*, *LOC_Os04g44670*, *LOC_Os09g11480*, *LOC_Os03g64260*, *LOC_Os03g08460*, *LOC_Os10g22600*, *LOC_Os01g07120*, *LOC_Os02g13710*, *LOC_Os05g41780*, *LOC_Os02g43940*, *LOC_Os09g26420*, *LOC_Os03g08490*, *LOC_Os04g46440*, *LOC_Os09g11460*, *LOC_Os06g11860*, *LOC_Os09g28440*, *LOC_Os03g15660* e *LOC_Os04g32620*), a repressão de dois genes (*LOC_Os08g44960* e *LOC_Os02g06330*), e nenhuma mudança foi detectada para os outros 84 genes.

Com relação ao segundo período de infecção 4dpi, os genes induzidos foram: *LOC_Os02g43790*, *LOC_Os03g09170*, *LOC_Os09g35010*, *LOC_Os09g28440*, *LOC_Os08g36920*, *LOC_Os04g52090*, *LOC_Os06g03670*, *LOC_Os01g73770*, *LOC_Os04g32620*, *LOC_Os05g34730*, *LOC_Os01g21120*, *LOC_Os12g07030*, *LOC_Os01g07120*, *LOC_Os11g06770*, *LOC_Os05g49010*, *LOC_Os04g44670*, *LOC_Os04g46400*, *LOC_Os06g07030*, *LOC_Os02g13710*, *LOC_Os02g43820*, *LOC_Os01g12440*, *LOC_Os02g43940*, *LOC_Os09g11460*, *LOC_Os02g45450*, *LOC_Os10g22600*, *LOC_Os02g54160*, *LOC_Os07g47790*, *LOC_Os04g46220*, *LOC_Os02g51670*, *LOC_Os09g35030*, *LOC_Os01g54890*, *LOC_Os06g11860*, *LOC_Os09g26420*, *LOC_Os08g43210*, *LOC_Os03g08490*, *LOC_Os03g64260*, *LOC_Os01g04020*, *LOC_Os05g41780*, *LOC_Os05g27930*, *LOC_Os04g34970*, *LOC_Os04g46440*, *LOC_Os03g08460*. Os genes reprimidos foram: *LOC_Os03g60120*, *LOC_Os05g37640*, *LOC_Os06g36000*, *LOC_Os05g41760*, *LOC_Os02g06330* e *LOC_Os09g11480*. Nos outros 66 genes nenhuma alteração no nível de expressão foi detectada.

A regulação diferencial de genes *ERFs* sob condições de estresse biótico observada neste estudo pode ser associada com a síntese de diferentes hormônios nesta condição, levando a uma sinalização cruzada, responsável pela indução e repressão de diferentes genes. Em condições de estresse biótico, além da síntese de etileno, hormônios como o ácido jasmônico, ácido abscísico, ácido salicílico e brassinosteróides também são sintetizados (FORCAT et al., 2008). Além disso, diferentes moléculas sinalizadoras (hormônios e ROS - espécies reativas de O₂) atuam na indução da cascata de sinalização das MAP quinases (*Mitogen-activated*

protein kinases - MAPK), que podem atuar na fosforilação de diferentes proteínas envolvidas na rota de sinalização do etileno, levando a um amplo e complexo módulo de regulação (STEPANOVA e ALONSO, 2009).

O estresse por anoxia causou a indução de 22 genes (*LOC_Os03g08460*, *LOC_Os08g43210*, *LOC_Os07g47790*, *LOC_Os03g22170*, *LOC_Os01g21120*, *LOC_Os08g42550*, *LOC_Os07g12510*, *LOC_Os04g46250*, *LOC_Os05g29810*, *LOC_Os04g46240*, *LOC_Os05g36100*, *LOC_Os01g04020*, *LOC_Os05g37640*, *LOC_Os01g12440*, *LOC_Os06g07030*, *LOC_Os03g15660*, *LOC_Os02g42580*, *LOC_Os04g44670*, *LOC_Os04g46220*, *LOC_Os03g60120*, *LOC_Os12g07030* e *LOC_Os08g43200*) e a repressão de 58 genes (*LOC_Os06g06540*, *LOC_Os02g38090*, *LOC_Os03g07830*, *LOC_Os02g43940*, *LOC_Os06g42910*, *LOC_Os10g38000*, *LOC_Os12g41040*, *LOC_Os05g28350*, *LOC_Os10g41330*, *LOC_Os08g27220*, *LOC_Os06g11940*, *LOC_Os04g46440*, *LOC_Os10g22600*, *LOC_Os06g10780*, *LOC_Os08g41030*, *LOC_Os01g54890*, *LOC_Os08g35240*, *LOC_Os10g25170*, *LOC_Os06g36000*, *LOC_Os04g52090*, *LOC_Os01g58420*, *LOC_Os09g39810*, *LOC_Os12g41060*, *LOC_Os05g34730*, *LOC_Os09g11480*, *LOC_Os08g44960*, *LOC_Os05g41780*, *LOC_Os09g20350*, *LOC_Os04g48350*, *LOC_Os09g35010*, *LOC_Os03g09170*, *LOC_Os02g06330*, *LOC_Os06g08340*, *LOC_Os05g41760*, *LOC_Os10g41130*, *LOC_Os09g39850*, *LOC_Os02g13710*, *LOC_Os02g54050*, *LOC_Os02g54160*, *LOC_Os09g26420*, *LOC_Os04g46410*, *LOC_Os02g45420*, *LOC_Os06g09390*, *LOC_Os02g45450*, *LOC_Os09g28440*, *LOC_Os02g43970*, *LOC_Os07g22730*, *LOC_Os03g64260*, *LOC_Os02g52670*, *LOC_Os04g46400*, *LOC_Os09g11460*, *LOC_Os03g08500*, *LOC_Os06g03670*, *LOC_Os09g35030*, *LOC_Os03g08470*, *LOC_Os01g73770*, *LOC_Os08g36920* e *LOC_Os03g08490*). Nos demais genes não foram observadas mudanças no perfil de expressão (Fig. 1).

Sob condições de falta total de O₂ não há produção de etileno (DAT et al., 2004), desta forma a indução de genes *ERFs* sob condições de anoxia observada neste estudo é atribuída a outras moléculas sinalizadoras. Dentre os possíveis sinalizadores para indução de *ERFs* estão as ROS (WU et al., 2008) formadas sob condições de anoxia (CRAMER et al., 2011). A repressão de um grande número de *ERFs* pode estar associada com a inibição da produção de etileno nestas condições.

O estresse salino foi o estresse que teve menor efeito na regulação dos genes *ERFs* analisados (Fig. 1). Nenhum gene foi induzido, somente 8 foram reprimidos (*LOC_Os02g13710*, *LOC_Os09g11460*, *LOC_Os01g73770*, *LOC_Os04g48350*, *LOC_Os04g52090*, *LOC_Os04g46220*, *LOC_Os08g36920* e *LOC_Os02g43790*), e nenhuma mudança foi observada na expressão de 106 genes. Além da produção de etileno, sob condições de estresse por salinidade, ocorre também a produção de ácido abscísico (ZHANG et al., 2006) e ROS (ABOGADALLAH, 2010), porém, neste caso, estas moléculas parecem não ter efeito na regulação de genes *ERFs*.

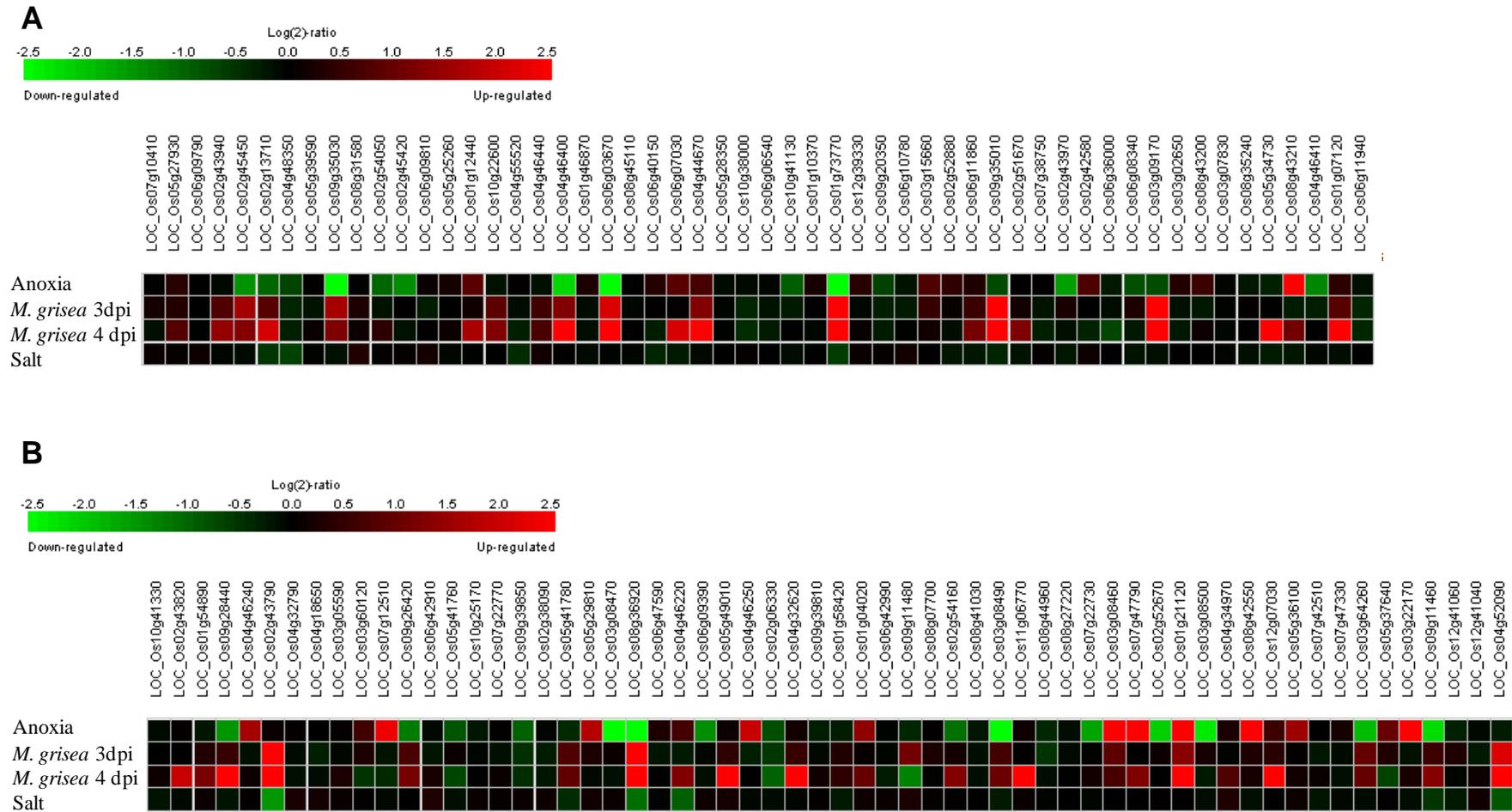


Figura 1 - Perfil de expressão de genes *ERFs* em plantas de arroz submetidas a diferentes estresses. O perfil de expressão é apresentado como heat map, gerado pelo programa *Genevestigator*. A: grupo1; B: grupo 2.

Os diagramas de Venn obtidos demonstram a presença de sobreposição de regulação de alguns genes *ERFs* responsivos aos estresses estudados (Fig. 2). Quando se compara os genes induzidos nos diferentes tempos de infecção por *M. grisea* verifica-se a sobreposição de expressão de 23 genes (*LOC_Os02g43790*, *LOC_Os01g73770*, *LOC_Os08g36920*, *LOC_Os09g35010*, *LOC_Os03g09170*, *LOC_Os04g52090*, *LOC_Os06g03670*, *LOC_Os09g35030*, *LOC_Os02g45450*, *LOC_Os04g46400*, *LOC_Os03g64260*, *LOC_Os10g22600*, *LOC_Os01g07120*, *LOC_Os02g13710*, *LOC_Os05g41780*, *LOC_Os02g43940*, *LOC_Os09g26420*, *LOC_Os03g08490*, *LOC_Os04g46440*, *LOC_Os09g11460*, *LOC_Os06g11860*, *LOC_Os09g28440* e *LOC_Os04g32620*). Este resultado já era esperado, uma vez que o estresse é o mesmo, mudando somente o período de exposição. Os estresses por anoxia e *M. grisea* 3 dpi e *M. grisea* 4 dpi causaram a indução de três genes em comum (*LOC_Os01g21120*, *LOC_Os04g44670* e *LOC_Os03g08460*), os quais estão relacionados com patogenicidade, revelando a sobreposição de expressão entre estresses bióticos e abióticos. Os estresses por anoxia e *M. grisea* 3 dpi causaram a indução de um gene em comum (*LOC_Os03g15660*). Os estresses por anoxia e *M. grisea* 4 dpi causaram a indução de 7 genes em comum (*LOC_Os12g07030*, *LOC_Os06g07030*, *LOC_Os01g12440*, *LOC_Os07g47790*, *LOC_Os04g46220*, *LOC_Os08g43210* e *LOC_Os01g04020*) (Fig. 2A). Estes resultados demonstram a presença de um mecanismo de resposta similar de alguns genes entre estresse biótico e abiótico em arroz.

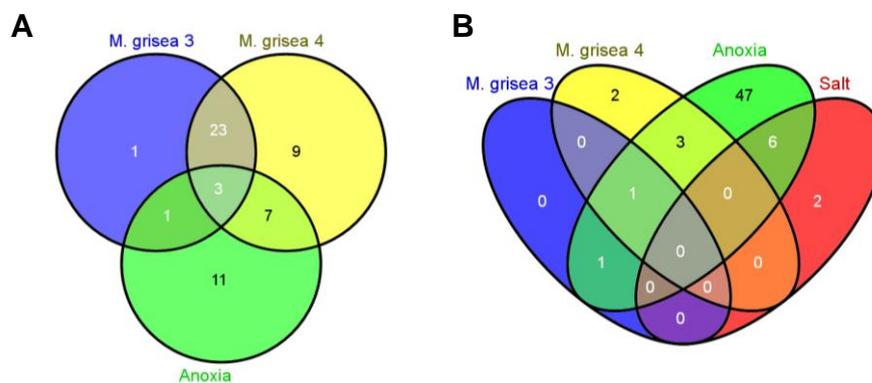


Figura 2 - Especificidade de expressão para genes induzidos (A) e reprimidos (B). Os diagramas foram gerados utilizando-se o programa Venny.

Para os genes reprimidos verificou-se que em condições de estresse por sal e anoxia houve regulação de 6 genes em comum (*LOC_Os04g52090*, *LOC_Os04g48350*, *LOC_Os02g13710*, *LOC_Os09g11460*, *LOC_Os01g73770* e *LOC_Os08g36920*). Quando se comparou os estresses por anoxia e *M. grisea* 3 dpi observou-se a repressão de um gene em comum (*LOC_Os08g44960*), e quando se comparou os estresses por anoxia e *M. grisea* 4 dpi verificaram-se três genes comumente regulados (*LOC_Os06g36000*, *LOC_Os05g41760* e *LOC_Os09g11480*). Finalmente, ao se comparar os estresses por anoxia, *M. grisea* 3 dpi e *M. grisea* 4 dpi observou-se a repressão de um gene em comum (*LOC_Os02g06330*) (Fig. 2B).

A sobreposição de expressão de genes entre diferentes estresses já tem sido descrita por Fujita et al. (2006). No caso da família ERF esta sobreposição de expressão entre os membros pode ser explicada pelo fato que alguns genes *ERFs* podem ser regulados por diferentes moléculas, como o etileno, metil jasmonato, ácido salicílico e ácido abscísico, os quais são sintetizados em diferentes condições de estresse ambiental (DIVI et al., 2010). A sobreposição de expressão de *ERFs* leva a hipótese de que estes genes atuam como conectores de ligação de diferentes rotas de sinalização que mediam respostas a estresse biótico e abiótico.

A partir dos dados expressão, os genes *ERFs* foram agrupados de acordo com a similaridade de resposta em cada condição de estresse. Sob condições de anoxia, os genes *ERFs* foram divididos em 8 grupos, em condições de estresse salino os genes foram divididos em 3 grupos e sob condições de *M. grisea* formaram-se 6 grupos (tab. 3).

Tabela 3 - Grupos gênicos formados de acordo com o perfil de expressão de genes *ERFs* sob diferentes condições de estresse

Estresse	Grupo	Genes
Anoxia	1	Demais genes
	2	<i>LOC_Os06g09390</i> , <i>LOC_Os02g45420</i> , <i>LOC_Os02g45450</i> , <i>LOC_Os09g28440</i> , <i>LOC_Os04g46410</i> , <i>LOC_Os02g43970</i> , <i>LOC_Os07g22730</i> , <i>LOC_Os09g26420</i> , <i>LOC_Os02g54160</i> , <i>LOC_Os03g64260</i> , <i>LOC_Os02g52670</i> , <i>LOC_Os04g46400</i> , <i>LOC_Os09g11460</i> , <i>LOC_Os03g08500</i> , <i>LOC_Os06g03670</i>
	3	<i>LOC_Os04g46240</i> , <i>LOC_Os05g36100</i> , <i>LOC_Os01g04020</i> , <i>LOC_Os05g29810</i> , <i>LOC_Os04g46250</i> , <i>LOC_Os05g37640</i> , <i>LOC_Os07g12510</i> , <i>LOC_Os08g42550</i>
	4	<i>LOC_Os03g08470</i> , <i>LOC_Os09g35030</i>
	5	<i>LOC_Os01g21120</i> , <i>LOC_Os03g22170</i> , <i>LOC_Os07g47790</i> , <i>LOC_Os08g43210</i>
	6	<i>LOC_Os08g36920</i> , <i>LOC_Os01g73770</i>
	7	<i>LOC_Os03g08490</i>
	8	<i>LOC_Os03g08460</i>
Sal	1	Demais genes
	2	<i>LOC_Os02g13710</i> , <i>LOC_Os09g11460</i> , <i>LOC_Os01g73770</i> , <i>LOC_Os04g48350</i> , <i>LOC_Os04g52090</i> , <i>LOC_Os04g46220</i>
	3	<i>LOC_Os02g43790</i> , <i>LOC_Os08g36920</i>
<i>M.grisea</i>	1	Demais genes
	2	<i>LOC_Os04g46400</i> , <i>LOC_Os04g44670</i> , <i>LOC_Os01g21120</i> , <i>LOC_Os01g07120</i> , <i>LOC_Os02g13710</i> , <i>LOC_Os05g49010</i> , <i>LOC_Os12g07030</i> , <i>LOC_Os04g32620</i> , <i>LOC_Os09g28440</i> , <i>LOC_Os11g06770</i> , <i>LOC_Os05g34730</i>
	3	<i>LOC_Os02g45450</i> , <i>LOC_Os09g35030</i>
	4	<i>LOC_Os06g03670</i> , <i>LOC_Os04g52090</i> , <i>LOC_Os09g35010</i> , <i>LOC_Os03g09170</i> , <i>LOC_Os08g36920</i> , <i>LOC_Os01g73770</i>
	5	<i>LOC_Os02g43790</i>
	6	<i>LOC_Os09g11480</i>

Identificação de elementos *cis* em regiões promotoras de genes *ERFs*

O controle da expressão de genes de resposta a estresses é determinante para o mecanismo de resposta das plantas frente a estresses bióticos e abióticos. Muitos estudos vêm sendo realizados visando a identificação de elementos *cis* reguladores, os quais tem importância crucial na regulação da transcrição (WALLEY et al., 2007; MITTAL et al., 2009; ZOU et al., 2011). Entretanto, para a família *ERF* em arroz, poucos estudos relacionados à identificação de elementos *cis* foram realizados (JUNG et al., 2010).

Dos 139 genes *ERFs* preditos por Nakano et al. (2006), 115 (tab. 1) foram utilizados para obtenção de promotores e identificação de elementos *cis*. Os demais

genes (24) apresentaram problemas de anotação e/ou não foram identificados no *RAP-DB* (tab. 2).

Nos 115 promotores identificaram-se 250 diferentes elementos *cis* significativos ($p \leq 5\%$), com uma ocorrência de pelo menos um por gene. Dentre os promotores analisados verificou-se uma média de ocorrências de 33 vezes, e um desvio padrão de 16, assim foram considerados genes de regulação complexa os que apresentaram um número de ocorrência acima de 49, genes de regulação simples os que apresentaram número de ocorrência abaixo de 17 e os genes que apresentaram número de ocorrências de 18 a 48 foram considerados genes de regulação normal. De acordo com a tab. 4, verifica-se a presença de 17 genes de regulação complexa e 23 genes de regulação simples. Sugere-se que para a indução de genes de regulação simples, uma menor interação de fatores de transcrição com elementos *cis* é necessária, enquanto que para a ativação de genes de regulação complexa, uma maior interação entre estes fatores é requerida.

Tabela 4 - Número de ocorrências de elementos *cis* em promotores de genes considerados com regulação complexa e com regulação simples

Regulação complexa	Nºcis	Ocorrência	Regulação simples	Nº cis	Ocorrência
<i>LOC_Os05g49700</i>	20	81	<i>LOC_Os03g15660</i>	6	17
<i>LOC_Os12g07030</i>	24	78	<i>LOC_Os06g11860</i>	12	17
<i>LOC_Os08g07700</i>	25	76	<i>LOC_Os01g10370</i>	11	16
<i>LOC_Os06g36000</i>	18	65	<i>LOC_Os02g43820</i>	12	16
<i>LOC_Os02g09650</i>	12	63	<i>LOC_Os02g45420</i>	9	16
<i>LOC_Os06g09390</i>	18	61	<i>LOC_Os05g41780</i>	10	16
<i>LOC_Os06g42910</i>	14	59	<i>LOC_Os01g58420</i>	11	15
<i>LOC_Os08g31580</i>	26	58	<i>LOC_Os04g36640</i>	8	15
<i>LOC_Os02g32040</i>	19	56	<i>LOC_Os04g48330</i>	8	15
<i>LOC_Os01g21120</i>	22	54	<i>LOC_Os01g73770</i>	10	14
<i>LOC_Os04g32790</i>	18	54	<i>LOC_Os02g34260</i>	8	14
<i>LOC_Os06g40150</i>	14	54	<i>LOC_Os02g43940</i>	10	14
<i>LOC_Os09g11460</i>	13	52	<i>LOC_Os05g34730</i>	10	14
<i>LOC_Os02g13710</i>	10	51	<i>LOC_Os09g13940</i>	8	14
<i>LOC_Os05g27930</i>	23	50	<i>LOC_Os01g07120</i>	11	12
<i>LOC_Os04g46250</i>	16	49	<i>LOC_Os03g02650</i>	8	12
<i>LOC_Os09g35030</i>	19	49	<i>LOC_Os04g46220</i>	9	12
			<i>LOC_Os02g54050</i>	9	11
			<i>LOC_Os05g28350</i>	7	11
			<i>LOC_Os01g46870</i>	5	10
			<i>LOC_Os02g52880</i>	7	10
			<i>LOC_Os04g32620</i>	8	9
			<i>LOC_Os02g42580</i>	3	7

Tabela 5 - Número de ocorrências dos elementos *cis* significativos dentro da família ERF

Elemento <i>cis</i>	Ocorrências	Elemento <i>cis</i>	Ocorrências
ABREOSRAB21	20	MYBPZM	29
ARR1AT	20	IBOXCORE	30
INRNTPSADB	20	RAV1AAT	30
MYCATRD22	20	WBOXATNPR1	30
NAPINMOTIFBN	20	WRKY71OS	30
RYREPEATVFLEB4	20	RYREPEATGMGY2	33
TATABOX3	20	REALPHALGLHCB21	34
ARFAT	21	PRECONSCRHSP70A	36
POLLEN1LELAT52	21	RYREPEATLEGUMINBOX	36
WBOXHVISO1	21	ACGTABOX	38
-300ELEMENT	22	SORLIP1AT	41
BOXCPSAS1	22	GTGANTG10	44
CARGCW8GAT	22	POLASIG1	44
GT1CORE	22	BIHD1OS	47
NODCON1GM	22	RYREPEATBNNAPA	47
OSE1ROOTNODULE	22	CCAATBOX1	49
SEF4MOTIFGM7S	22	ABRERATCAL	50
ECCRCAH1	23	CURECORECR	52
HEXAMERATH4	23	GCCCORE	52
RBCSCONSENSUS	23	CGACGOSAMY3	54
WBOXNTERF3	23	RHERPATEXPA7	54
CACGTGMOTIF	24	EBOXBNNAPA	60
ABRELATERD1	25	MYCCONSENSUSAT	60
ACGTABREMOTIFA2OSEM	25	GATABOX	66
DPBFCOREDCCDC3	25	GT1CONSENSUS	67
HEXMOTIFTAH3H4	26	CAATBOX1	70
ROOTMOTIFTAPOX1	27	LTRECOREATCOR15	81
TAAAGSTKST1	27	DOFCOREZM	85
SORLIP2AT	28	ACGTATERD1	108
GT1GMSCAM4	29	CACTFTPPCA1	127
MYB1AT	29	CGCGBOXAT	159

Neste estudo observaram-se elementos *cis* com diferentes números de ocorrência dentro da família ERF, variando de uma a 159 ocorrências. Os elementos *cis* que apresentaram número de ocorrências acima de 20 são apresentados na tab. 5.

O elemento *cis* que apresentou maior ocorrência (159) dentre os genes *ERFs* foi o CGCGBOXAT (A/C/G)CGCG(G/T/C), o qual é clássico de promotores de genes envolvidos na sinalização por etileno, sinalização por ácido abscísico e percepção

de luz (YANG e POOVAIAH, 2002). O segundo elemento *cis* de maior ocorrência (127) foi o CACTFTPPCA1 (CACT), o qual está presente no promotor da isoforma C4 da fosfoenolpiruvato carboxilase (GOWIJK et al., 2004). O elemento *cis* ACGTATERD1 (ACGT) requerido para indução do estiolamento (SIMPSON et al., 2003) foi o terceiro elemento de maior ocorrência (108).

Associação de elementos *cis* com perfil de expressão de genes *ERFs* sob diferentes condições de estresse

Ao analisar os elementos *cis* presentes na região promotora dos três genes induzidos nos estresses por anoxia e *M. grisea* observou-se que não há elementos *cis* comuns nos três promotores. Nos 7 genes comumente induzidos nos estresses por anoxia e *M. grisea* 4 dpi também não foram verificados nenhum elemento *cis* comum na região promotora destes genes (Fig. 2A). Para os três genes comumente reprimidos no estresses por anoxia e *M. grisea* 4 dpi não se verificou elementos *cis* comuns na região promotora. Também não foi verificado elementos *cis* comuns nos 6 genes reprimidos nos estresses por sal e anoxia (Fig. 2B). Estes resultados demonstram a divergência na regulação gênica existente na família ERF.

Ao se analisar os grupos formados por similaridade de expressão dentro de cada estresse, observou-se que, no estresse por anoxia, os promotores dos genes pertencentes ao grupo 4 apresentaram quatro elementos *cis* em comum, REALPHALGLHCB21: AACCAA, HEXMOTIFTAH3H4: ACGTCA, TATAPVTRNALEU: TTTATATA e ACGTABOX: TACGTA (tab. 6). Estes elementos também aparecem em outros promotores, porém de forma separada, sugerindo que a regulação da expressão observada para os genes *LOC_Os03g08470* e *LOC_Os09g35030* sob condições de anoxia se dá através da combinação destes quatro elementos no mesmo promotor.

Ainda em condições de anoxia, promotores dos genes pertencentes ao grupo 6 apresentaram um elemento *cis* em comum, o CACGTGMOTIF: CACGTG. Isto é um indicativo que o perfil de expressão dos genes *LOC_Os08g36920* e *LOC_Os01g73770* observado sob condições de anoxia é dependente da combinação deste elemento com outros elementos presentes nestes promotores.

Sob condições de estresse salino foram formados três grupos de genes *ERFs*, porém não foram encontrados elementos *cis* comuns entre os genes de cada grupo (tab. 6).

No estresse por *M. grisea*, verificou-se a presença de dois elementos *cis* comuns (TATAPVTRNALEU: TTTATATA e RBCSCONSENSUS: AATCCAA) entre os genes pertencentes ao grupo 3 (tab. 6). Estes resultados sugerem que a interação de fatores de transcrição com estes dois elementos *cis* são responsáveis pela regulação da expressão observada nos genes *LOC_Os02g45450* e *LOC_Os09g35030* sob condições de estresse por *M. grisea*.

Tabela 6 - Elementos *cis* comuns entre os grupos gênicos formados de acordo com o perfil de expressão

Estresse	Grupo	Elemento <i>cis</i> comuns
Anoxia	4	REALPHALGLHCB21; HEXMOTIFTAH3H4; TATAPVTRNALEU; ACGTABOX
	6	CACGTGMOTIF
Sal	-	-
<i>M. grisea</i>	3	TATAPVTRNALEU; RBCSCONSENSUS

Expressão gênica de *ERFs* em arroz por pPCR

Neste estudo, a expressão quantitativa de três dos 139 genes *ERFs* foi avaliada nos três estresses (sal, anoxia e *M. grisea*) (Fig. 3). O gene *LOC_Os09g11480* (*EREBP 5*) exibiu um aumento nos níveis de transcritos conforme aumentou o tempo de exposição das plantas ao estresse por sal, exceto nas 16 horas, quando uma diminuição da expressão foi observada. Os genes *LOC_Os01g21120* (*EREBP 3*) e *LOC_Os02g43790* (*ERF 91*) apresentaram um decréscimo na expressão ao longo do tempo sob condições de estresse por sal, porém após 24 horas houve um leve aumento de expressão.

Sob condições de estresse por anoxia, o gene *LOC_Os09g11480* apresentou um aumento linear nos níveis de transcritos ao longo do tempo. É interessante ressaltar que este gene apresentou um aumento nos níveis de transcritos de aproximadamente 600 vezes. Os genes *LOC_Os01g21120* e *LOC_Os02g43790* apresentaram comportamento similar sob condições de ausência de O₂, exibindo um

decréscimo de expressão nas primeiras horas, seguindo de um incremento após 72 horas de estresse.

O gene *LOC_Os09g11480* foi tardiamente induzido em condições de infecção por *M. grisea*, não apresentando nenhuma alteração na expressão nos primeiros 3dpi e um aumento nos níveis de transcritos de aproximadamente 100 vezes 4dpi. O gene *LOC_Os01g21120* apresentou um aumento linear ao longo do período de infecção. Diferentemente do gene *LOC_Os09g11480*, o gene *LOC_Os02g43790* apresentou uma indução mais precoce, com um aumento de expressão de aproximadamente 80 vezes aos 3dpi, seguido de um decréscimo de expressão aos 4dpi.

Similarmente ao que já foi mencionado, o aumento de expressão dos genes *ERFs* observado em condições de anoxia não se deve à sinalização por etileno, mas sim a outras moléculas, como as ROS. Nos outros estresses (sal e *M. grisea*), a indução nos níveis de transcritos pode ser associada com a sinalização cruzada de diferentes hormônios sintetizados nestas condições.

Quando se comparam os dados obtidos por microarranjos (Fig. 1) com os dados obtidos por qPCR (Fig. 4) verifica-se algumas diferenças no perfil de expressão. Os genes *LOC_Os01g21120* e *LOC_Os02g43790* mostraram comportamento similar em ambas as técnicas, entretanto, o gene *LOC_Os09g11480* apresentou comportamento contrastante. Este comportamento é frequentemente observado e, por isso, além dos estudos de transcritômica de alta vazão associadas à bioinformática, é importante que se valide estes resultados por técnicas mais precisas e pontuais, além de ensaios biológicos.

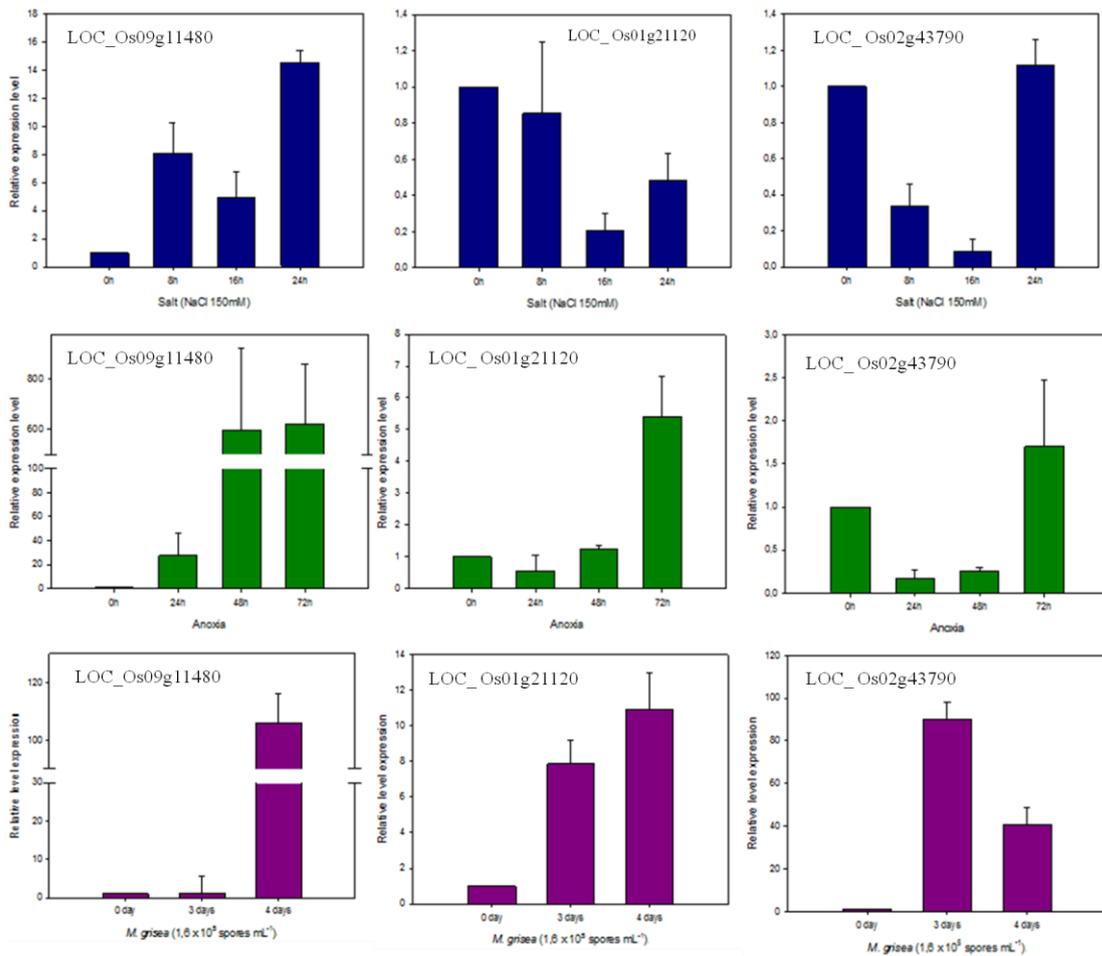


Figura 3 - Acúmulo de transcritos de genes *ERFs* em arroz da cultivar Nipponbare em diferentes condições de estresses (sal, anoxia, e *Magnaporthe grisea*). *Relative Level Expression*: Nível de Expressão Relativa; *Salt*: sal; *Days*: dias.

Similaridade entre as proteínas *ERFs*

A análise de filogenia indica que há pouca similaridade entre as sequências de aminoácidos das proteínas *ERFs* (Fig. 4). Esta divergência pode ser explicada pelo acúmulo de modificação nas sequências, que aconteceu desde antes da divergência das monocotiledôneas e dicotiledôneas (NAKANO et al., 2006). Além disso, é sabido que os genes da família *ERF* foram agrupados pela presença do domínio AP2/*ERF* (NAKANO et al., 2006), que compreende aproximadamente 60 aminoácidos, o restante da sequência, na maioria das vezes, apresenta pouca ou nenhuma similaridade.

Considerando um valor de *bootstrap* maior ou igual a 70, verificou-se a formação de um grupo com cinco proteínas, um grupo com três proteínas e 10 grupos com duas proteínas cada, as demais proteínas aparecem em ramos isolados. O maior grupo é formado pelas proteínas LOC_Os09g35020, LOC_Os09g35030, LOC_Os06g03670, LOC_Os02g45450 e LOC_Os04g48350, as quais correspondem às proteínas DREB. O segundo maior grupo é formado pelas proteínas LOC_Os09g26420, LOC_Os02g54160 e LOC_Os06g09390 (proteínas EREBP). Os demais grupos são formados pelas proteínas LOC_Os04g55520 e LOC_Os06g07030, LOC_Os09g11460 e LOC_Os09g11480, LOC_Os03g22170 e LOC_Os07g47790, LOC_Os07g10410 e LOC_Os07g38750 (relacionadas à patogenicidade), LOC_Os01g12440 e LOC_Os01g46870, LOC_Os02g32040 e LOC_Os04g32790, LOC_Os01g58420 e LOC_Os05g41780, LOC_Os02g43790 e LOC_Os04g46220, LOC_Os03g60120 e LOC_Os07g12510, LOC_Os02g35240 e LOC_Os11g13840. Sugere-se que as proteínas dentro de cada grupo sejam evolutivamente mais próximas do que as demais.

Quatro dos genes pertencentes ao maior grupo apresentam perfil de expressão no *Genevestigator*, e destes, três (*LOC_Os09g35030*, *LOC_Os06g03670* e *LOC_Os02g45450*) apresentam a mesma resposta frente aos estresses testados. No segundo maior grupo, dois genes (*LOC_Os09g26420* e *LOC_Os02g54160*) apresentam perfil de expressão muito parecido sob as condições de estresse estudadas. Para os demais grupos observou-se que somente os genes *LOC_Os03g22170* e *LOC_Os07g47790*, *LOC_Os01g58420* e *LOC_Os05g41780* apresentam perfis de expressão semelhantes entre si sob os estresses analisados (Fig. 1). A semelhança de expressão entre os genes com sequências de aminoácidos similares (mesmo grupo) pode indicar redundância de função.

A redundância funcional observada para alguns genes pode ser explicada pelo evento de subfuncionalização, onde o gene duplicado mantém a função do gene ancestral (GALLEGO-BARTOLOME et al., 2010), enquanto que as expressões variáveis de genes do mesmo grupo é explicada pela neofuncionalização, na qual genes duplicados assumem novas funções, já que o ancestral mantém a função original (HITTINGER e CARROLL 2007).

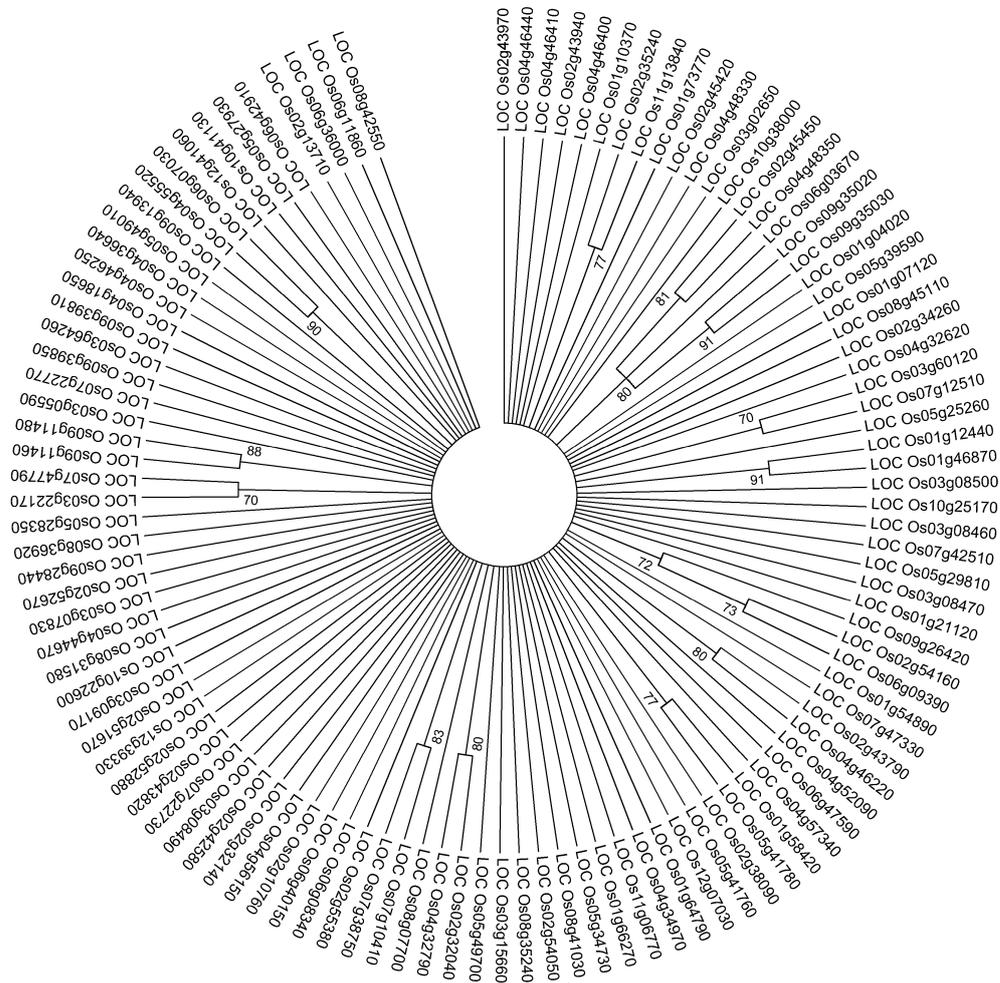


Figura 4 - Dendrograma construído a partir das seqüências de aminoácidos das proteínas ERFs em arroz. Os números nos nós correspondem ao valor de *bootstrap*.

3.4 Conclusões

Alguns genes da família *ERF* apresentam expressão específica, enquanto que outros apresentam expressão comum frente aos diferentes estresses ambientais estudados. Dentro da família *ERF*, a regulação da expressão dos genes se dá de forma complexa e de forma simples, com baixa relação entre a presença de determinado elemento *cis* com perfil de expressão observado.

3.5 Referências Bibliográficas

- ABOGADALLAH, G.M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**. v. 5, p. 369-374. 2010.
- BRIVANLOU, A.; DARNELL, J. Signal transduction and the control of gene expression. **Science**, v.295, p.813–818, 2002.
- BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R.; SHARMA, V.K.; KIEFT, H.; OUELLET, T.; ZHANG, L.; HATTORI, J.; LIU C.M.; LAMMEREN, A.A.M.; MIKI, B.L.A.; CUSTERS, J.B.M.; CAMPAGNE, M.M.L. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**. v. 14, p. 1737-1749. 2002.
- CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**. 11:163. 2011.
- DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; P-M. Badot. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42 p. 273-282, 2004.
- DIVI, U.K.; RAHMAN T.; KRISHNA, P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. **BMC Plant Biology**. 10:151. 2010.
- DUBOUZET, J.G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E.G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**. v. 33, p. 751-763. 2003.
- ELLIOTT, R.C.; BETZNER, A.S.; HUTTNER, E.; OAKES, M.P.; TUCKER, W.Q.J.; GERENTES, D.; PEREZ, P.; SMYTH, D.R. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. **Plant Cell**. v. 8, p. 155-168. 1996.
- FORCAT, S.; BENNETT, M.H.; MANSFIELD, J.W.; GRANT, M.R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormone ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4:16, 2008
- FUJIMOTO, S.Y.; OHTA, M.; USUI, A.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M. Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional

- Activators or Repressors of GCC Box–Mediated Gene Expression. **Plant Cell**. v. 12, p. 393-404. 2000.
- FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI K.;. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 9, p. 436-442. 2006.
- FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES, J. The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. **The Plant Cell**, v. 23, p. 412-427, 2011.
- GALLEGO-BARTOLOME, J.; MINGUET, E.G.; MARÍN, J.A.; PRAT, S.; BLÁZQUEZ, M.A.; ALABAD, D. Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. **Molecular Biology and Evolution**. v. 27, p. 1247-1256. 2010.
- GILMOUR, S.J.; SEBOLT, A.M.; SALAZAR, M.P.; EVERARD, J.D.; THOMASHOW, M.F. Overexpression of Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. **Plant Physiology**. v. 124, p. 1854-1865. 2000.
- GILMOUR, S.J.; FOWLER, S.G.; THOMASHOW, M.F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 767-781. 2004.
- GOWIK, U.; BURSCHEIDT, J.; AKYILDIZ, M.; SCHLUE, U.; KOCZOR, M.; STREUBEL, R.A.M.; WESTHOFF P. cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. **Plant Cell**. v. 16, p. 1077-1090. 2004.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**. v.27 p. 297-300, 1999.
- HITTINGER, C.T.; CARROLL, S.B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. **Nature**. v. 449, p. 677-682. 2007.
- JUNG, KI-H.; SEO, Y-S.; WALIA, H.; CAO, P.; FUKAO, T.; CANLAS, P.E. AMONPANT, F.; BAILEY-SERRES, J.; RONALD, P.C. The Submergence Tolerance Regulator Sub1A Mediates Stress-Responsive Expression of AP2/ERF Transcription Factors. **Plant Physiology**. v. 152, p. 1674-1692. 2010.

- LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, v. 144, p. 218-231. 2007.
- LICAUSI, F.; DONGEN, J.T.; GIUNTOLI, B.; NOVI, G.; SANTANIELLO, A.; GEIGENBERGER, P.; PERATA, P. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**. v. 62, p. 302-315. 2010.
- LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. p.10, p. 1391-1406. 1998.
- LIU, L.; WHITE, M.J.; MACRAE, T.H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. **European Journal of Biochemistry**. v. 262, p. 247-257. 1999.
- MAEO, K.; TOKUDA, T.; AYAME, A.; MITSUI, N.; KAWAI, T.; TSUKAGOSHI H.; ISHIGURO, S.; NAKAMURA, K. An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes Involved in fatty acid synthesis. **The Plant Journal**. v. 60, p. 476-487. 2009.
- MITTAL, D.; CHAKRABARTI, S.; SARKAR, A.; SINGH, A.; GROVER, A. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, p. 785-795. 2009.
- NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in *Arabidopsis* and Rice. **Plant Physiology**. v. 140, p. 411-432. 2006.
- OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **Plant Cell**. v. 7, p. 173-182. 1995.
- OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. 2007.

- PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2001-2007. 2001.
- RIBOT, C.; HIRSCH, J.; BALZERGUE, S.; THARREAU, D.; NOTTÉGHM, J.L.; LEBRUM, M.H.; MOREL, J.B. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p. 114-124. 2008.
- ROMBAUTS, S.; FLORQUIN, K.; LESCOT, M.; MARCHAL, K.; ROUZE, P.; VAN DE PEER, Y. Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1162-1176. 2003.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis DREBs*, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 290, p. 998-1009, 2002.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**. v. 18, p. 1292-1309. 2006.
- SASAKI, K.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; ITO, H.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. Two novel AP2/ERF domain proteins interact with cis-element VWRE for wound induced expression of the Tobacco *tpoxN1* gene. **The Plant Journal**. v. 50, p. 1079-1092. 2007.
- SIMPSON, S.D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **The Plant Journal**. v. 33, p. 259-270. 2003.
- STEPANOVA, A.N. ALONSO, J.M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 12, p. 548-555. 2009.
- STOCKINGER, E.J.; GILMOUR, S.J.; THOMASHOW M.F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in

response to low temperature and water deficit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 1035-1040. 1997.

XU, K.; XU, X.; FUKAO, T.; CANLAS, P.; MAGHIRANG-RODRIGUEZ, R.; HEUER, S.; ISMAIL, A.M.; BAILEY-SERRES, J.; RONALD, P.C.; MACKILL, D.J. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice.

Nature. v. 442, p. 705-708. 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**. v. 6, p. 251-264. 1994.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**. v. 57, p. 781-803. 2006.

YAMAMOTO, S.; SUZUKI, K.; SHINSHI H. Elicitor-responsive ethylene independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. **The Plant Journal**. v. 20, p. 571-579. 1999.

YANG, T.; POOVAIAH, B.W. A Calmodulin-binding/CGCG Box DNA-binding Protein Family Involved in Multiple Signaling Pathways in Plants. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 45049-45058. 2002.

YANG, Z.; TIAN, L.; LATOSZEK-GREEN, M.; BROWN, D.; WU, K.

Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. **Plant Molecular Biology**, v. 58, p. 585-596. 2008.

WALIA, H.; WILSON, C.; CONDAMINE, P.; LIU, X.; ISMAIL, A.M.; ZENG, L.;

WANAMAKER, S.I.; MANDAL, J.; XU, J.; CUI, X.; CLOSE, T.J. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. **Plant Physiology** v.139, p. 822-835. 2005

WALLEY, J.W.; COUGHLAN, S.; HUDSON, M.E.; COVINGTON, M.F.; KASPI, R.; BANU, G.; HARMER, S.L.; DEHESH, K. Mechanical Stress Induces Biotic and Abiotic Stress Responses via a Novel *cis*-Element. **PLoS Genetics**. v. 3, p. e172.

WELSCH, R.; MAASS, D.; VOEGEL, T.; DELLA-PENNA, D.; BEYER P.

Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in

the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. **Plant Physiology**. v. 145, p. 1073-1085. 2007.

WU, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; WANG, X-C.; HUANG, R. Transcriptional Modulation of Ethylene Response Factor Protein JERF3 in the Oxidative Stress Response Enhances Tolerance of Tobacco Seedlings to Salt, Drought, and Freezing.v. 148, p. 1953-1963. 2008.

ZHANG, J.; JIA, W.; YANG, J.; ISMAIL, A.M. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crops Research**. v. 97, p. 111-119, 2006.

ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.; GRUISSEM, W. Genevestigator Transcriptome Meta-Analysis and Biomarker Search Using Rice and Barley Gene Expression Databases. **Molecular Plant**. v. 5, p. 851-857. 2008.

ZOU, C.; SUN, K.; MACKALUSO, J.D.; SEDDON, A.E.; JIN, R.; THOMASHOW, M.F.; SHIU, S-H. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2011.

4 CAPÍTULO III

Acúmulo de transcritos dos genes codificadores de subunidades dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em plantas de arroz em estresse por anoxia

Camila Pegoraro, Mariana Madruga Krüger, Railson Schreinert dos Santos, Liliane Marcia Mertz, Luciano Carlos da Maia, Cesar Valmor Rombaldi, Antonio Costa de Oliveira

Resumo

A ausência total ou parcial de oxigênio resulta em deficiência de energia, afetando o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas. O esgotamento de energia aumenta a produção de ROS, que afeta a integridade das membranas das células, principalmente das membranas de organelas como cloroplastos e mitocôndrias. A maioria das proteínas dos cloroplastos e das mitocôndrias é codificada por genes nucleares e sua importação até estas organelas envolve complexos de proteínas localizados nas membranas. Na mitocôndria, estes complexos são designados TIM e TOM, enquanto que no cloroplasto, são chamados de TIC e TOC. Danos nas membranas das mitocôndrias e dos cloroplastos ocasionados por estresses impedem a importação das proteínas codificadas pelo genoma nuclear através dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC, respectivamente, levando a planta à morte. Neste sentido, este estudo visou avaliar a expressão de genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em plantas de arroz sob condições de estresse. A expressão destes genes foi relacionada com a integridade das membranas e consequente importação de proteínas para mitocôndrias e cloroplastos sob condições de estresse. A partir do perfil de expressão digital foi possível verificar que a maioria dos genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC avaliados apresentou um aumento nos níveis de transcritos quando as plantas de arroz foram submetidas a diferentes estresses abióticos. Os dados obtidos por qPCR demonstraram que somente os genes *TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-*

Os04g0376100 e *TIM17/22-Os10g0519700* apresentaram altos níveis de expressão 24 horas após anoxia. Após 72 horas de anoxia, ocorre a inibição da expressão da maioria dos genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC. Estes resultados sugerem que há uma interrupção no transporte de proteínas para a mitocôndria e cloroplasto durante o estresse por anoxia, possivelmente devido a danos nas membranas destas organelas.

Palavras-chave: Expressão gênica, mitocôndria, cloroplasto, dano celular.

4.1 Introdução

Estresse por anoxia é caracterizado pela baixa concentração (>2%) dos níveis de O₂ (oxigênio) (SKUTNIK e RYCHTER, 2009), a qual afeta o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas. Esta condição ocorre geralmente em situações de submersão completa, onde há uma redução na difusão de O₂ e de CO₂ (dióxido de carbono) (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2008). A deficiência de O₂ reduz drasticamente a produção de ATP (adenosina trifosfato) celular, o qual é necessário para a maioria dos processos vitais da célula durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2004).

A anoxia ocasiona mudanças no conteúdo e composição de lipídios, fluidez das membranas, acidose citoplasmática e mudanças na síntese de proteínas. A maioria destas mudanças juntamente com a falta de ATP favorece a produção de ROS (espécies reativas de O₂) e consequente peroxidação de lipídios (BLOKHINA et al., 2001). Além dos lipídios, outros componentes celulares como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos também são suscetíveis ao estresse oxidativo (BLOKHINA et al., 2003).

As membranas dos cloroplastos são especificamente afetadas por ROS, pois são o local da produção de radicais de O₂. Além disso, os cloroplastos têm um risco particular de toxidez por O₂, pois o O₂ molecular pode ser reduzido pela luz pelo Fotossistema I (MEHLER, 1951). Na mitocôndria, a inibição direta de enzimas importantes, como as atuantes no Complexo I e Aconitase, pode ser resultado de dano oxidativo (ZHANG et al., 1990). Danos nas membranas e nas proteínas de

ligação de membranas envolvidas nos processos de produção de energia podem influenciar o metabolismo de toda a planta (HOLMBERG e BÜLOW, 1998), além disso, danos nas mitocôndrias e cloroplastos bloqueiam a entrada de proteínas codificadas pelo genoma nuclear que possuem funções vitais nestas organelas, levando a planta à morte.

Em vegetais, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos são as organelas responsáveis pelos principais processos metabólicos da célula, incluindo fotossíntese, fotorrespiração, fosforilação oxidativa, β -oxidação e Ciclo de Krebs. As mitocôndrias são o centro da regulação da energia celular e do balanço redox, e integram numerosas rotas metabólicas, que são importantes nas respostas adaptativas a condições de estresses ambientais extremas (SWEETLOVE et al., 2007), além disso, a maioria dos sistemas de defesa da célula é originada nesta organela. Os plastídios também têm papel importante na homeostase celular, através da reciclagem de carbono e da produção de pigmentos, vitaminas, aminoácidos aromáticos e hormônios.

Mitocôndrias e cloroplastos contêm entre 2000 e 4000 proteínas (VAN WIJK, 2004; MILLAR et al., 2005), e a maioria das proteínas (>95%) são codificadas pelo genoma nuclear, traduzidas no citosol, e transportadas para as organelas através de peptídeos N-terminais chamados de peptídeos de trânsito (BRAUN e SCHMITZ, 1999). Para algumas proteínas, os peptídeos de trânsito para cloroplastos e mitocôndrias têm composição semelhante, podendo o mesmo peptídeo de trânsito coordenar o transporte para cloroplasto ou mitocôndria, são os chamados *dual target proteins* (BRINK et al., 1994). Entretanto, após a tradução, os peptídeos de trânsito para cloroplastos são fosforilados, e durante a importação são desfosforilados. Esta característica distingue as proteínas que vão para os cloroplastos das que vão para as mitocôndrias (HEINS et al., 1998). Além disso, diferenças na estrutura e função dos aparatos de importação auxiliam na especificidade do destino de cada proteína (BRAUN e SCHMITZ, 1999). Embora o mecanismo de importação proteico mais conhecido seja aquele que envolve peptídeos de trânsito, apenas 50% das proteínas localizadas nestas organelas apresentam esta propriedade quando se utilizam as principais ferramentas de bioinformática (*Mitoprot*, *ChloroP*, *Predotar*, *iPSORT* e *TargetP*). Isso indica que o transporte de proteínas para mitocôndrias e cloroplastos

provavelmente ocorra por vários meios, mas valendo-se das estruturas TIM e TOM e TIC e TOC.

A importação de proteínas para a mitocôndria e cloroplasto envolve complexos de proteínas localizados nas membranas destas organelas. As membranas externa e interna da mitocôndria contém maquinários proteicos com subunidades para importar as proteínas codificadas pelo genoma nuclear, que auxiliam na entrada das proteínas na camada lipídica. Estas subunidades são denominadas translocases de membrana interna da mitocôndria (*translocases of the inner mitochondrial membrane* - TIM) e translocases de membrana externa da mitocôndria (*translocases of the outer mitochondrial membrane* - TOM) (NEUPERT, 1997). Nos cloroplastos, estes maquinários são chamados de translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts* - TIC) e translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts* - TOC) (KESSLER e SCHNELL, 2006).

Nas mitocôndrias, proteínas TIM e TOM estão envolvidas no reconhecimento e/ou translocação de pré-proteínas. Estes maquinários são separados por entidades funcionais que podem ser transitoriamente conectadas por uma pré-proteína que abrange ambas as membranas, interna e externa, da mitocôndria (DEKKER et al., 1997). Em cloroplastos, a importação de proteínas não é mediada somente pelos complexos TIC e TOC, mas também com a assistência de chaperonas estromais (KESSLER e SCHNELL, 2006).

Em arroz, existem 24 locos para genes codificadores das subunidades de ambos os complexos (TIM/TOM e TIC/TOC). A maioria dos genes em Arabidopsis e arroz são homólogos, indicando a expansão desta família antes da divergência das monocotiledôneas e dicotiledôneas. Em Arabidopsis e arroz, as famílias que possuem o maior número de membros são TIM17/22 e TIM23, indicando que estas famílias têm uma grande expansão em plantas (MURCHA et al., 2007).

Em condições de ausência total ou parcial de O₂, assim como em outras condições de estresses abióticos e bióticos o excesso da produção de ROS causa a peroxidação dos lipídios das membranas das mitocôndrias, e, além disso, os subprodutos da peroxidação de lipídios podem causar danos celulares devido à

reação com outros lipídios, proteínas vitais na mitocôndria e ácidos nucleicos, causando mutações e mudanças na expressão gênica (SWEETLOVE et al., 2002). Em cloroplastos, a alta produção de ROS ocasionada por diversos fatores ambientais como luz, seca, injúria por frio e alagamento induz a fotoxidação das membranas (ELSTNER e OSSWALD, 1994).

Neste sentido, sugere-se que mudanças nos níveis de expressão dos genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC podem ser utilizadas como forma de medir a integridade/funcionalidade das membranas das mitocôndrias e cloroplastos, e conseqüentemente a importação de proteínas para estas organelas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o acúmulo de transcritos de alguns genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em plantas de arroz sob diferentes condições de estresse, principalmente em estresse por anoxia.

4.2 Material e Métodos

Com o objetivo de verificar o perfil transcricional de genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em condições de estresse, um grupo de 16 genes foi obtido no banco de dados *RAP-DB* (*The Rice Annotation Project data Base*) (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>).

O perfil de expressão digital foi obtido utilizando ferramentas do programa *Genevestigator* (<http://www.genevestigator.ethz.ch>) para diferentes órgãos das plantas, diferentes estádios de desenvolvimento, e para diferentes estresses (anoxia, frio, seca e sal) (ZIMMERMANN et al., 2008).

Para análise de expressão quantitativa dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC sob o estresse por anoxia um experimento foi conduzido no CGF/FAEM/UFPel. Utilizaram-se sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) do genótipo Nipponbare tratadas durante 15 min com hipoclorito de sódio 0.5%, em pH 5.5. Em seguida, foram lavadas com água estéril por 10 vezes e acondicionadas em papel filtro estéril durante 15 dias em 25°C. Após este período, as plântulas foram submetidas a dois tratamentos, submersão completa (anoxia) durante 24 e 72 horas, e em condições normais (controles) durante 24 e 72 horas. Foram feitas

três replicatas biológicas para cada tratamento, e cada replicata foi composta por 15 plântulas. Após cada período, folhas de arroz foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA total.

Tabela 1 - Genes avaliados no programa *Genevestigator* e por qPCR

Gene	Senso	Antisenso
<i>TOM7Os01g0626300</i>	GAAGCCGAAGCCCAAGGTCAA	TGGTCCACGTGGTCCACTCCTT
<i>TOM20Os01g0921600</i>	GGACATGGGAGCGATGAGCG	ACCTTGGCGTTCTGGCATGC
<i>TOM10Os07g0243100</i>	GAAAGGTCAGCCGGTGAATGTG	TGCCAATCCAAACATCTGCTCC
<i>TOM10 Os03g0825400</i>	TGGAGAAGGAGCAGATGTTCCG	CGACCCGGTACTCCATCTCCTT
<i>TOM13Os04g0581300</i>	ATGGACTCGTTCTCGTCGCCGT	TGAGATGCTCCGTGGACGCAGT
<i>TIM17/22Os02g0672500</i>	CCTCGCCTTCCCCACCTCGTAC	GCGAGGTGGGACGGTCGTAGAG
<i>TIM17/22Os02g0717300</i>	GGGCTCATCCGGACGCTCAA	ACGAGCTGCTCGACGCCGAT
<i>TIM17/22Os03g0296300</i>	GGAGGAGATCAAGGGGACGAGAC	ATGACTCCACTGACGACGCTGC
<i>TIM17/22Os03g0305600</i>	CGGCCTGGAGAAGAAGTGGATG	ATGAAGTAAGACTCCCGCGCGA
<i>TIM17/22Os04g0376100</i>	TGGAAGGAGCGGATCTTGCTGC	GAATCCAGCTCCGACCACACCG
<i>TIM17/22Os10g0519700</i>	CTGTTCCCGTCGGGATCCAA	AGGGTTGTACTTCCGGCGG
<i>TIM17/22Os12g0514900</i>	CGCGAGGAGGAGGAAGGAGG	CTCAGCGTCGGTGGTGTCCC
<i>TIM44Os07g0409700</i>	GGAGGGCAGGACACCATCCA	TGCTGGATCTCACGCAACCG
<i>TIC21Os06g0638100</i>	GCCATGCTCGCCAGGTTAG	CAGAATCCCAGGGTGCCCAA
<i>TIC62Os10g0100300</i>	ATCGTGTGGCCATTGGCAA	TGCAGCCTGCACGAGGTTGTT
<i>TOC24 Os01g0969000</i>	GGCCGCCGGCAATAATAAGG	GCACGTCCTCCTCCTCCAGCTT
<i>GAPDH Os04g0486600</i>	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT	CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT

Os 16 genes avaliados neste estudo, assim como o normalizador utilizado (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* - *GAPDH*) podem ser visualizados na tab. 1. Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Vector™ (Invitrogen™). O critério utilizado para seleção dos iniciadores consistiu de tamanho do *amplicon* entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60% e temperatura de anelamento entre 60 e 65°C, de acordo com as recomendações da Applied Biosystems®.

O RNA total foi extraído a partir de 0.1 g de folhas de um *pool* de 15 plântulas, utilizando o reagente *Pure Link™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™). As amostras de RNA foram tratadas com *DNAse I™ Amplification Grade* (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA total foram verificadas por espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose, respectivamente. Os cDNAs foram obtidos a partir de 2 µg de RNA total utilizando o kit *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™). As análises de qPCR foram realizadas usando três replicatas técnicas por replicata biológica em equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®). Os dados de

expressão gênica foram analisados usando o programa *Multi Experiment Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer version 4.6* (SAEED et al., 2003) e apresentados como *heat map*, onde os tempos 24 e 72 horas controle foram utilizados como calibradores.

4.3 Resultados e Discussão

De acordo com perfil de expressão digital (Fig. 1) observa-se que os níveis de transcritos dos genes avaliados foram afetados por condições de anoxia, assim como pelos outros estresses avaliados (frio, seca e sal). Em coleóptilos de arroz, o estresse por anoxia causou a indução de 10 genes (*TOM7-Os01g0626300*, *TOM20-Os01g0921600*, *TIM10-Os03g0825400*, *TIM13-Os04g0581300*, *TIM17/22-Os02g0672500*, *TIM17/22-Os03g0296300*, *TIM17/22-Os04g0376100*, *TOC24-Os01g0969000*, *TIC21-Os06g0638100* e *TIC62-Os10g0100300*), a repressão de dois genes (*TIM10-Os07g0243100* e *TIM17/22-Os03g0305600*) e nenhuma mudança significativa em quatro genes (*TIM17/22-Os02g0717300*, *TIM17/22-Os10g0519700*, *TIM17/22-Os12g0514900* e *TIM44-Os07g0409700*).

A habilidade de germinação do arroz sob condições de anoxia é similar quando em condições de normoxia, porém em condições de anoxia, somente o coleóptilo alonga, enquanto que as raízes primárias e a parte aérea não conseguem crescer (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007), sugerindo que há um metabolismo mais acelerado no coleóptilo do que nos outros órgãos mencionados. Desta forma, a alta expressão transcricional na maioria dos genes em estresse por anoxia pode ser associada à maior atividade metabólica de coleóptilos quando submetidos em condições de baixos níveis de O₂.

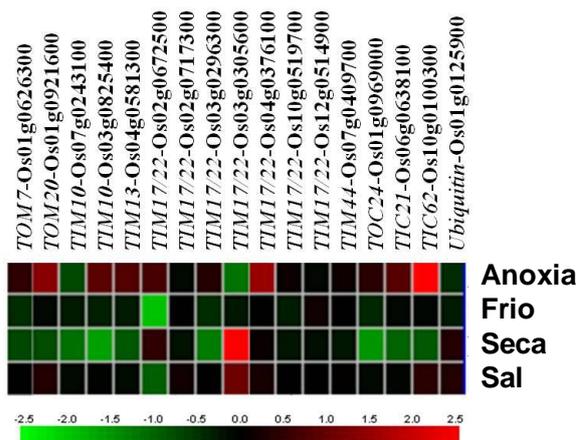


Figura 1 - Perfil de expressão digital dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TIC, baseado em dados de *microarray*, em coleótilos de arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) em diferentes estresses abióticos. A expressão é apresentada como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. O gene da *Ubiquitina* foi utilizado como controle. TIM: translocase de membrana interna da mitocôndria; TOM: translocase de membrana externa da mitocôndria; TIC: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; TOC: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto.

Os dados obtidos por qPCR (Fig. 2) demonstram que a maioria dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC são inibidos em folhas de plântulas de arroz submetidas ao estresse por anoxia durante 24 horas. Entretanto, os genes *TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-Os04g0376100* e *TIM17/22-Os10g0519700* foram altamente expressos após 24 horas de estresse, sugerindo que estes genes atuam na resposta primária da planta e adaptação ao estresse por baixas taxas de O₂. Estudos desenvolvidos por Howell et al. (2007) já haviam verificado que plantas de arroz submetidas a condições anaeróbicas (24 e 48 horas) apresentavam um aumento significativo na abundância de algumas proteínas pertencentes às famílias TIM17/22, TIM23, TIM44, TOM20 e TOM 40. Após 72 horas de estresse, a maioria dos genes foi inibida ou apresentou atividade basal, como identificado nas plantas em condições normais. Os três genes que haviam sido induzidos 24 horas após o estresse (*TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-Os04g0376100* e *TIM17/22-Os10g0519700*) foram completamente inibidos após 72 horas de estresse.

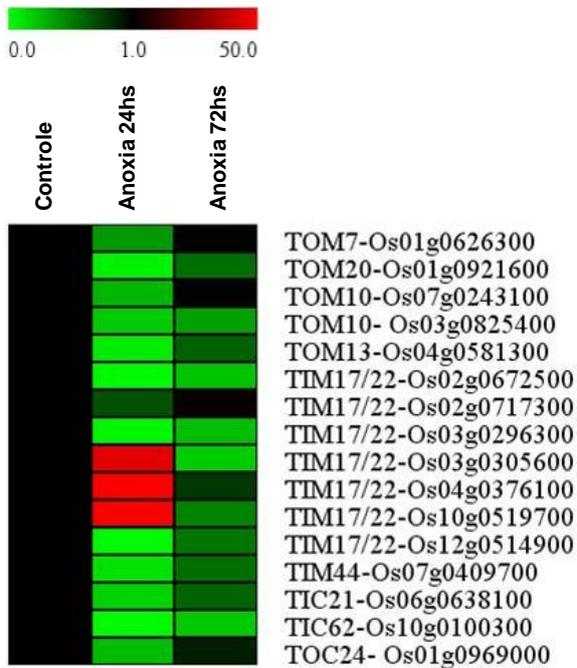


Figura 2 - Acúmulo de mRNA dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em folhas arroz (cv. Nipponbare) submetidas ao estresse por anoxia. O acúmulo de transcritos é representado em *heat map* usando o programa *Multi Experiment Viewer (TIGR MeV)*. O acúmulo de mRNAs de cada gene nos controles 24 e 72 horas foram utilizados como calibradores para determinar a acúmulo de mRNA sob estresse por anoxia. TIM: translocase de membrana interna da mitocôndria; TOM: translocase de membrana externa da mitocôndria; TIC: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; TOC: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto.

Os resultados obtidos por qPCR foram divergentes dos dados obtidos pelo programa *Genevestigator* (dados de *microarrays*). Estas diferenças entre os resultados podem ser explicadas pelo fato que a análise de expressão pela técnica de *microarrays* foi feita em coleótilos, enquanto que a análise de expressão por qPCR foi feita em folhas e, como mencionado anteriormente, tecidos diferentes respondem de maneira diversa quando em condições de anoxia. Neste estudo, o tecido foliar foi utilizado visando simular condições de submergência completa que podem ocorrer durante o estágio vegetativo de arroz, e não somente durante ou logo após a germinação.

De acordo com os resultados apresentados é possível que a redução nos níveis de transcritos observados para a maioria dos genes, em folhas de plântulas de arroz submetidas a condições de anoxia durante 24 e 72 horas, é ocasionada por danos nas membranas da mitocôndria e cloroplasto devido à peroxidação de lipídios, principalmente ácidos graxos poli-insaturados. Outros resultados indicam que a falta de O₂ afeta a cadeia de transporte de elétrons, aumentando o estado

redox, favorecendo a acidificação do pH intermembrana, interferindo no tráfego de proteínas para as mitocôndrias. Este desbalanço na preservação dos complexos de importação de proteínas na mitocôndria (TIM/TOM) e no cloroplasto (TIC/TOC) contribui para aumentar as respostas fisiológicas negativas sob o estresse por anoxia.

O alto nível de expressão dos genes *TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-Os04g0376100* e *TIM17/22-Os10g0519700* podem contribuir para persistir o transporte de proteínas essenciais do citoplasma para a mitocôndria, pelo menos durante as primeiras 24 horas em estresse por anoxia. Este resultado indica uma possível associação destes genes com o desenvolvimento de um mecanismo de tolerância ao estresse por baixos níveis de O₂.

Outro aspecto interessante é o fato de que nenhum gene foi induzido pelo estresse por frio (Fig. 1), 6 genes não apresentaram mudanças significativas (*TOM20-Os01g0921600*, *TIM17/22-Os02g0717300*, *TIM17/22-Os12g0514900*, *TIM44-Os07g0409700*, *TIC21-Os02g0187600* e *TIC62-Os10g0100300*) e os outros 10 genes foram reprimidos, sugerindo perda de função nas membranas dos cloroplastos e mitocôndrias quando em condições de estresse por frio. Estes resultados suportam estudos prévios realizados em outras espécies, os quais demonstram que as estruturas da membrana plasmática e das membranas do cloroplasto são danificadas em condições de estresse por calor (44°C durante 3 horas) ou frio (-3°C durante 3 horas) em plantas de videira (WANG e LI, 2006).

Em condições de estresse por seca, a maioria dos genes foi reprimido, e somente dois genes foram induzidos (*TIM17/22-Os02g0672500* e *TIM17/22-Os03g0305600*) (Fig. 1). Estes resultados sugerem que o estresse por seca causa danos às membranas, interrompendo a necessidade de transcrição de genes e codificam proteínas dos complexos TIM/TOM e TIC/TOC. Estudos prévios em outras espécies já haviam demonstrado que o estresse por déficit de água causa danos em todas as membranas das células, além disso, induz a ruptura dos cloroplastos (CARBONELL et al., 1994).

Em condições de estresse salino, cinco genes foram induzidos (*TOM20-Os01g0921600*, *TIM17/22-Os02g0717300*, *TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-Os04g0376100* e *TIM17/22-Os10g0519700*), somente dois genes foram reprimidos

(*TOM7-Os01g0626300* e *TIM17/22-Os02g0672500*) e os outros 9 genes não apresentaram mudanças significativas nos seus níveis de expressão, indicando que não há um dano excessivo nas membranas das mitocôndrias e cloroplastos durante estresse por sal, uma vez que, a maioria dos genes permaneceu inalterada com relação ao controle. Entretanto, em outros estudos, plantas de arroz submetidas a condições de estresse salino intenso apresentaram ruptura dos cloroplastos e das mitocôndrias (RAHMAN et al., 2000).

Neste estudo, também foi analisada a ocorrência de sobreposição de expressão dos genes TIM/TOM e TIC/TOC sob os diferentes estresses abióticos estudados (dados de *microarrays*). Os resultados obtidos indicam que não há sobreposição de expressão destes genes nos estresses analisados, diferentemente do que ocorre em outras famílias gênicas como HSPs (*heat shock protein*), HSFs (*heat shock factors*) e ERFs (*ethylene responsive factors*).

Ao analisar os dados de expressão para os diferentes órgãos da planta (Fig. 3), observou-se que 12 genes (*TOM7-Os01g0626300*, *TOM20-Os01g0921600*, *TIM10-Os07g0243100*, *TIM10-Os03g0825400*, *TIM13-Os04g0581300*, *TIM17/22-Os02g077300*, *TIM17/22-Os03g0293600*, *TIM17/22-Os04g0376100*, *TIM17/22-Os10g0519700*, *TIM17/22-Os12g0514900*, *TIM44-Os07g0409700* e *TIC21-Os06g0638100*) foram expressos em todos os tecidos da planta, porém com diferentes níveis de expressão. Cinco genes se destacam por apresentar altos níveis de expressão na maioria dos órgãos analisados (*TOM7-Os01g0626300*, *TIM17/22-Os04g0376100*, *TIM17/22-Os10g0519700*, *TIM17/22-Os12g0514900* e *TIM44-Os07g0409700*). Os demais genes mostraram variações nos níveis de expressão nas diferentes partes da planta.

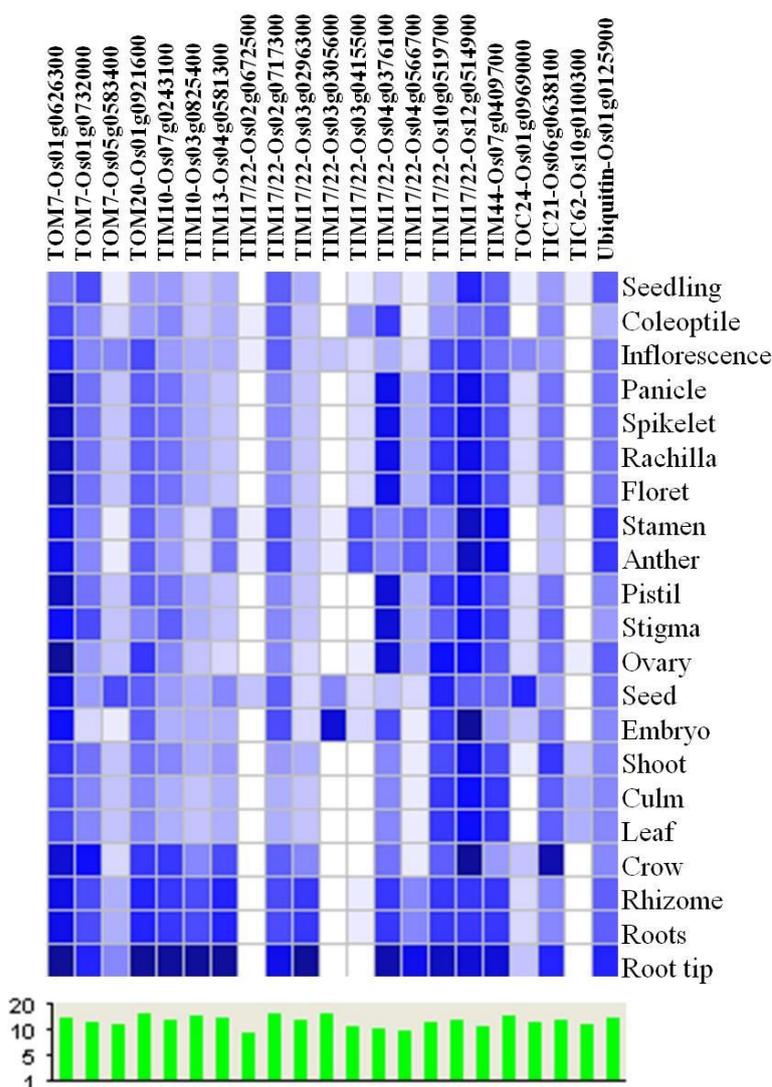


Figura 3 - Perfil de expressão digital dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TIC baseado em dados de *microarray*, em arroz em diferentes órgãos da planta. A expressão é apresentada como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. TIM: translocase de membrana interna da mitocôndria; TOM: translocase de membrana externa da mitocôndria; TIC: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; TOC: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto. *Seedling*: plântula; *Coleoptile*: coleóptilo; *Inflorescência*: inflorescência; *Panicle*: panícula; *Spikelet*: espiguetas; *Rachilla*: ráquis; *Floret*: flor; *Stamen*: estame; *Anther*: antera; *Pistil*: pistilo; *Stigma*: estigma; *Ovary*: ovário; *Seed*: semente; *Embryo*: embrião; *Shoot*: broto; *Culm*: colmo; *Leaf*: folha; *Crow*: coroa; *Rhizome*: rizoma; *Roots*: raízes; *Root tip*: ponta da raiz.

O perfil de expressão nos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de arroz (Fig. 4) demonstra que 11 genes (*TOM7-Os01g0626300*, *TOM20-Os01g0921600*, *TIM10-Os07g0243100*, *TIM10-Os03g0825400*, *TIM13-Os04g0581300*, *TIM17/22-Os02g0717300*, *TIM17/22-Os03g0293600*, *TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-Os03g0415500*, *TIM17/22-Os04g0376100*, *TIM17/22-Os10g0519700*, *TIM17/22-Os12g0514900*, *TIM44-Os07g0409700* e *TIC21-Os06g0638100*) foram expressos em todos os estádios de desenvolvimento, porém

em níveis diferenciados de expressão. Quatro genes (*TOM7-Os01g0626300*, *TIM17/22-Os10g0519700*, *TIM17/22-Os12g0514900* e *TIM44-Os07g0409700*) apresentaram altos níveis de expressão em todos os estádios, sugerindo que estes genes são expressos de maneira constitutiva e apresentam funções vitais nestes estádios de desenvolvimento. Estudos anteriores já haviam demonstrado o envolvimento do aparato de importação de proteínas na regulação de respostas fisiológicas durante o desenvolvimento da planta (INABA e SCHNELL, 2008).

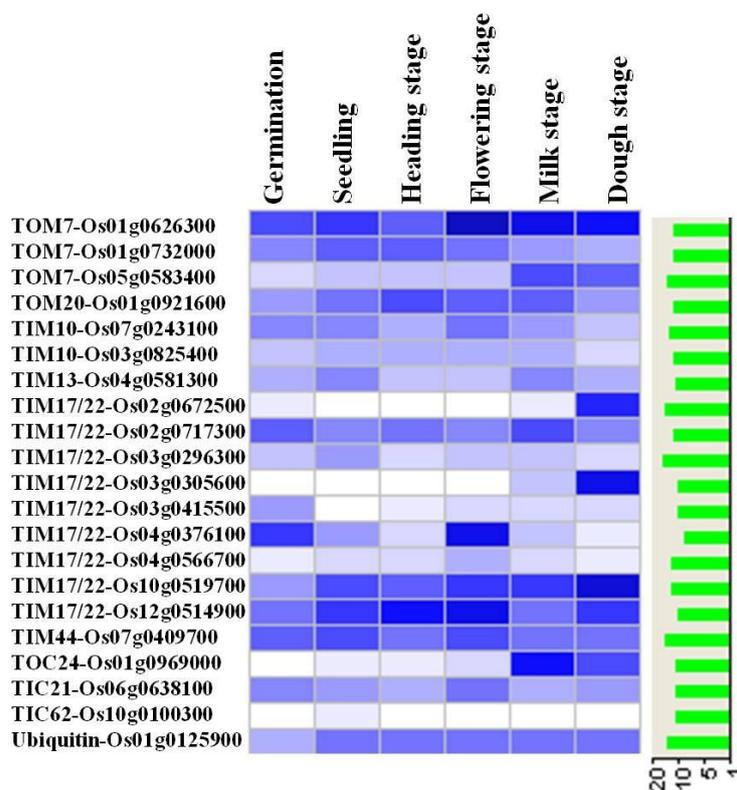


Figura 4 - Perfil de expressão digital dos genes pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TIC baseado em dados de *microarray*, em arroz durante diferentes estádios de desenvolvimento. A expressão é apresentada como *heat map*, gerado pelo programa *Genevestigator*. TIM: translocase de membrana interna da mitocôndria; TOM: translocase de membrana externa da mitocôndria; TIC: translocon da membrana interna do envelope do cloroplasto; TOC: translocon da membrana externa do envelope do cloroplasto. *Germination*: germinação; *Seedling*: plântula; *Heading stage*: espigamento; *Flowering stage*: florescimento; *Milk stage*: grão leitoso; *Dough stage*: formação final do grão.

4.5 Conclusões

A quantificação da expressão em qPCR para os genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC sob estresse por anoxia traz uma nova e precisa informação sobre a modificação transcricional destes genes em folhas de arroz sob condições de anoxia. O alto nível de transcritos 24 horas após o estresse por anoxia dos genes *TIM17/22-Os03g0305600*, *TIM17/22-Os04g0376100* e *TIM17/22-Os10g0519700* indicam a participação destes genes na aclimação das plantas em resposta à este estresse. A inibição da expressão da maioria dos genes que codificam proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC em condições de anoxia durante 72 horas sugere que há uma interrupção no transporte de proteínas para a mitocôndria e cloroplasto durante este período de estresse, possivelmente devido à danificação das membranas destas organelas.

As análises realizadas no *Genevestigator* indicam a participação dos genes estudados na resposta a diferentes estresses abióticos. Para os estresses analisados, o fenômeno de sobreposição de expressão não foi detectado, sugerindo especificidade na ativação destes genes. As diferenças detectadas no perfil de expressão digital para os diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento de plantas de arroz demonstram a importância destes genes durante o crescimento e desenvolvimento do arroz.

4.6 Refêrencias Bibliográficas

- BLOKHINA, O.B.; CHIRKOVA, T.V.; FAGERSTEDT, K.V.V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. **Journal of Experimental Botany**. v. 52, p. 1179-1190. 2001.
- BLOKHINA, O.B.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**. v. 91, p. 179-94. 2003.
- BRAUN, H.P.; SCHMITZ, U.K. The protein-import apparatus of plant mitochondria. **Planta**. v. 209, p. 267-274. 1999.

- BRINK, S.; FLUÉGGE, U.I.; CHAUMONT, F.; BOUTRY, M.; EMMERMANN, M.; SCHMITZ, U.K.; BECKER, K.; PFANNER, N. Preproteins of chloroplast envelope inner membrane contain targeting information for receptor-dependent import into fungal mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, p. 16478-16485. 1994.
- CARBONELL, M.L.; ALEGRE, L.; ONCKELEN, H. Effects of water stress on cellular ultrastructure and on concentrations of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid in *Fatsia japonica* leaves. **Plant Growth Regulation**. v. 14, p. 29-35. 1994.
- DEKKER, P.J.T.; MARTIN, F.; MAARSE, A.C.; BÖMER, U.; MÜLLER, H.; GUIARD, B.; MEIJER, M.; RASSOW, J.; PFANNER, N. The Tim core complex defines the number of mitochondrial transLOCation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. **The EMBO Journal**. v. 16, p. 5408-5419. 1997.
- ELSTNER, E.F.; OSSWALD, W. Mechanisms of activation during plant stress. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**. v. 102B, p. 131-154. 1994.
- FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**. v. 9, p. 449-456. 2004
- FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 6814-16819. 2008.
- HEINS, L.; COLLINSON, I.; SOLL, J. The protein transLOCation apparatus of chloroplast envelopes. **Trends in Plant Science**. v. 3, p. 56-61. 1998.
- HOLMBERG, N.; BÜLOW, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends Plant in Science**. v. 3, p. 61-66. 1998.
- HOWELL, K.A.; CHENG, K.; MURCHA, M.W.; JENKIN, L.E.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J. Oxygen Initiation of Respiration and Mitochondrial Biogenesis in Rice. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 15619-15631. 2007.
- INABA, T.; SCHNELL, D.J. Protein trafficking to plastids: one theme, many variations. **Biochemical Journal**. v. 413, p. 15-28. 2008.
- KESSLER, F.; SCHNELL, D.J. The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. **Traffic**. v. 7, p. 248-257. 2006.

- LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. **Plant Physiology**. v. 144, p. 218-231. 2007.
- MURCHA, M.W.; ELHAFEZ, D.; LISTER, R.; TONTI-FILIPPINI, J.; BAUMGARTNER, M.; PHILIPPAR, K.; CARRIE, C.; MOKRANJAC, D.; SOLL, J.; WHELAN, J. Characterization of the Preprotein and Amino Acid Transporter Gene Family in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 143, p. 199-212. 2007.
- MEHLER, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 33, p. 339-351. 1951.
- MILLAR, A.H.; HEAZLEWOOD, J.L.; KRISTENSEN, B.K.; BRAUN, H.P.; MOLLER, I.M. The plant mitochondrial proteome. **Trends in Plant Science**. v. 10, p. 36-43. 2005.
- NEUPERT, W. Protein import into mitochondria. **Annual Review of Biochemistry**. v. 66, p. 863-917. 1997.
- RAHMAN, M.S.; MATSURO, T; MIYAKE, H.; TAKEOKA, Y. Salinity induced ultrastructural alterations in leaf cells of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Product Science**. v. 4, p. 422-429. 2000.
- SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, p. 374-378. 2003.
- SKUTNIK, M.; RYCHTER, A.M. Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. **Journal of Plant Physiology**. v. 166, p. 926-937. 2009.
- SWEETLOVE, L.J.; HEAZLEWOOD, J.L.; HERALD, V.; HOLTZAPFFEL, R.; DAY, D.A.; LEAVER, C.J.; MILLAR, A.H. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. **The Plant Journal**. v. 32, p. 891-904. 2002.

SWEETLOVE, L.J.; FAIT, A.; NUNES-NESE, A.; WILLIAMS, T.; FERNIE, A.R. The Mitochondrion: An Integration Point of Cellular Metabolism and Signalling.

Critical Reviews in Plant Sciences. v. 26, p. 17-43. 2007.

VAN WIJK, K.J. Plastid proteomics. **Plant Physiology and Biochemistry.** v. 42, p. 963-977. 2004.

WANG, J.L.; LI, S.H. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. **Plant Science.** v. 170, p. 685-694. 2006.

ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L.; DAVIES, K.J. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **Journal of Biological Chemistry.** v. 265, p. 16330-16336. 1990.

ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.;

GRUISSEM, W. Genevestigator Transcriptome Meta-Analysis and Biomarker Search Using Rice and Barley Gene Expression Databases. **Molecular Plant.** v. 5, p. 851-857. 2008.

5 CAPÍTULO IV

Perfil de expressão de genes *HSPs* em arroz em estresse por anoxia

Liliane Marcia Mertz, Camila Pegoraro, Luciano Carlos da Maia, Cesar Valmor Rombaldi, Antonio Costa de Oliveira

Resumo

Embora as inundações sejam um dos estresses ambientais mais importantes, nem todas as espécies são intolerantes a esta condição. Espécies originadas de ambientes semi-aquáticos como o arroz, têm a capacidade de sobreviver em condições de estresse por alagamento. As proteínas HSPs contribuem para a manutenção da homeostase celular em condições ótimas e adversas de crescimento. Estudos de expressão gênica em plantas expostas a baixos níveis de O₂ revelam a indução de genes *HSPs*. Entretanto, não está claro se as HSPs estão relacionadas com a tolerância ou simplesmente são transcritas como resposta ao estresse por anoxia. Para elucidar esta questão, investigou-se o acúmulo de transcritos de genes *HSPs* sob condições de estresse por anoxia em duas cultivares de arroz, Nipponbare, tolerante ao alagamento e IPSL 2070, sensível ao alagamento. A condição de estresse por anoxia foi confirmada pelo acúmulo de transcritos do gene codificador da enzima ADH. Os dados obtidos demonstram que em ambas as cultivares (Nipponbare e IPSL 2070) houve um acúmulo de transcritos dos genes codificadores de HSPs em estresse por anoxia. Entretanto, a maioria dos genes avaliados foi mais responsiva ao estresse por anoxia na 'IPSL2070', enquanto que na 'Nipponbare', somente 6 genes foram induzidos, sugerindo que HSPs têm um papel importante na resposta ao estresse por anoxia, mas não estão diretamente envolvidas na tolerância.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, expressão gênica, deficiência de oxigênio.

5.1 Introdução

No ambiente natural, as plantas são frequentemente submetidas a condições de baixos níveis de O₂ (oxigênio) em função de solos com drenagem deficiente, solos compactados e eventos de submergência. A deficiência em O₂ molecular leva a alterações no metabolismo celular e pode reduzir drasticamente a produtividade de plantas cultivadas (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2004). O O₂ molecular é o aceptor final da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e é requerido por muitas enzimas, incluindo as que produzem ROS (espécies reativas de O₂) como moléculas de sinalização (MAXWELL et al., 1999). Em plantas, a deficiência de O₂ reduz a eficiência da produção de ATP (adenosina trifosfato) celular, o qual participa em diversas rotas do metabolismo celular (FUKAO e BAILEY-SERRES, 2004).

A maioria das espécies originadas de ambientes semiaquáticos, como o arroz (*Oryza sativa* L.), é capaz de suportar condições de alagamento e podem sobreviver nestas condições, sem apresentar efeitos negativos na produtividade. Estas espécies tolerantes são caracterizadas por uma série de adaptações metabólicas e morfológicas que facilitam a entrada e transporte de O₂, além disso, podem gerar ATP sem a presença do O₂, mesmo que em menores quantidades (metabolismo fermentativo) (VOESENEK et al., 2006; COLMER, 2003). Entretanto, a maioria das culturas não possui estes mecanismos, e podem ser afetadas por mudanças diárias ou sazonais de disponibilidade de O₂ no solo. Parte da terra arável no Sul do Brasil é caracterizada por solos com drenagem deficiente, resultando em uma barreira para a obtenção de rendimento máximo nas culturas sensíveis a baixos níveis de O₂. Por outro lado, a maioria das variedades de arroz é tolerante a esta condição, envolvendo mudanças em órgãos e tecidos, arquitetura e metabolismo celular (SARKAR et al., 2009).

Respostas a estresses abióticos em plantas envolvem mecanismos de percepção, redes de transdução de sinal e um grande conjunto de genes regulados por estresse. Uma importante descoberta na área de adaptação de plantas ao estresse por anoxia foi a identificação do loco *SUB1* (*Submergence*) em arroz, e a elucidação do papel deste loco na tolerância a submergência completa por períodos

prolongados (SIANGLIW et al., 2003; FUKAO et al., 2006; XU et al., 2006). Entretanto, deve-se ressaltar que a habilidade de sementes de arroz germinar sob condições de anoxia não é explicada pela presença dos genes *SUB1* (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007).

Dentre os genes que foram caracterizados como responsivos a estresses abióticos estão os genes que codificam as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSPs) ou chaperonas moleculares, as quais contribuem para a homeostase celular (WANG et al., 2004; SARKAR et al., 2009). Proteínas HSPs são responsáveis pelo dobramento correto, montagem, translocação e degradação de proteínas mal formadas, em uma ampla variedade de processos celulares. Além disso, as HSPs cooperam com outras proteínas ou componentes celulares em muitos processos biológicos, podendo assistir a conformação de proteínas sob condições de estresses e restabelecer a homeostase celular (WANG et al., 2004).

Proteínas HSPs são classificadas em seis famílias, HSP100, HSP90, HSP70, chaperoninas ou HSP60, HSP40 ou DNAJ e HSPs de baixo peso molecular (12-40 KDa) nomeadas pequenas HSPs (sHSPs) (WANG et al., 2004). Dentre as várias HSPs de plantas, as sHSPs são altamente expressas sob condições de estresse (SARKAR et al., 2009). As sHSPs são codificadas por uma família nuclear multigênica e estão presentes em diferentes componentes celulares. Estudos detalhados têm estabelecido que sHSPs em plantas são produzidas em resposta a vários estresses ambientais (SUN et al., 2002; SARKAR et al., 2009) e podem atuar como resposta ou origem de tolerância a estresses. Plantas de *Arabidopsis* e de arroz sob condições de anoxia apresentaram altos níveis de expressão de genes *HSPs*, sugerindo que estas proteínas têm um papel importante na sobrevivência sob condições de baixas taxas de O₂ (LORETI et al., 2005; LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007; BANTI et al., 2010). O arroz é considerado um modelo ideal para estudos de mecanismos de tolerância a anoxia, pois dispõe de genótipos com padrões diferenciais de tolerância.

Neste sentido, com o objetivo verificar se as proteínas HSPs atuam como um mecanismo de tolerância ou se são uma resposta ao estresse por anoxia, avaliou-se o acúmulo de transcritos dos genes *HSPs* em condições de estresse por anoxia em

duas cultivares de arroz, Nipponbare (tolerante ao alagamento) e IPSL 2070 (sensível ao alagamento).

5.2 Material e Métodos

Material Vegetal

O experimento foi conduzido no CGF/FAEM/UFPel. Utilizaram-se duas cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), Nipponbare (tolerante ao alagamento) e IPSL 2070 (sensível ao alagamento). Inicialmente, as sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio 0.5%, pH 5.5 durante 15 min, posteriormente as sementes foram lavadas com água estéril por 10 vezes e germinadas em papel filtro estéril a 25°C. Após 15 dias, as plântulas de ambas as cultivares foram submetidas ao estresse por anoxia durante 0, 24, 48 e 72 horas. As plântulas foram submetidas à anoxia utilizando frascos com volume de 0.5 L lavados com N₂ 100%, os quais foram mantidos no escuro até o final do experimento. Três replicatas biológicas foram feitas para cada condição experimental, e cada replicata consistiu de 15 plântulas. Após cada período, as raízes das plântulas foram coletadas, congeladas com N₂ e imediatamente armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA total.

Análises de qPCR

Um grupo de 15 genes *HSPs* foi avaliado (tab. 1). As sequências foram obtidas a partir do banco de dados *RAP-DB* (*The Rice Annotation Project* - <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Vector (InvitrogenTM). O critério de seleção utilizado consistiu de tamanho do amplicon entre 50 e 150 bp, conteúdo de CG entre 40% e 60%, e temperatura de anelamento de 60 a 65°C de acordo com as recomendações da Applied Biosystems[®]. O acúmulo de transcritos do gene codificador da enzima ADH (Álcool desidrogenase) foi utilizado como marcador das condições de anoxia.

O RNA total foi extraído de 0.1 g de raízes, a partir de um *pool* de 15 plântulas de arroz utilizando o reagente *TRIzol Reagent* (InvitrogenTM), com adição de

glicogênio, segundo instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNA foram tratadas com *DNAse I* (InvitrogenTM). A quantidade e a qualidade do RNA foram asseguradas por espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose (2% m/v). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 µg of RNA usando o kit *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (InvitrogenTM) de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação em PCR em Tempo Real (qPCR) foi realizada em equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems[®]). As condições de reação foram as seguintes: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de três estágios (95°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min), e extensão final a 72°C durante 5 min, seguido por curva de dissociação, na qual somente um pico foi observado. Somente iniciadores com eficiência de amplificação próxima a 100% foram utilizados neste estudo. O CT (*threshold cycle*) foi obtido e o nível de expressão relativa foi calculado conforme descrito por Pfaffl (2001). Para cada gene *HSP* analisado, o gene codificador da Actina foi utilizado como normalizador. Os dados de expressão gênica foram analisados usando o programa *Multi Experiment Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer version 4.6* (SAEED et al., 2003) e apresentados como *heat map*, onde o tempo 0 hora foi utilizado como calibrador.

Tabela 1 - Iniciadores específicos utilizados para análises de qPCR

Gene	Senso	Antisenso
<i>Adh</i>	CCTTGACCTTCTGCGGCCTAA	TCGACGGTGGCGATATTTGGTCTA
<i>HsfA3</i>	AGCCTGGCTCTTCTGGTGAA	CAGCCTGGTCACCTCCTGAA
<i>Hsp16.0PX</i>	GAGAACACCAAGCCGGAGCAGAT	GGATGGACTTGACGTGCGGGCTT
<i>Hsp16.6CVIII</i>	GAGACCAAGAAGCCGCAGCTGAA	GCACGCAGCAAACAGCCGAA
<i>Hsp17.8CXI</i>	CGACATTGACCTGGAAGACGTCCTT	CCGACGCGTTCAAATGGACAA
<i>Hsp17.9ACI</i>	CAAAGCGAGAAAAGAAGCCAGCAA	CAGCGACATCGTGGTTGGATT
<i>Hsp18.6CIII</i>	GGAGGAGGAAGGGGAGTGCAAGTA	TGAGCACCCCGTTCTCGCAT
<i>Hsp 18.8 CV</i>	TCGCCAGAGCAGCCTGATTAGTGAT	CCCCAATCCTAAGCTCACAGTGCAA
<i>Hsp19.0CII</i>	CGAGGGGGTGAAGTACCTGAGGAT	CGGGAACCTCCTCATGAACTTGC
<i>Hsp23.2 ER</i>	GACGACGGTGGCAAGAAGAGCAT	CGCAACCATAGTTTCCACTCGACAA
<i>Hsp24.0 MI</i>	CGGAGGTGTACAGGATGGACCAGAT	GCTCCTACTCGAGTTGACCTGGAA
<i>Hsp26.2MI</i>	CGACATTGACCTGGAAGACGTCCTT	CCGACGCGTTCAAATGGACAA
<i>Hsp70</i>	GCCAAGCGTCAAGCAGTGACCAA	GGTCATCAAAGCGCCGCCCTAT
<i>Hsp90</i>	TTTGGGCGAAGGTGACTGCTA	TGGCAATGGTCCCAAGGTTCTTAAT
<i>Actina</i>	CAGCCACACTGTCCCCATCTA	AGCAAGGTCGAGACGAAGGA

Perfil de expressão digital de genes *HSPs* em diferentes estádios de desenvolvimento, diferentes órgãos e sob condição de anoxia em arroz

O perfil de expressão digital dos genes *HSPs* foi obtido usando ferramentas do programa *Genevestigator* (<http://www.genevestigator.ethz.ch>) para diferentes órgãos da planta, diferentes estádios de desenvolvimento e sob condições de estresse por anoxia (ZIMMERMAN et al., 2008).

Determinação de motivos conservados

Os motivos conservados presentes nas sequências de aminoácidos foram determinados utilizando o programa *Meme* (*Multiple Em for Motif Elicitation*) (http://meme.sdsc.edu/meme4_4_0/intro.html) versão 4.4.0 (BAILEY e ELKAN 1994). As sequências dos motivos foram analisadas pelo programa *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) para predizer a função de cada motivo encontrado.

5.3 Resultados e Discussão

***ADH* (Álcool desidrogenase) como indicador de anoxia**

O acúmulo de transcritos do gene codificador da enzima *ADH* foi utilizado como indicador das condições de anoxia (Fig. 1), devido a sua função na via metabólica fermentativa em condições de baixos níveis de O_2 (ANDREWS, 1993). Neste estudo, o gene *ADH* apresentou um aumento linear do acúmulo de transcritos para ambas as cultivares quando as plântulas de arroz foram submetidas a condições de anoxia. Entretanto, na cultivar Nipponbare (tolerante) ocorreu um aumento de 1 a 216 vezes, enquanto que na cultivar IPSL 2070 (sensível) este aumento foi de 1 a 905 vezes. O aumento da expressão do gene *ADH* já era esperado (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007), e comprova que as plantas estavam em condições de baixa disponibilidade de O_2 .

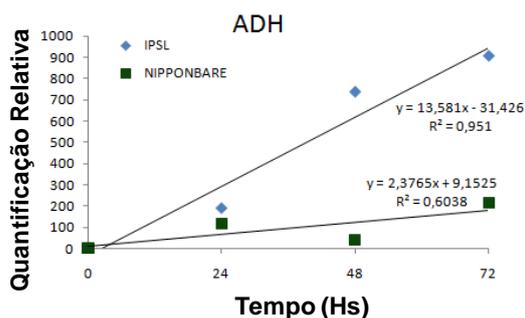


Figura 1 - Acúmulo de transcritos para o gene *ADH* (*Álcool desidrogenase*) em raízes de plântulas de arroz das cultivares Nipponbare e IPSL 2070, em condições de anoxia por diferentes períodos (0, 24, 48 e 72 horas).

Acúmulo de transcritos de genes *HSPs* e *HSF* por qPCR

Ao se comparar a eficiência do modelo, ou seja, haver indução da transcrição da *ADH* em anoxia, o perfil de expressão de um *HSF* (*HSFA3*), duas *HSPs* (*HSP70* e *HSP90*) e 10 *sHSPs* (*Hsp16PX*; *HSP16.6CVIII*; *HSP17.8CXI*; *HSP17.9ACI*; *HSP18.6CIII*; *HSP18.8CV*; *HSP19CII*; *HSP23ER*; *HSP24MI* e *HSP26MI*) também foi analisado (Fig. 2).

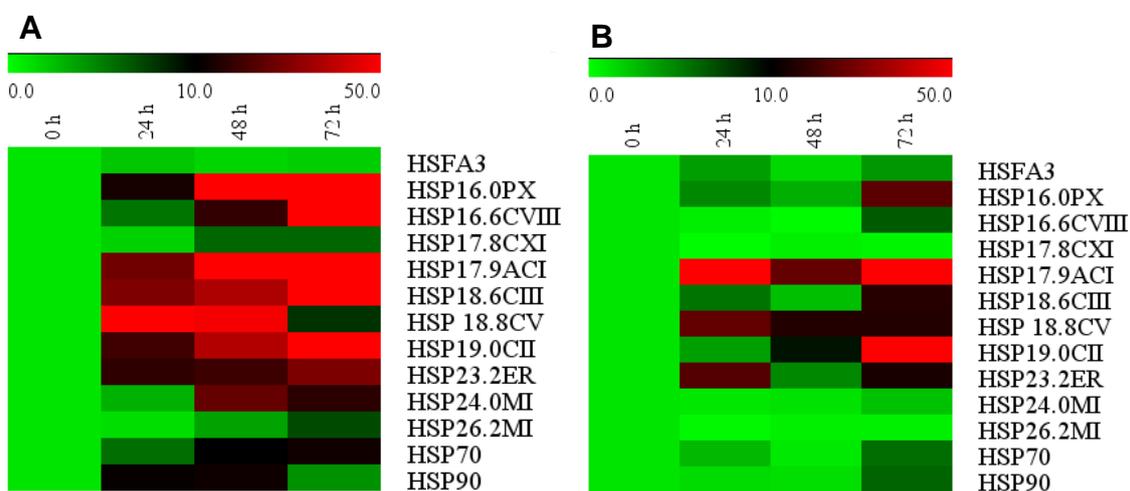


Figura 2 - Acúmulo de transcritos de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) em raízes de plântulas de arroz das cultivares IPSL 2070 (A) e Nipponbare (B) submetidas ao estresse por anoxia. Os níveis de transcritos foram representados em uma escala de 0-50, usando o programa *Multi Experiment Viewer* (*TIGR MeV*). O controle (0h) serviu como calibrador para determinar os níveis de expressão relativa em cada período de estresse analisado.

Com relação ao gene *HSFA3*, um leve aumento foi observado na cultivar Nipponbare, enquanto que na cultivar IPSL2070 a transcrição deste gene não foi

alterada. Este resultado sugere que este fator de transcrição não foi responsivo à condição de anoxia. Estudos desenvolvidos por Mittal et al., (2009) demonstraram que este fator de transcrição foi induzido em condições de estresses por calor, frio e anoxia, porém, a maior expressão foi observada nos estresses por calor e frio, sendo que em anoxia houve um aumento de 1.85 vezes, enquanto que nos estresses por calor e frio o aumento foi 9.68 e 9.83 vezes, respectivamente.

Dentre os genes *HSPs* estudados, a maioria foi induzida sob condições de estresse por anoxia (Fig. 2). O acúmulo de transcritos começou mais precocemente e com maior intensidade no genótipo IPSL 2070. Na cultivar IPSL 2070 após 24 horas em condição de estresse por anoxia, 9 genes foram induzidos, e destes, 7 apresentaram um aumento maior que 10 vezes. No entanto, na cultivar Nipponbare após 24 horas em condições de estresse, somente três genes apresentaram um aumento maior que 10 vezes.

Três genes (*HSP16PX*, *HSP16.6CVIII* e *HSP18.6CIII*) foram altamente induzidos na cultivar IPSL2070, logo que o estresse iniciou. Na cultivar Nipponbare, o aumento na transcrição destes três genes foi levemente notado após 72 horas de estresse. Na cultivar IPSL 2070, o gene *HSP17.8CXI* apresentou um aumento no nível de transcritos 48 horas após o estresse. Na cultivar Nipponbare nenhuma mudança foi observada para este gene. O gene *HSP17.9ACI* foi induzido para ambas as cultivares. Os genes *HSP18.8CV* e *HSP19CII* responderam de maneira semelhante em ambas as cultivares, logo que o estresse começou, mas um aumento foi observado na cultivar IPSL 2070 com o decorrer do tempo de estresse. O gene *HSP23ER* foi altamente induzido ao longo do tempo na cultivar IPSL 2070, e na cultivar Nipponbare mostrou variação no acúmulo de transcritos durante os períodos de exposição ao estresse. Na cultivar IPSL 2070, o gene *HSP24MI* apresentou um aumento nos níveis de transcritos após 24 horas de estresse, enquanto que na cultivar Nipponbare apresentou um leve aumento de expressão após 72 horas de estresse. O gene *HSP26MI* permaneceu levemente induzido na cultivar IPSL2070 e foi inalterado na cultivar Nipponbare.

Estudos prévios demonstram que há correlação entre o acúmulo de transcritos de *sHSPs* e tolerância das plantas a estresses ambientais, por exemplo, em milho, o incremento de *sHSPs* mitocondriais melhoraram o transporte de elétrons

na cadeia respiratória durante o estresse por sal (HAMILTON e HECKATHORN, 2001), e em *Agrostis stolonifera*, a *sHSP26.2* cloroplástica foi isolada de um variante resistente ao calor (WANG e LUTHE, 2003). Entretanto, os resultados obtidos neste estudo, sugerem que as *sHSPs* são expressas como resposta à anoxia, e não como um mecanismo de tolerância ao estresse.

Genes pertencentes às famílias HSP70 e HSP90 foram induzidos na cultivar IPSL 2070, enquanto que na cultivar Nipponbare a indução destes genes foi menor e mais tardia, somente 72 horas após o início do estresse. Da mesma forma que as *sHSPs*, as *HSPs* também são consequência do estresse por anoxia, e não estão diretamente envolvidas com o mecanismo de tolerância (Fig. 2).

De maneira geral, os resultados obtidos demonstram que a maioria dos genes (10/13) foram responsivos ao estresse por anoxia na cultivar IPSL 2070 (sensível ao alagamento), enquanto que na cultivar Nipponbare (tolerante ao alagamento), somente 6 genes (*HSP16PX*, *HSP17.9ACI*, *HSP16.6CIII*, *HSP18.8CV*, *HSP19CII*, *HSP23.2ER*) foram responsivos (em menores níveis e com resposta mais tardia). Estes resultados sugerem que, embora as proteínas HSPs citadas como importantes na prevenção de danos por estresses (PEGORARO et al., 2011), pelos resultados aqui obtidos, elas não são a causa primária da tolerância à anoxia.

As diferenças encontradas na resposta à anoxia entre os genótipos Nipponbare e IPSL2070 indicam que, nas condições testadas, o genótipo tolerante não ativa mais genes *HSPs* do que no genótipo sensível. Além disso, todos os genes ativados na cultivar Nipponbare também foram ativados na cultivar IPSL 2070.

Perfil de expressão digital de genes *HSPs* em diferentes estádios de desenvolvimento, diferentes órgãos da planta e sob condições de anoxia

A comparação entre os dados de acúmulo de transcritos em plantas de arroz da cv. Nipponbare submetidas ao estresse por anoxia (Fig. 2B) com os dados obtidos pelas análises no *Genevestigator* (Fig. 3) demonstram que 11 dos 13 genes *HSPs* apresentaram perfil de expressão similar. Dois genes (*HSP24MI* e *HSP26MI*) apresentaram diferentes níveis de expressão, permanecendo inalterados nas

análises de qPCR e induzidos nos resultados obtidos pelas análises no programa *Genevestigator* (dados de *microarray*).

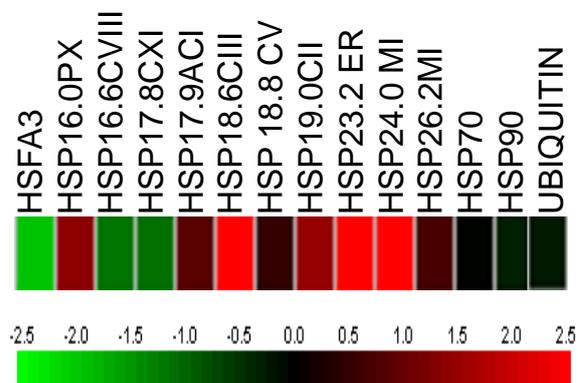


Figura 3 - Perfil de expressão de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) baseado em dados de *microarray*, em raízes de arroz da cultivar Nipponbare sob estresse por anoxia. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, obtido através do programa *Genevestigator*. A expressão do gene da *Ubiquitina* foi utilizada como controle.

Os dados de expressão para os diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de arroz (Fig. 4) indicam que o fator de transcrição *HSFA3* e quatro genes *HSPs* (*HSP18.9CV*, *HSP26.2MI*, *HSP70* e *HSP90*) são expressos em todo o ciclo da planta, porém em diferentes níveis de expressão, sugerindo uma atividade constitutiva destes genes. Estudos prévios já haviam demonstrado que as famílias *HSP70* e *HSP90* são constitutivamente expressas na maioria dos organismos (WANG et al., 2004). Além disso, observou-se que no estádio de grão leitoso todos os genes foram expressos e a maioria manteve a expressão até o estádio de grão farináceo. Nos estádios de germinação e plântula, a maioria dos genes *HSPs* não foram expressos, confirmando que o alto nível de expressão obtidos por qPCR neste trabalho, foram induzidos por anoxia.

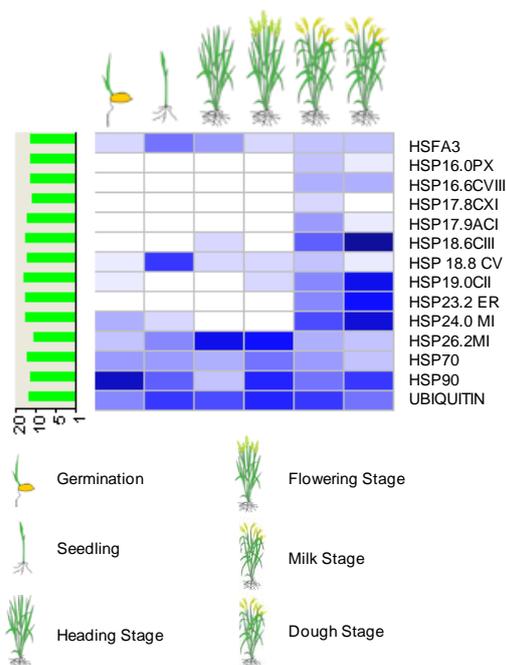


Figura 4 - Perfil de expressão de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) baseado em dados de *microarray*, em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de arroz. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, obtido através do programa *Genevestigator*. *Germination*: germinação; *Seedling*: plântula; *Heading stage*: espigamento; *Flowering stage*: florescimento; *Milk stage*: grão leitoso; *Dough stage*: formação final do grão.

Similarmente aos estádios de desenvolvimento, os dados de expressão para os diferentes órgãos da planta (Fig. 5) demonstram que os genes *HSP26.2MI*, *HSP70* e *HSP90* foram expressos de maneira constitutiva em todos os órgãos da planta, e os genes *HSFA3* e *HSP18.8CV* foram expressos na maioria dos órgãos, demonstrando a importância destes genes durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, na inflorescência e na semente todos os genes foram expressos. Estudos desenvolvidos por (WEHMEYER et al., 1996; SABEHAT et al., 1998) já haviam reportado a alta expressão de algumas *sHSPs* em tecidos embriogênicos e frutos em crescimento.

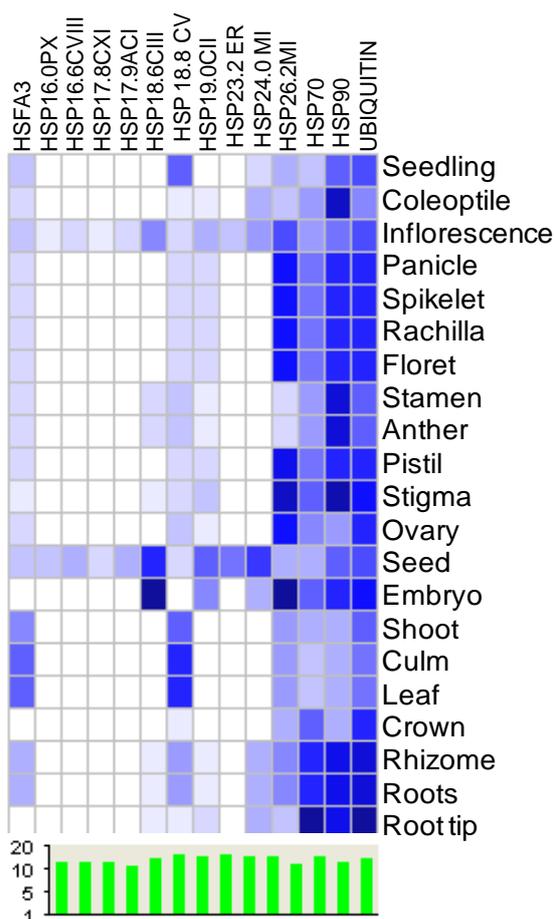


Figura 5 - Perfil de expressão de genes *HSPs* (*Heat shock proteins*) baseado em dados de *microarray*, em diferentes órgãos de plantas de arroz. O perfil de expressão é apresentado como *heat map*, obtido através do programa Geneinvestigator. *Seedling*: plântula; *Coleoptile*: coleótilo; *Inflorescência*: inflorescência; *Panicle*: panícula; *Spikelet*: espigueta; *Rachilla*: ráquis; *Floret*: flor; *Stamen*: estame; *Anther*: antera; *Pistil*: pistilo; *Stigma*: estigma; *Ovary*: ovário; *Seed*: semente; *Embryo*: embrião; *Shoot*: broto; *Culm*: colmo; *Leaf*: folha; *Crow*: coroa; *Rhizome*: rizoma; *Roots*: raízes; *Root tip*: ponta da raiz.

Motivos conservados

Neste estudo foram identificados dois motivos conservados (RVDQVSASMDNGVLTVTVIPK e KETPTAHVFTADLPGVRKDQAKVEVED) dentre as sHSPs (Fig. 6). As análises no programa *Pfam* indicam que estes motivos pertencem ao domínio *alpha crystallin*. Dentre as demais HSPs não foram encontrados motivos conservados. Este resultado já era esperado, uma vez que as HSPs apresentam similaridade somente dentro de cada classe.

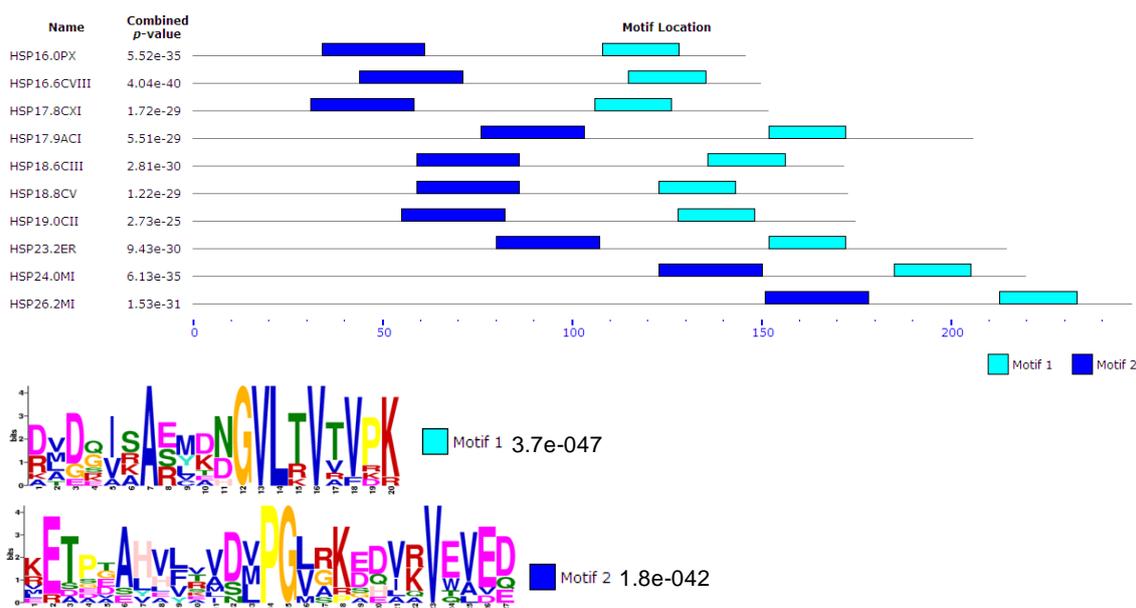


Figura 6 - Motivos de sHSPs (*Small heat shock proteins*) identificados em arroz baseado na sequência de proteínas, obtidos a partir de análises no programa *Meme*. Os motivos foram plotados de acordo com a posição dentro da sequência.

5. 4 Conclusões

O genótipo Nipponbare responde ao estresse por anoxia com a ativação de menor número de genes *HSPs* em relação ao genótipo IP SL2070, sugerindo que proteínas *HSPs* têm um papel importante na resposta ao estresse por anoxia, entretanto não estão diretamente envolvidas na tolerância.

5.5. Referências Bibliográficas

- ANDREWS, D.L.; COBB, B.C.; JOHNSON, J.R.; DREW, M.C. Hypoxic and Anoxic Induction of Alcohol Dehydrogenase in Roots and Shoots of Seedlings of *Zea mays*. **Plant Physiology**. v. 101, p. 407-414. 1993.
- BAILEY, T.L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**. p. 28-36. 1994.
- BANTI, V.; MAFESSONI, F.; LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 152, p. 1471-1483. 2010

- COLMER, T.D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell Environment**. v. 26, p. 17-36. 2003.
- FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia - is survival a balancing act. **Trends in Plant Science**. v. 9, p. 449-456. 2004.
- FUKAO, T.; XU, K.N.; RONALD, P.C.; BAILEY-SERRES, J. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. **Plant Cell**. v. 18, p. 2021-2034. 2006.
- HAMILTON, E.W.; HECKATHORN, S.A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. **Plant Physiology**. v. 126, p. 1266-1274. 2001.
- LASANTHI-KUDAHETTIGE, R.; MAGNESCHI, L.; LORETI, E.; GONZALI, S.; LICAUSI, F.; NOVI, G.; BERETTA, O.; VITULLI, F.; ALPI, A.; PERATA, P. Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. **Plant Physiology**. v. 144, p. 218-231. 2007.
- LORETI, E.; POGGI, A.; NOVI, G.; ALPI, A.; PERATA, P. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression expression in Arabidopsis seedlings under anoxia. **Plant Physiology**. v. 137, p. 1130-1138. 2005.
- MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 14, p. 8271-8276. 1999.
- MITTAL, D.; CHAKRABARTI, S.; SARKAR, A.; SINGH, A.; GROVER, A. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, p. 785-795. 2009.
- PEGORARO, C.; MERTZ, L. M.; MAIA, L.C.; ROMBALDI, C.V.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Importance of Heat Shock Proteins in Maize. **Journal of Crop Science and Biotechnology**. v. 14, p. 85-95. 2011.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 45. 2001.
- SABEHAT, A.; LURIE, S.; WEISS, D. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries. **Plant Physiology**. v. 117, p. 651-658. 1998.

- SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, p. 374-378. 2003.
- SARKAR, N-K.; KIM, Y.; GROVER, A. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics* 2009, 10(1): 393.
- SIANGLIW, M.; TOOJINDA, T.; TRAGOONRUNG, S.; VANAVICHIT, A. Thai jasmine rice carrying QTLch9 (*SubQTL*) is submergence tolerant. **Annals of Botany**. v. 91, p. 255-261. 2003.
- SUN, W.; VAN, MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1577, p. 1-9. 2002.
- VOESENEK, L.A.C.J.; COLMER, T.D.; PIERIK, R.; MILLENARR, F.F.; PEETERS, A.J.M. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**. v. 170, p. 213-226. 2006.
- XU, K.; XU, X.; FUKAO, T.; CANLAS, P.; RODRIGUEZ-MAGHIRANG, R.; HEUER, S.; ISMAIL, A.; BAILEY-SERRES, J.; RONALD, P.C.; MACKILL, D.J. Sub1A is an ethylene-response-factor like gene confers submergence tolerance to rice. **Nature**. v. 442, p. 705-708. 2006.
- WANG, D.; LUTHE, D.S. Heat sensitivity in a bentgrass variant. Failure to accumulate a chloroplast heat shock protein isoform implicated in heat tolerance. **Plant Physiology**. v. 133, p. 319-327. 2003.
- WANG, W.; VINO CUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**., v. 9, p. 244-252. 2004.
- WEHMEYER, N.; HERNANDEZ, L.D.; FINKELSTEIN, R.R.; VI Erling, E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. **Plant Physiology**. v. 112, p. 747-757. 1996.

ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.; GRUISSEM, W. Genevestigator Transcriptome Meta-Analysis and Biomarker Search Using Rice and Barley Gene Expression Databases. **Molecular Plant**. v. 5, p. 851-857. 2008.

ZOU, J.; GUO, Y.; GUETTOUCHE, T.; SMITH, D.F.; VOELLMY, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by Hsp90 (Hsp90 complex) that forms a stress sensitive complex with HSF1. **Cell**. v. 94, p. 471-480. 1998.

6 CAPÍTULO V

Efeito do armazenamento em hipoxia sobre o acúmulo de transcritos de genes HSPs durante o amadurecimento de frutos de tomate

Camila Pegoraro, Railson Schreinert dos Santos, Mariana Madruga Krüger, Aline Tiecher, Luciano Carlos da Maia, Cesar Valmor Rombaldi, Antonio Costa de Oliveira

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicon* L.) é um fruto climatérico, com amadurecimento acelerado devido ao aumento na síntese de etileno e à alta taxa respiratória. Baixos níveis de O₂ podem inibir ou bloquear a biossíntese de etileno, retardando a maturação dos frutos. Comercialmente, a aplicação de baixas taxas de O₂ visando o aumento da vida de prateleira de frutos é uma tecnologia bastante utilizada, entretanto, o modo de ação dos baixos níveis de O₂ nos tecidos dos frutos e no retardamento do processo de amadurecimento ainda não é bem elucidado. Com o objetivo de determinar as respostas moleculares em frutos submetidos ao estresse por baixos níveis de O₂, genes responsivos a hipoxia codificadores de HSFs (*Heat shock factors*), HSPs (*Heat shock proteins*) e enzimas envolvidas nas rotas fermentativa e de biossíntese de etileno foram analisados. Neste estudo, observou-se que em frutos armazenados sob hipoxia os genes *HSP17.7* e *HSP21* foram altamente induzidos por baixos níveis de oxigênio, indicando um papel primário destes genes na manutenção da homeostase celular após este estresse.

Palavras-chave: expressão gênica, proteínas de choque térmico, *Solanum lycopersicon*.

6.1 Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicon* L.) é a segunda hortaliça de maior importância econômica do mundo (VIDOZ et al., 2010), sendo considerado um componente da dieta humana devido ao alto conteúdo de antioxidantes e vitaminas

e seu uso versátil na culinária (LEÓN-SÁNCHEZ et al., 2009). Por ter seu genoma sequenciado, o tomate destaca-se por ser uma espécie modelo para estudos de genômica em frutos carnosos (AHSAN et al., 2007). Devido a sua importância, este fruto recebe atenção diferenciada, e muitos estudos relacionados a rotas moleculares durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos já foram e continuam sendo desenvolvidos (VIDOZ et al., 2010; CENTENO et al., 2011).

O tomate é um fruto climatérico, com curta vida de prateleira devido ao metabolismo acelerado durante o amadurecimento em função do aumento da produção de etileno e da alta taxa respiratória. A síntese do etileno é coordenada por uma família multigênica envolvida no metabolismo do ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico). As enzimas ACS (ACC Sintase) (EC 4.4.1.14) e ACO (ACC Oxidase) (EC 1.14.17.4), especialmente ACS2, ACS4 e ACO1 estão envolvidas na produção de etileno de frutos climatéricos (WHITE, 2002; BARRY e GIOVANNONI, 2007). A etapa final da biossíntese de etileno requer O_2 (oxigênio) molecular, o qual permite a conversão do ACC em etileno. Neste sentido, a baixa concentração de O_2 pode resultar na inibição ou bloqueio da biossíntese de etileno pela ação direta na última etapa. Desta forma, para diferentes tipos de frutos, o armazenamento sob condições de hipoxia é rotineiramente utilizado visando retardar o processo de amadurecimento (RAMONELL et al., 2002).

Comercialmente, para que ocorra a diminuição da disponibilidade de O_2 , utilizam-se revestimentos de cera, embalagens plásticas e armazenamento em câmaras com controle das taxas de O_2 e CO_2 (atmosfera controlada) (PASENTSIS et al., 2007). Apesar da utilização de baixos níveis de O_2 como prática comercial visando o retardamento da maturação, o impacto da ausência parcial de O_2 nos tecidos dos frutos, assim como no atraso do processo de amadurecimento é pouco entendido. Estudos previos demonstram que a aplicação de baixos níveis de O_2 (2.5-5.5%) inibe a indução de enzimas associadas ao processo de amadurecimento (KANELLIS et al., 1991). Além disso, análises de mRNA em frutos climatéricos revelam que em baixos níveis de O_2 ocorre a indução de novas espécies de mRNA, sugerindo uma resposta complexa ao estresse, envolvendo mais que uma simples mudança de adaptação no metabolismo energético (LOULAKAKIS et al., 2006).

A rota fermentativa apresenta um papel importante na resposta a hipoxia/anoxia. As enzimas ADH (Álcool desidrogenase) (EC 1.1.1.1) e PDC (Piruvato decarboxilase) (EC 4.1.1.1) com atividade na fermentação etanólica, e LDH (Lactato desidrogenase) (EC 1.1.1.27) com atividade na fermentação láctica são componentes chaves na rota fermentativa (TADEGE et al., 1999; ISMOND et al., 2003; BIENIAWSKA et al., 2007). Além disso, genes de resposta ao calor, incluindo os genes que codificam fatores de transcrição como os HSFs (*heat shock factors*) e as proteínas de choque térmico HSPs (*heat shock proteins*) se mostram presentes nos perfis de expressão gênica de plantas sob condições de estresse por deficiência de O₂ (LORETI et al., 2005; BANTI et al., 2010).

Neste sentido, com o objetivo de correlacionar as respostas moleculares ao estresse por hipoxia com o amadurecimento de frutos de tomate, a expressão de 12 genes envolvidos em rotas de sinalização em resposta a estresses foram analisados.

6.2 Material e Métodos

Material Vegetal

O experimento foi conduzido no CGF/FAEM/UFPel. Frutos de tomate (*Solanum lycopersicon* cv. FavorTop) colhidos no estágio *breaker* foram armazenados em duas condições: hipoxia e normoxia. Em normoxia, os frutos foram armazenados em temperatura ambiente (TA) (23°C e 75% de umidade relativa) com amostras coletadas 0 (N), 1 (N-1d), 3 (N-3d) e 5 (N-5d) dias após colheita. Sob hipoxia, os frutos foram acondicionados em frascos de vidro de 0.5 L com baixos níveis de O₂ (0.6 KPa) através da injeção de N₂ e armazenados à TA durante três dias. Posteriormente, os frutos foram transferidos para condições de normoxia, com amostras coletadas 0 (H), 1 (H-1d), 3 (H-3d) e 5 (H-5d) dias após o armazenamento em hipoxia. Ambos os tratamentos foram mantidos no escuro até o período das coletas. Para cada tratamento, três replicatas biológicas foram feitas, e cada replicata consistiu de 5 frutos. Após cada período, a coloração foi medida, e os frutos

foram coletados e imediatamente congelados com N₂ líquido e armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA.

Cor

As mudanças na coloração durante o amadurecimento em ambas as condições de normoxia e hipoxia foram avaliadas usando o colorímetro *Minolta colorimeter CR-300*, com iluminação D65 e abertura de 8 mm, com os parâmetros L*, a* e b* (CIE-Lab) (Konica Minolta, Osaka, Japan). Foram realizadas duas leituras em lados opostos de cada um dos cinco frutos. Os resultados foram expressos em ângulo hue (h°), pela equação $h^{\circ} = \tan^{-1} b^*/a^*$ (MCGUIRE, 1992). Os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e submetidos a análise de variância ($p \leq 0.05$). O efeito do tempo dentro de cada tratamento foi avaliado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$) e o efeito do tempo entre os tratamentos foi avaliado pelo teste t ($p \leq 0.05$).

Análises de qPCR

Um grupo de 12 genes (tab. 1) foram avaliados. As sequências foram obtidas no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Sol Genomic Network* (<http://solgenomics.net/>). Os iniciadores foram desenhados utilizando o software Vector (Invitrogen™). A seleção dos iniciadores foi feita de acordo com as recomendações da Applied Biosystems®. O RNA total foi extraído a partir de 0.1 g do pericarpo a partir de um *pool* de frutos de tomate utilizando o tampão de extração *PureLink™ Plant RNA Reagent*® (Invitrogen). Posteriormente, as amostras foram tratadas com *DNase I* (Invitrogen™) seguindo as instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA total foram asseguradas por espectrofotômetro e gel de agarose (2% m/v), respectivamente. Os cDNAs foram obtidos a partir de 2 µg of RNA usando o kit *SuperScript III First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™).

Tabela 1 - Lista de iniciadores específicos utilizados para análises de qPCR

Gene	Identificação	Senso	Antisenso
PDC	Solyc02g077240 ^a	AACAATGCCATCGGTTCCACG	AAGTTGAAGTCGCCGGGAACC
ADH	Solyc01g087640	TACTGTCAACGCCACTGTTCCGA	TCATTGCTCCATCAAGGCCTAG
LDH	Solyc08g078850	CGGAAACGTCGGTATGGCAAT	GGATCTTCGTACGCGGCAGAA
ACO1	gi: 1054800 ^b	TCCACCATGTCTAAGCCCGA	CGCATGGGAGGAACATCGATC
HSFA3	gi: 264666930	TTGAGTTGCAGCAGCAGCAGC	GCCGAACACGAGCCAAGAATG
HSP17.6	gi: 1773290	ATGATGGAAGCTGCCGGTGAA	GCCATGGCCTTAGCATCACGA
HSP17.7	gi: 4836468	GATCGACGAAGCAGCAGCATG	TGGCAAATGCAGAGCTCTCCC
HSP21	gi: 1518138	TCGTTCCGTCGATGAGAAGGC	CGGCAGTGCCTTGTTGTTTC
HSP23.6	gi: 3492853	ATGACCAGGATGATCGTGCGG	AAAGCATCACGGCGAGAGACG
HSP70	Solyc06g076020	ATGGCCGAAAAGGTGAAGGA	ATCATGTTGCCAAACGCCGAC
HSP90	Solyc06g036290	ATCCGGTTCGAGAGCTTGACG	TCAGGCTGCGCATCGAGTTTA
HSP110	Solyc02g088610	TTCCGGCGTACAGTTTTGCG	TACGGCGTGAATGGGATGAA
UBI	gi: 19396 ^c	GGTTAAGCTCGCTGTGTTGCA	CGAAGCCTCTGAACCTTTCCA

^a Sequências obtidas a partir do banco de dados *Sol Genomic Network* (<http://solgenomics.net/>).

^b Sequências obtidas a partir do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Iniciadores obtidos a partir de Maloney et al. (2010).

As análises de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em equipamento *7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems®). As condições para reação de amplificação foram as seguintes: dois minutos a 50°C, seguido por 10 minutos a 95°C, 40 ciclos (95°C por 30 s/ 59°C por 1 min/ 72°C por 1 min), e extensão final a 72°C por 5 min, seguido por curva de dissociação. O CT (*Cycle Threshold*) foi obtido, e os níveis de expressão foram calculados basedos na região exponencial da curva de reação de PCR (Applied Biosystems®). Para cada gene analisado, o gene codificador da Ubiquitina foi utilizado como normalizador para quantificar a abundância de cDNA. Os níveis de expressão relativa foram calculados usando a fórmula $REL=2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHIMITTGEN, 2001). Os dados de expressão gênica foram analisados usando o software *Multi Experiment Viewer* (*Mev*) e apresentados como *heat map* usado o estágio colheita como calibrador (SAEED et al., 2003).

Localização celular dos genes estudados

A identificação da região N-terminal de cada sequência de aminoácidos foi feita usando o software *Target P 1.1 Server*

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). *Target P* é programado para prever a localização celular baseado na presença ou ausência de peptídeo de trânsito na região N-terminal para cloroplasto, peptídeo alvo para mitocôndria ou sinal para rota secretória (NIELSEN et al., 1997; EMANUELSSON et al., 2000).

6.3. Resultados e Discussão

O amadurecimento de frutos armazenados em condições de normoxia ocorreu naturalmente, apresentando mudança da coloração verde para vermelho (Fig. 1, Tab. 2). A mesma mudança foi observada para os frutos que passaram por armazenamento sob condições de hipoxia, mas neste caso, o processo foi atrasado em três dias (tempo de armazenamento). Além disso, durante o quinto dia após o armazenamento em hipoxia (8 dias após a colheita), os frutos apresentaram maiores valores do ângulo h° quando comparado com o quinto dia após a colheita de frutos mantidos em condições de normoxia. O processo de mudança de coloração, resultante da degradação de clorofilas e o acúmulo de carotenóides (ALEXANDER e GRIERSON, 2002) é fortemente ligado com a biossíntese de etileno em tomate (EUM et al., 2009; EGEA et al., 2001). Em baixos níveis de O_2 , a biossíntese de etileno é diminuída (ALEXANDER e GRIERSON, 2002), atrasando o amadurecimento e reduzindo as alterações de coloração como foi observado neste trabalho.

Tabela 2 - Coloração da epiderme de frutos de tomate submetidos a condições de normoxia e hipoxia

	Ângulo Hue ^{1/}	
	Normoxia	Três dias após hipoxia
0 dia	111.25a ^{ns}	110.89a ^{2/}
1 dia	113.75a*	110.79a
3 dias	97.18b ^{ns}	96.24b
5 dias	71.12c*	80.95c

^{1/} Ângulo Hue: 0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde, 270° = azul, 360 = preto.

^{2/} Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

^{ns} e * Não significativo e significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0.05$) comparando Normoxia e Hipoxia.



Figura 1 - Coloração do epicarpo em frutos de tomate em condições de normoxia e pós-hipoxia. **A:** Colheita/Normoxia (N), **B:** Normoxia + 1 dia (N-1d), **C:** Normoxia + 3 dias (N-3d), **D:** Normoxia + 5 dias (N-5d), **E:** Hipoxia durante 3 dias (H), **F:** Após Hipoxia + 1 dia (H-1d), **G:** Após Hipoxia + 3 dias (H-3d), **H:** Após Hipoxia + 5 dias (H-5d).

Os perfis de transcritos dos genes que codificam três enzimas que atuam na rota fermentativa (*ADH*, *PDC* e *LDH*), uma enzima envolvida na síntese de etileno (*ACO1*), um HSF (*HSFA3*), três HSPs (*HSP70*, *HSP90* e *HSP110*) e quatro sHSPs (*HSP17.6*, *HSP17.7*, *HSP21* e *HSP23.6*) foram afetados pelo estresse por hipoxia em frutos de tomate (Fig. 2). Os genes avaliados foram classificados em expressão baixa (0-2.5X), média (0- 15X) e alta (0-750X) de acordo com a taxa de aumento. A maioria dos genes apresentou expressão relativamente baixa (7/12), uma quantidade intermediária de genes apresentou expressão média (3/12) e poucos genes foram altamente expressos (2/12).

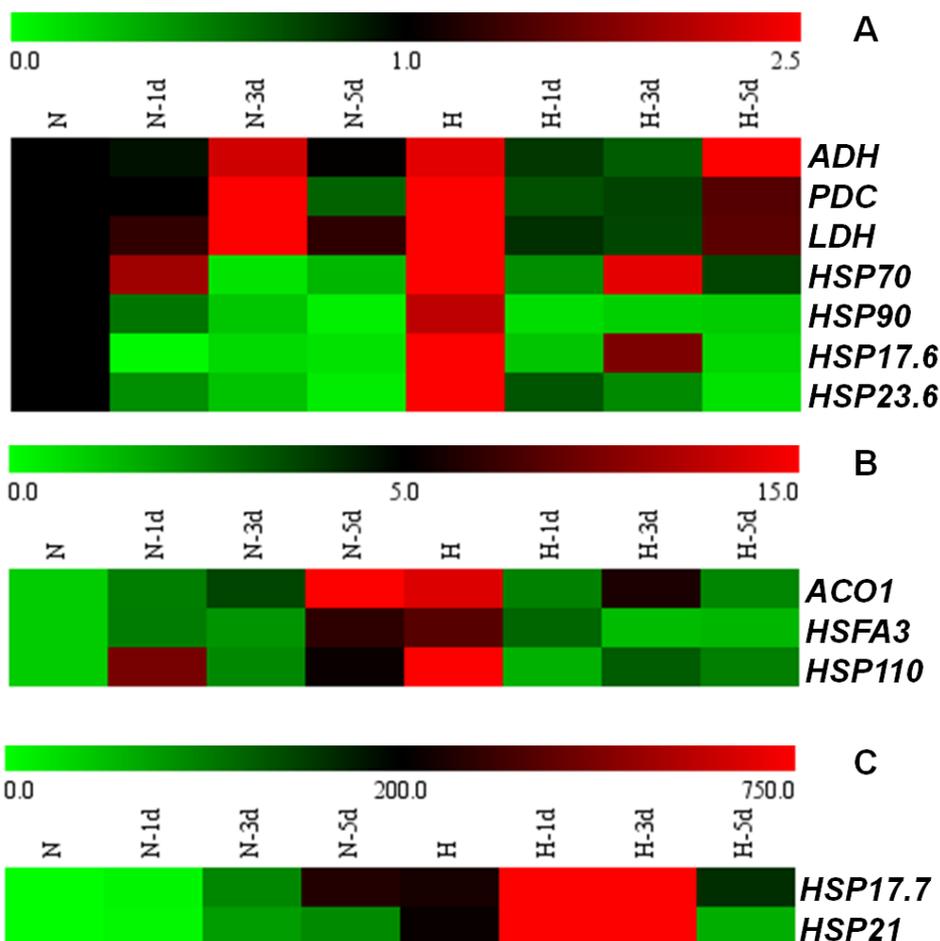


Figura 2 - Acúmulo de transcritos em frutos de tomate (*Solanum lycopersicon* cv. FlavorTop) em diferentes formas de armazenamento. A expressão gênica foi representada em diferentes escalas, usando o programa *Multi Experiment Viewer (TIGR MeV)*. O acúmulo de mRNA da **N** (colheita/Normoxia) serviu como calibrador para determinar os níveis de transcritos dos genes avaliados, onde **N-1d**: Normoxia + 1 dia, **N-3d**: Normoxia + 3 dias, **N-5d**: Normoxia + 5 dias, **H**: Hipoxia durante 3 dias, **H-1d**: Após Hipoxia + 1 dia, **H-3d**: Após Hipoxia + 3 dias e **H-5d**: Após Hipoxia + 5 dias. Os genes avaliados neste estudo foram **ADH**: álcool desidrogenase, **PDC**: piruvato decarboxilase, **LDH**: lactato desidrogenase, **ACO1**: ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano, **HSF3**: fator de choque de calor, **HSPs**: proteína de choque térmico 70, 90 e 110, e **sHSPs**: pequena proteína de choque térmico 17.6, 17.7, 21 e 23.6.

Os três genes que codificam enzimas envolvidas na rota fermentativa (*PDC*, *ADH* e *LDH*) (Fig. 2A) apresentaram um aumento no nível de transcritos em N-3d, H e H-5d. Esta elevação da expressão em H já era esperada, uma vez que baixos níveis de O_2 induzem as rotas fermentativas. Sugere-se que a baixa expressão dos genes *ADH*, *LDH* e *PDC* em H-1d e H-3d é devida, provavelmente, ao retorno da respiração aeróbica dos frutos na presença O_2 , e a um estágio de amadurecimento menos avançado. A indução do gene *ADH* em N-3d e H-5d pode ser devida à contribuição da *ADH* no desenvolvimento de aromas através da interconversão de

aldeídos e diferentes formas de alcoóis em compostos voláteis originados de lipídios e aminoácidos durante o processo de amadurecimento (LEÓN-SÁNCHEZ et al., 2009). O processo de descarboxilação do piruvato a acetaldeído, o qual é reduzido a álcool pela ADH é coordenado pela enzima PDC (TADEGE et al., 1999), o que explicaria os altos níveis de expressão do gene codificador desta enzima em N-3d e H-5d. O acúmulo de transcritos para o gene *LDH* em N-3d e H-5d possivelmente ocorreu devido à necessidade da oxidação do piruvato na direção inversa visando à redução do acúmulo de etanol na célula.

O gene *ACO1* (Fig. 2B) mostrou aumento linear durante o avanço da maturação. Os níveis de transcritos deste gene também aumentaram imediatamente após o armazenamento em condições de hipoxia e diminuiu após esta condição, indicando uma baixa produção de etileno após o armazenamento em baixos níveis de O_2 . Isso pode ser confirmado pelo atraso no desenvolvimento da coloração vermelha nos frutos que passaram por armazenamento sob hipoxia. Estudos anteriores já demonstraram que a hipoxia ou a baixa relação O_2/CO_2 reprimem a síntese e a atividade do etileno em tomates (PAUL et al., 2010).

O gene *HSFA3* (Fig. 2B) apresentou um aumento no acúmulo de transcritos em N-5d, quando os frutos se encontravam no ciclo final da maturação. A transcrição do gene codificador deste fator de transcrição também foi induzida quando os frutos foram submetidos ao armazenamento em hipoxia, e reprimida quando os frutos foram removidos para maturação em condições de normoxia. A indução de genes *HSF* em condições de baixos níveis de O_2 já tem sido observada em *Arabidopsis*, e a tolerância a anoxia nesta espécie é devida a superexpressão do gene *HSFA2* (BANTI et al., 2010). O alto nível de transcritos do gene *HSFA3* após condições de hipoxia sugere um papel importante deste fator de transcrição na manutenção da homeostase celular após o estresse por baixos níveis de O_2 .

Os genes que codificam HSPs de alto peso molecular mostraram expressão variável (Fig. 2A e 2B). O gene *HSP70* mostrou alto acúmulo de transcritos em N-1d, H e H-3d. A expressão do gene *HSP90* diminuiu linearmente durante o amadurecimento normal e aumentou imediatamente após o armazenamento sob hipoxia. *HSP110* foi expresso em N-1d e apresentou um leve aumento em N-5d, este gene foi altamente expresso imediatamente após o armazenamento em hipoxia,

mas decresceu ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que estes genes estão envolvidos no processo de amadurecimento e têm uma pequena contribuição na manutenção da homeostase celular após o estresse por hipoxia em frutos de tomate. Estudos prévios demonstram que em tomates, diferentes genes *HSPs* têm sido identificados como genes induzidos pelo processo de amadurecimento (FEI et al., 2004). Por exemplo, um estudo desenvolvido por Ramakrishna et al. (2003), descreveu o envolvimento de uma pequena HSP na despolimerização de pectinas durante o amadurecimento de tomates. Entretanto, o papel das HSPs durante o amadurecimento permanece pouco conhecido.

Os genes *HSP17.6* e *HSP23.6* apresentaram um decréscimo na expressão após a colheita, e um leve aumento após o armazenamento sob hipoxia (Fig. 2A). Estes resultados sugerem que estes genes são co-regulados por baixos níveis de O_2 . Por outro lado, os genes *HSP17.7* e *HSP21* foram fortemente induzidos por baixos níveis de O_2 , atingindo um aumento de aproximadamente 750 vezes mais que os outros dois genes *sHSPs* (Fig. 2C). Estes resultados sugerem que as proteínas *HSP17.7* e *HSP21* são necessárias em grandes quantidades para compensar os efeitos da hipoxia, atuando menos especificamente, e as proteínas *HSP17.6* e *HSP23.6* são necessárias em menores quantidades, uma vez que possivelmente atuam sobre um menor número de moléculas. Ramakrishna et al. (2003) descreveu que algumas HSPs atuam durante a maturação para proteger o maquinário celular contra desnaturação térmica provocada por picos de temperatura que acontecem durante o dia. A indução de alguns membros da família HSP em resposta ao estresse por hipoxia pode ser uma resposta independente induzida por esta condição, e também pode ser considerada uma resposta complexa que afeta todo o processo de amadurecimento do fruto. Entretanto, para haver uma confirmação desta hipótese, é necessária uma investigação mais aprofundada, desenvolvendo estudos de superexpressão e silenciamento, para assegurar a exata função destes genes.

A importância das HSPs em resposta a diferentes estresses já foi descrita por trabalhos anteriores em diferentes espécies, como *Zea mays* L. ssp. *mays* (LUND et al., 2001), *Agrostis stolonifera* L. (HECKATHORN et al., 2002), *Oryza sativa* L. (MURAKAMI et al., 2004; SARKAR et al., 2009), *Rosa chinensis* Jacq. (JIANG et al.,

2009), *Prunus salicina* Lindl. (SUN et al., 2010), *Prunus persica* L. Batsch. (PEGORARO et al., 2010) e *Daucus carota* L. (SONG et al., 2011), os quais também reportaram a indução de genes *HSPs* em resposta a diferentes estresses.

As análises *in silico* indicam que quatro dos 12 genes estudados codificam proteínas residentes em plastídios (*PDC*, *LDH*, *HSP21* e *HSP110*), dois codificam proteínas residentes em mitocôndrias (*HSP17.7* e *HSP23.6*) e um codifica uma proteína residente na rota secretória (*HSP90*), os outros genes codificam proteínas que atuam em outros locais da célula, principalmente no citosol (tab. 3).

Tabela 3 - Localização celular dos genes estudados

Proteína	Localização^a	Probabilidade
PDC	Cloroplasto	82%
ADH	Outro	58%
LDH	Cloroplasto	73%
ACO1	Outro	91%
HSFA3	Outro	89%
HSP17.6	Outro	87%
HSP17.7	Mitocôndria	30%
HSP21	Cloroplasto	87%
HSP23.6	Mitocôndria	87%
HSP70	Outro	85%
HSP90	Rota Secretoria	44%
HSP110	Cloroplasto	97%

^a Localização celular prevista por análises da região N-terminal utilizando o programa TargetP 1.1 Server software.

Em plantas, as organelas de metabolismo energético (cloroplasto, mitocôndria e peroxisomos) são responsáveis pela maioria dos processos metabólicos, incluindo fotorrespiração, β -oxidação, fosforilação oxidativa e ciclo do ácido tricarbóxico (TAYLOR et al., 2009). Os plastídios têm um papel importante na homeostase celular, incluindo reciclagem de carbono, biossíntese de hormônios, vitaminas e aminoácidos aromáticos. Também integram numerosas rotas metabólicas importantes nas respostas adaptativas das plantas em condições de estresse ambiental extremo. Este fato explicaria a expressão extrema do gene *HSP21* plastidial como resposta ao estresse por hipoxia, em busca da adaptação a esta condição. As mitocôndrias também apresentam um papel fundamental sob

condições de hipoxia, uma vez que esta organela é altamente sensível às mudanças nos níveis de O₂, devido à dependência deste gás para o seu funcionamento normal (DAT et al., 2004). Assim, acredita-se que a alta expressão do gene *HSP17.7* mitocondrial é um mecanismo de defesa da célula contra o estresse. Para se testar esta hipótese, estão sendo geradas linhagens com elevada e baixa expressão da *sHSP17.7* mitocôndrial.

6.4 Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 2039-2055. 2002.
- AHSAN, N.; LEE, D.G.; LEE, S.H.; LEE, K.W.; BAHK, J.D.; LEE, B.H. A proteomic screen and identification of waterlogging-regulated proteins in tomato roots. **Plant Soil**. v. 295, p. 31-57. 2007.
- BANTI, V.; MAFESSONI, F.; LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. (2010) The Heat-Inducible Transcription Factor HsfA2 Enhances Anoxia Tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 152, p. 1471-1483. 2010.
- BARRY, C.S.; GIOVANNONI, J.J. Ethylene and Fruit Ripening. **The Journal of Plant Growth Regulation**. v. 26, p. 143-159. 2007
- BIENIAWSKA, Z.; BARRATT, D.H.P.; GARLICK, A.P.; THOLE, V.; KRUGER, N.J.; MARTIN, C.; ZRENNER, R.; SMITH, A.M. Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. **The Plant Journal**. v. 49, p. 810-828. 2007.
- CENTENO, D.C.; OSORIO, S.; NESI, A.N.; BERTOLO, A.L.F.; CARNEIRO, R.T.; ARAÚJO, W.L.; STEINHAUSER, M.C.; MICHALSKA, J.; ROHRMANN, J.; GEIGENBERGER, P.; OLIVER, S.N.; STITT, M.; CARRARI, F.; ROSE, J.K.C.; FERNIEA, A.R. Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. **Plan Cell**. v. 23, p. 162-184. 2011.
- DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; BADOT, P.M. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42, p. 273-282. 2004.

- EGEA, I.; BIAN, W.; BARSAN, C.; JAUNEAU, A.; PECH, J-C.; LATCHÉ, A.; LI, Z.; CHERVIN, C. Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. **Annals of Botany**. v. 108, p. 291-297. 2011.
- EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. Predicting subcellular LOCALization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, p. 1005-1016. 2000.
- EUM, H.L.; HO, B.K.; CHOI, S.B.; LEE, S.K. Regulation of ethylene biosynthesis by nitric oxide in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit harvested at different ripening stages. **European Food Research and Technology**. v. 228, p. 331-338. 2009.
- FEI, Z.J.; TANG, X.; ALBA, R.M.; WHITE, J.A.; RONNING, C.M.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D.; GIOVANNONI, J.J. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. **The Plant Journal**. v. 40, p. 47-59. 2004.
- HECKATHORN, S.A.; RYAN, S.L.; BAYLIS, J.A.; WANG, D.; HAMILTON, E.W.; CUNDIFF, L.; LUTHE, D.S. *In vivo* evidence from a *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock protein can protect photosystem II during heat stress. **Functional Plant Biology**. v. 29, p. 935-946. 2002.
- JIANG, C.; XU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; SHI, J.; LI, M.; MING, F. A cytosolic class I small heat shock protein, RchHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**. v. 32, p.1046-1059. 2009.
- ISMOND, K.P.; DOLFERUS, R.; DE PAUW, M.; DENNIS, E.S.; GOOD, A.G. Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. **Plant Physiology**. v. 132, p. 1292-1302. 2003.
- KANELIS, A.K.; SOLOMOS, T.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. **Plant Physiology**. v. 96, p. 269-274. 1991.
- LEÓN-SÁNCHEZ, F.D.; PELAYO-ZALDÍVAR, C.; RIVERA-CABRERA, F.; PONCE-VALADEZ, M.; ÁVILA-ALEJANDRE, X.; FERNÁNDEZ, F.J.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; PÉREZ-FLORES, L.J. Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol

- dehydrogenase activity in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 54, p. 93-100. 2009.
- 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, p. 402-408. 2001.
- LORETI, E.; POGGI, A.; NOVI, G.; ALPI, A.; PERATA, P. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis seedlings under anoxia. **Plant Physiology**. v. 137, p. 1130-1138. 2005.
- LOULAKAKIS, K.; HASSAN, M.; GERASOPOULOS, G.; KANELIS, A.K. Effects of low oxygen on in vitro translation products of poly (A)+ RNA, cellulase and alcohol dehydrogenase expression in preclimacteric and ripening-initiated avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 39, p. 29-37. 2006.
- LUND, A.A.; RHOADS, D.M.; LUND, A.L.; CERNY, R.L.; ELTHON, T.E. In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat shock stress protein, HSP22. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 29924-29929. 2001.
- MALONEY, G.S.; KOICHEVENKO, A.; TIEMAN, D.M.; TOHGE, T.; KRIEGER, U.; ZAMIR, D.; TAYLOR, M.G.; FERNIE, A.R.; KLEE, H.J. Characterization of the branched-chain amino acid aminotransferase enzyme family in tomato. **Plant Physiology**. v. 153, p. 925-936. 2010.
- MCGUIRE, R.G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**. v. 27, p. 1254-1255. 1992.
- MURAKAMI, T.; MATSUBA, S.; FUNATSUKI, H.; KAWAGUCHI, K.; SARUYAMA, H.; TANIDA, M.; SATO, Y. Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. **Molecular Breeding**. v. 13, p. 165-175. 2004.
- NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering, Design and Selection**. v. 10, p. 1-6. 1997.
- PASENTSIS, K.; FALARA, V.; PATERAKI, I.; GERASOPOULOS, D.; KANELIS, A.K. Identification and expression profiling of low oxygen regulated genes from *Citrus* flavedo tissues using RT-PCR differential display. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 2203-2216. 2007.

- PAUL, V.; PANDEY, R.; SRIVASTAVA, G.C. Ripening of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Part II: Regulation by its stem scar region. **Journal of Food Science and Technology**. v. 47, p. 527-533. 2010.
- PEGORARO, C.; ZANUZO, M.R.; CHAVES, F.C.; BRACKMANN, A.; GIRARDI, C.L.; LUCCHETTA, L.; NORA, L.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C.V. Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. **Postharvest Biology and Technology**. v. 57, p. 19-26. 2010.
- RAMAKRISHNA, W.; DENG, Z.P.; DING, C.K.; HANDA, A.K.; OZMINKOWSKI, R.H. A novel small heat shock protein gene, *vis1*, contributes to pectin depolymerization and juice viscosity in tomato fruit. **Plant Physiology**. v. 131, p.725-735. 2003.
- RAMONELL, K.M.; MCCLURE, G.; MUSGRAVE, M.E. Oxygen control of ethylene biosynthesis during seed development in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Cell and Environment**. v. 25, p. 793-801. 2002.
- SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, p. 374-378. 2003
- SARKAR, N.K.; KIM, Y.; GROVER, A. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. **BMC Genomics**. v. 10, p. 393. 2009.
- SONG, N.H.; ANH, Y.J. DcHsp17.7, a small heat shock protein in carrot, is tissue-specifically expressed under salt stress and confers tolerance to salinity. **New Biotechnology**. v. 28, p. 698-704. 2011.
- SUN, J.H.; CHEN, J.Y.; KUANG, J.F.; CHEN, W.X.; LU, W.X. Expression of sHSP genes as affected by heat shock and cold acclimation in relation to chilling tolerance in plum fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 91-96. 2010.
- TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trends Plant Science**. v. 4, p. 320-325. 1999.

- TAYLOR, N.L.; TAN, Y.F.; JACOBY, R.P.; MILLAR, A.H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**. v. 72, p. 367-378. 2009.
- VIDOZ, M.L.; LORETI, E.; MENSUALI, A.; ALPI, A.; PERATA, P. Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. **The Plant Journal**. v. 63, p. 551-562. 2010
- WANG, H.; SCHAUER, N.; USADEL, B.; FRASSE, P.; ZOUINE, M.; HERNOULD, M.; LATCHÉ, A.; PECH, J.C.; FERNIE, A.R.; BOUZAYEN, M. Regulatory features underlying pollination-dependent and independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. **Plant Cell**. v. 21, p. 1428-1452. 2009.
- WHITE, P.J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 1995-2000. 2002.

7 CAPÍTULO VI

Protocolo para construção de plasmídios *Ubi:HSFA4d* e *35S:HSFA4d* para transformação genética em arroz e tomate visando tolerância a diferentes estresses abióticos

Camila Pegoraro, Mariana M. Krüger, Railson S. dos Santos, Marcia M.A.N.P. Margis, Cesar V. Rombaldi, Luciano C. da Maia, Antonio C. de Oliveira

Resumo

Em vegetais, a resposta a estresses ambientais envolve mecanismos de percepção, redes de transdução de sinal e um conjunto de genes de resposta a estresse. Fatores de transcrição têm um papel central na regulação de diferentes estresses em plantas. Estudos demonstram a participação de *Heat Shock Factors* - *HSFs* na resposta a vários estresses ambientais. Fatores de transcrição *HSFs* são reguladores centrais de respostas de defesa, e se ligam a *Heat Shock Element* - *HSEs* para regular a transcrição de *Heat Shock Proteins* - *HSPs* durante o desenvolvimento normal das plantas, assim como sob condições de estresse. Além do controle de respostas a estresse por calor, *HSFs* estão envolvidos na resposta de defesa ao ataque de patógenos, estresse oxidativo, metais pesados, desidratação e salinidade, e em certos processos de desenvolvimento e diferenciação. A co-expressão de *HSFs* em resposta a diferentes estresses abióticos em arroz sugere que estes fatores de transcrição podem regular múltiplos mecanismos. Desta forma, os *HSFs* são considerados uma família gênica importante para os cientistas de plantas, assim como para os agricultores. O potencial dos *HSFs* de responder a diferentes estresses pode ser utilizado na obtenção de plantas transgênicas tolerantes a diversos estresses ambientais. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo a construção de plasmídios para a superexpressão do gene *OsHSFA4d* (*Os05t0530400*) em plantas de arroz e tomate. Neste estudo utilizou-se o vetor de entrada pENTR/D-TOPO[®] e os vetores binários de destino pH7WG2,0-Ubi e pH7WG2,D,1 para arroz e tomate, respectivamente. A sequência codificadora do gene *OsHsfA4d*, de 1380pb foi amplificada a partir de cDNA de plantas de arroz, e

clonada em vetor de entrada. O fragmento foi transferido para os vetores de destino pH7WG2,0-Ubi e pH7WG2,D,1 através de uma reação de recombinação. As construções estão sendo utilizadas para transformação de plantas de arroz e tomate. Nesta etapa inicial foram obtidos 6 plantas de arroz possivelmente transformadas.

Palavras-chave: superexpressão, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*.

7.1 Introdução

Em condições de estresses ambientais, o crescimento e a produtividade das plantas são afetados drasticamente. As plantas adotam diferentes mecanismos para sobreviver a condições de estresses, dependendo da espécie, tempo de exposição, severidade e estágio de desenvolvimento. Estes mecanismos incluem a recepção dos sinais externos e a emissão de respostas frente a estes estresses, passando pela percepção do estímulo, transdução do sinal até a expressão gênica, bem como a regulação fisiológica na planta. Fatores de transcrição têm um papel central na regulação destes mecanismos de resposta a estresses ambientais (MITTAL et al., 2009).

Estudos desenvolvidos por Charng et al. (2007) e Yoshida et al. (2008) demonstram a participação de fatores de transcrição de choque térmico (*Heat Shock Factors* - HSFs) na resposta a vários estresses ambientais. Fatores de transcrição HSFs são reguladores centrais de respostas de defesa, e se ligam a elementos de choque térmico (*Heat Shock Element* - HSEs) para regular a transcrição de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSPs) durante o desenvolvimento normal das plantas, assim como sob condições de estresse (VON KOSKULL-DÖRING et al., 2007). HSEs, também chamados de promotores de choque térmico possuem o motivo 'nGAAnnTTCn', o qual é responsável pela interação HSF-HSE (PELHAM, 1982).

Diferentes funções biológicas dos HSFs de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e *Arabidopsis thaliana* (KOTAK et al., 2007; VON KOSKULL-DÖRING et al., 2007) foram verificadas. Membros da classe HSFA são capazes de atuar na ativação

transcricional, enquanto que membros HSFb e HSFC atuam como repressores ou coativadores de genes (BHARTI et al., 2004; CZARNECKA-VERNER et al., 2004; KOTAK et al., 2004).

A superexpressão do gene *HSF3* em plantas de *Arabidopsis* aumentou a termotolerância quando comparada com plantas selvagens (PRÄNDL et al., 1998). Ainda em *Arabidopsis*, a superexpressão do gene *HSF2* resultou, além do aumento da termotolerância, na tolerância a estresse osmótico e salino (OGAWA et al., 2007). Entretanto, além do controle de respostas a estresse por calor, *HSFs* estão envolvidos na resposta de defesa ao ataque de patógenos, estresse oxidativo, metais pesados, desidratação e em certos processos de desenvolvimento e diferenciação (WANG et al., 2009).

A coexpressão de *HSFs* em resposta a diferentes estresses abióticos em arroz (*Oryza sativa* L.) indica que estes fatores de transcrição podem regular diferentes mecanismos. Desta forma, os *HSFs* são considerados uma família gênica interessante para a pesquisa, assim como para os produtores rurais. O potencial dos *HSFs* de responder a diferentes estresses pode ser utilizado na obtenção de plantas transgênicas tolerantes a diferentes estresses ambientais (MITTAL et al., 2009).

Um estudo desenvolvido com 26 genes *HSFs* em plantas de arroz sob estresses por frio, calor e estresse oxidativo demonstrou que a maioria dos genes são coexpressos em dois dos estresses analisados, e 7 genes (*HSFA4d*, *HSFA7*, *HSFA9*, *HSFB4a*, *HSFB4b*, *HSFC2a* e *HSFC2b*) foram coexpressos nos três estresses analisados (MITTAL et al., 2009). Baseado nestes resultados, este trabalho teve por objetivo a obtenção de plasmídios de expressão contendo o gene *HSFA4d* para inserção em plantas de arroz e tomate visando a identificação da função deste fator de transcrição, assim como seu comportamento em monocotiledôneas e dicotiledôneas.

7.2 Materiais e Métodos

Obtenção da sequência do gene

A sequência correspondente ao gene *OsHSFA4d* (*Os05g0530400* - *LOC_Os05g45410* - AK100412) foi obtida no banco de dados *RAP-DB* (*Rice Annotation Project Data Base*) (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Somente a região codificadora (1380 pb) foi selecionada para a síntese dos iniciadores. Os iniciadores foram sintetizados manualmente com o auxílio dos programas *Reverse complement* (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) e *Tm calculator* (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>). No início da sequência do iniciador senso foram adicionadas as bases nitrogenadas CACC, para tornar possível a ligação do gene de interesse no vetor de entrada selecionado neste estudo. Os iniciadores utilizados podem ser visualizados na tab. 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene *OsHsfA4d*

Iniciadores <i>OsHsfA4d</i>	Sequência	T° Anelamento
Senso	CACCATGGAGAGTTCCAACCTG	62.54
Antisenso	TCAGGTATGCAGAGTCTGCTCG	61.45

Obtenção do vetor de entrada com o gene de interesse

O trabalho foi conduzido no CGF/FAEM/UFPel. O fragmento correspondente ao gene *OsHsfA4d* foi sintetizado a partir de cDNA de arroz da cv. Nipponbare com a utilização da enzima *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen, Cat. No. 11708-013) seguindo as recomendações do fabricante. Após a obtenção do fragmento correspondente ao gene *OsHsfA4d*, o mesmo foi purificado com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Cat. No. 28-9034-70). O fragmento purificado foi inserido no vetor de entrada pENTR/D-TOPO® (Invitrogen, Cat. No. K2400-20) (Fig. 1), sendo a reação de ligação composta por 0,5 µL de vetor pENTR/D-TOPO (15-20 ng µL⁻¹); 1,0 µL de produto de PCR (20 ng µL⁻¹); 0,5 µL de solução salina diluída (1 : 4) e 1,0 µL de água. A reação de ligação foi mantida em temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, 1 µL da reação de ligação

foi inserida por eletroporação (cubeta de 2 mm; 25 μF ; 200 Ω ; 2500V) em 100 μL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa TOP10.

Após o choque, foi acrescentado 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido estéril e as células foram incubadas a 37°C sob agitação durante 1 hora. Em seguida, as células foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas. Colônias individuais foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de LB líquido acrescido de canamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, os tubos foram incubados a 37°C com agitação durante 18 horas. A extração de DNA plasmidial foi feita com o auxílio do kit *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Cat. No. 27.106). Após a extração do DNA plasmidial, realizou-se uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para a verificação da inserção do fragmento de interesse no vetor pENTR/D-TOPO. Além disso, para conferir a integridade do fragmento de interesse, o DNA plasmidial foi submetido a sequenciamento utilizando-se os iniciadores *M13* provenientes do kit pENTR/D-TOPO®.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do iniciador M13 e 3 μL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μL . As reações foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavadas com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 μL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-*

3100SR_Seq_FASTA.saz”.” Para identificação da sequência proveniente da análise de sequenciamento utilizou-se o programa *BLAST* do *National Center For Biotechnology Information* (NCBI).

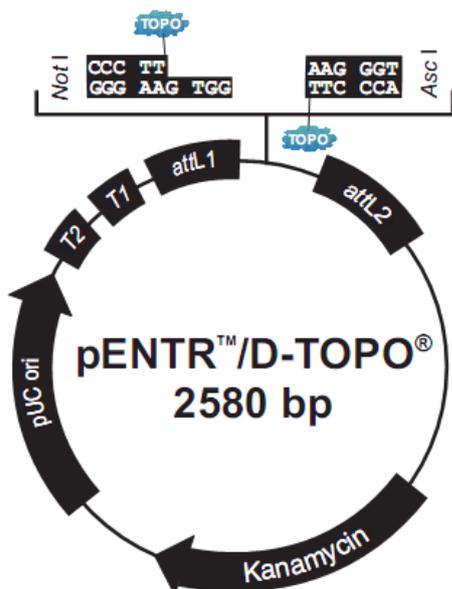


Figura 1 - Vetor de entrada pENTR/D-TOPO®.

Obtenção dos vetores de destino com o gene de interesse

Após verificar a presença, a integridade e a orientação do gene de interesse no vetor de entrada, procedeu-se a transferência deste fragmento para os vetores de destino selecionados, pH7WG2,0-Ubi e pH7WG2,D,1, através de reação de recombinação (Fig. 2 e 3) (<http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pH7WG2/>). A reação de recombinação para ambos os vetores foi composta por 1,0 µL pENTR/D-TOPO + *OsHsfA4d* (50-150 ng µL⁻¹); 1,0 µL pH7WG2,0-Ubi ou pH7WG2,D,1 (150 ng µL⁻¹); 6,0 µL *TE buffer* pH 8,0; 2,0 µL *LR Clonase II enzyme mix* (Invitrogen, Cat. No. 11791-020). As reações de recombinação foram incubadas a 25°C durante 1 hora. Posteriormente, adicionou-se 1 µL de *Proteinase K* e incubou-se a 37°C durante 10 minutos.

Em seguida, 1 µL de cada reação de recombinação foi inserida por eletroporação (cubeta de 2 mm; 25 µF; 200 Ω; 2500V) em células eletrocompetentes de *E. coli* cepa TOP10. Após o procedimento de transformação, 1 mL de meio LB

líquido foi adicionado no tubo, e este foi incubado a 37°C sob agitação durante 1 hora. Em seguida, as células foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de espectinomicina (100 µg mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas. Colônias individuais foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de LB líquido acrescido de espectinomicina (100 µg mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg mL⁻¹). Posteriormente, os tubos foram incubados a 37°C em agitação durante 18 horas. A extração de DNA plasmidial foi feita com a utilização do *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Cat. No. 27.106). Posteriormente, uma reação de PCR com os iniciadores de interesse foi feita para verificar a presença do gene nos vetores de destino.

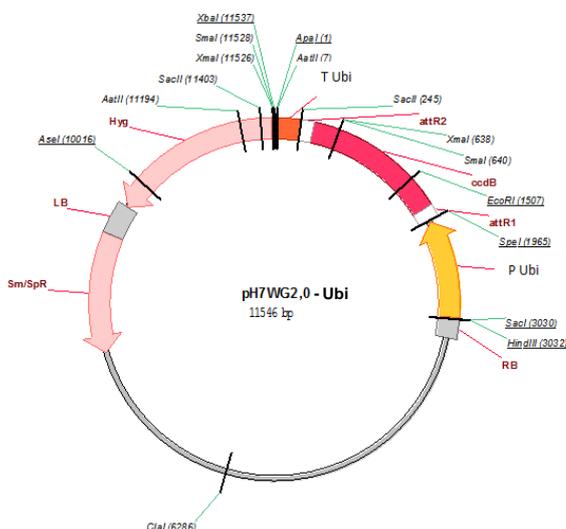


Figura 2 - Vetor de destino pH7WG2,0-Ubi para monocotiledôneas.

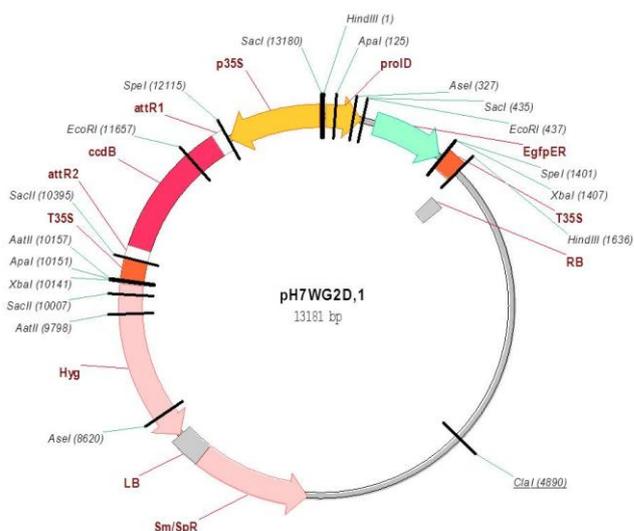


Figura 3 - Vetor de destino pH7WG2,D,1 para dicotiledôneas.

Os plasmídios de destino *Ubi:HSFA4d* e *35S:HSFA4d* foram inseridos em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 por eletroporação (cubeta de 2 mm; 25 μF ; 200 Ω ; 2400V). Após choque, foi acrescentado 1 mL de LB líquido, e as células foram mantidas a 28°C durante 1 hora, sob agitação. Decorrido este período, as células foram espalhadas em placas de Petri contendo LB sólido acrescido de rifampicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), espectinomicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), estreptomicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a 28°C durante 24 horas. Uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção foi colocada em meio LB líquido contendo rifampicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), espectinomicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), estreptomicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubada a 28°C, sob agitação durante 16hs (D.O.=0.7). A extração de DNA plasmidial foi feita com a utilização do kit *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Cat. No. 27.106). Posteriormente, uma reação de PCR com os iniciadores de interesse foi feita para verificar a presença do gene de interesse na *A. tumefaciens* que será utilizada para infectar as plantas.

Superexpressão do gene *OsHSFA4d* (*Os05t0530400-01/AK100412*) em arroz

A inserção do plasmídio *Ubi:HSFA4d* em plantas de arroz foi feita através da infecção de aproximadamente 200 mesocótilos, utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404.

Para obtenção de mesocótilos, sementes da cv. Nipponbare foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (10%) durante 30 minutos. Após a desinfestação as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril, secas em papel filtro estéril e acondicionadas em frascos contendo meio MS (Murashige e Skoog) acrescido de 2 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Os frascos foram incubados em estufa tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 16 horas durante 7 dias. Posteriormente, os mesocótilos foram excisados das plântulas com auxílio de lupa e bisturi.

Os explantes foram infectados com *A. tumefaciens* contendo o plasmídio *Ubi:HSFA4d* durante 30 minutos. Os mesocótilos foram acondicionados em meio MS acrescido de 3 mg L⁻¹ BAP (benzilaminopurina) e acetoceringona 150mg L⁻¹ e

incubados em co-cultivo no escuro, a 25°C durante três dias. Após co-cultivo, os mesocótilos foram lavados com água destilada estéril acrescida de cefotaxima 400 mg L⁻¹, secos em papel filtro estéril e transferidos para meio MS acrescido de 3 mg L⁻¹ BAP e cefotaxima 400 mg L⁻¹ e incubados em sala de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 16 horas.

Após emissão de perfilhos (três semanas), as plântulas foram transferidas para meio MS acrescido de higromicina 20 mg L⁻¹ e BAP 3 mg L⁻¹, e incubadas em sala de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 16 horas. As plântulas foram mantidas no meio de seleção durante duas semanas, tempo recomendado para morte total de mesocótilos de arroz não transformados (REY, 2008). Após este período, as plântulas que sobreviveram foram transferidas para meio de regeneração (MS + BAP 3 mg L⁻¹ + cefotaxima 400 mg L⁻¹). Quando as plântulas apresentavam três ou mais perfilhos foram transferidas para meio de enraizamento (MS + sacarose 80g L⁻¹).

Após o enraizamento, as plântulas foram transferidas para frascos com água durante 7 dias e depois transplantadas em vasos contendo solo e vermiculita (2:1) e mantidas em sala de crescimento (25°C e fotoperíodo de 16 horas) para aclimação. Após esta etapa, as plantas foram transportadas para casa de vegetação para produção de sementes.

7.3 Resultados

A sequência codificadora completa do gene *OsHsfA4d*, contendo 1380 pb foi amplificada a partir de cDNA de plantas de arroz (Fig. 4). Antes da inserção deste fragmento no vetor de entrada pENTR/D-TOPO, o mesmo passou por purificação para retirada de resíduos dos reagentes utilizados na reação de PCR (Fig. 5). De acordo com o tamanho (~1380pb) das bandas observadas na fig. 4 e 5, sugere-se que o fragmento amplificado corresponde ao gene de interesse.

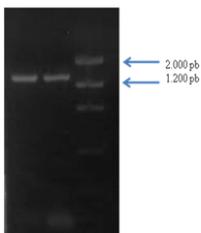


Figura 4 - Amplificação do gene *OsHsfA4d*. Marcador utilizado: *Low DNA Mass Ladder*.

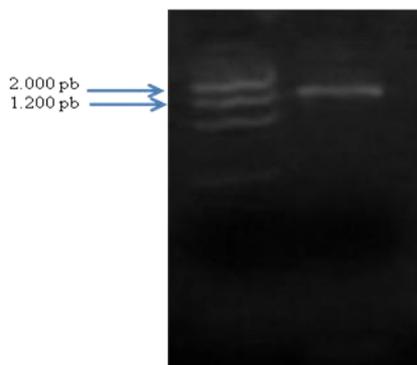


Figura 5 - Produto de PCR do gene *OsHsfA4d* purificado. Marcador utilizado: *Low DNA Mass Ladder*.

Após a purificação, o fragmento correspondente ao gene *OsHsfA4d* foi clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e inserido em células de *E. coli*. Posteriormente procedeu-se a extração de DNA plasmidial. De acordo com o tamanho da banda correspondente ao DNA plasmidial (Fig. 6), sugere-se que o fragmento foi inserido no plasmídio de forma íntegra, ou seja, ~1380pb do fragmento mais 2580pb do plasmídio resultam em ~3960pb, que corresponde altura da banda observada no gel.

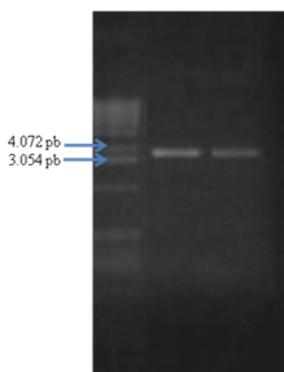


Figura 6 - DNA plasmidial do pENTR/D-TOPO + *OsHsfA4d*. Marcador utilizado: *1Kb DNA Ladder*.

Embora o DNA plasmidial tenha apresentado o tamanho esperado, uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para o gene *OsHsfA4d* foi

realizada. A fig. 7 comprova que o fragmento foi inserido íntegro no vetor de entrada, uma vez que apresenta uma banda de ~1380pb.

Finalmente, para comprovar que o fragmento clonado corresponde ao gene *OsHsfA4d*, o DNA plasmídial juntamente com os iniciadores M13 senso e M13 antisenso foram enviados para sequenciamento.

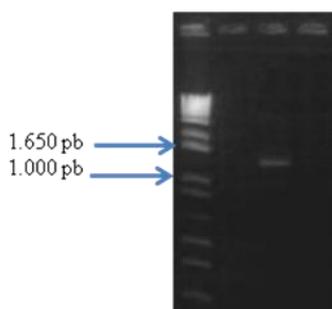


Figura 7 - Amplificação do gene *OsHsfA4d* a partir do DNA plasmídial do pENTR/D-TOPO + *OsHsfA4d*. Marcador utilizado: *1Kb Plus DNA Ladder*.

A sequência obtida foi submetida à análise de alinhamento pelo programa BLASTN no banco de dados NCBI. De acordo com os resultados de identidade de 99%, e e-value de 0, pode-se afirmar que a sequência clonada corresponde ao gene de interesse *OsHSFA4d* (*Os05t0530400-01*) (Fig. 8).

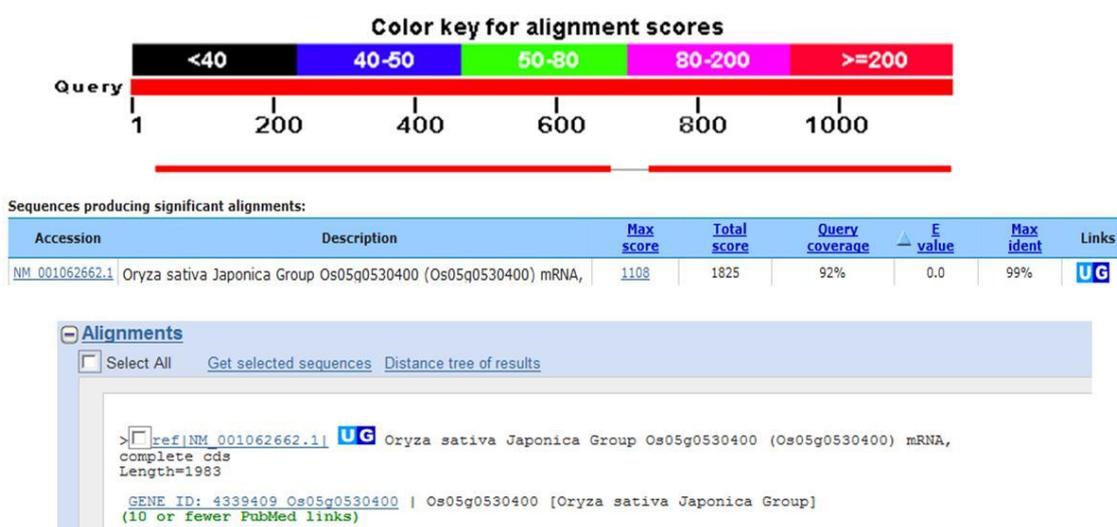


Figura 8 - Resultado do alinhamento da sequência clonada no vetor de entrada.

Após a confirmação da sequência, o fragmento foi transferido para os vetores de destino pH7WG2,0-Ubi e pH7WG2,D,1 através de uma reação de recombinação

mediada pela enzima *LR clonase*. A reação de recombinação foi inserida em células de *E. coli*, e após decorrido o tempo necessário procedeu-se extração de DNA plasmidial (Fig. 9), o qual apresenta um tamanho bastante elevado, próximo ou acima 12.000pb, o que já era esperado, uma vez que os vetores utilizados possuem tamanho superior a 12000pb. Para verificar se ocorreu a transferência do fragmento, realizou-se uma reação de PCR com os iniciadores específicos para o gene *OsHsfA4d*. Acredita-se que tenha ocorrido a transferência do fragmento do vetor de entrada para o vetor de destino corretamente, uma vez que o fragmento amplificado apresenta uma banda de ~1380pb (Fig.9).

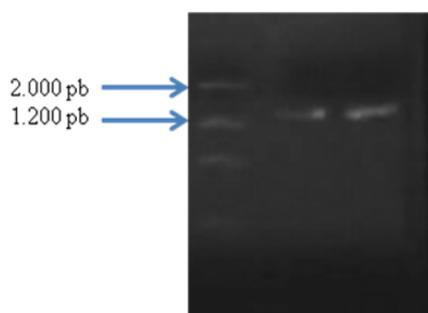


Figura 9 - Amplificação do gene *OsHsfA4d* a partir do DNA plasmidial pH7WG2,0-Ubi + *OsHsfA4d* e pH7WG2,D,1 + *OsHsfA4d*. Marcador utilizado: *Low DNA Mass Ladder*.

Os vetores binários *Ubi:OsHsfA4d* e *35S:OsHsfA4d* foram inseridos em *A. tumefaciens*. O resultado da reação de PCR do DNA plasmidial (Fig. 10) indica que houve a transformação das células, demonstrando que estas podem ser utilizadas na infecção de plantas de arroz e tomate.

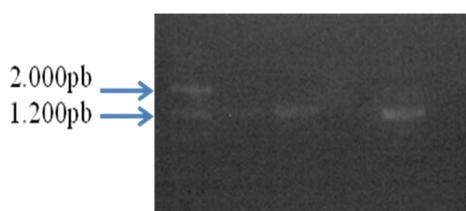


Figura 10 - Amplificação do gene *OsHsfA4d* a partir do DNA plasmidial de *A. tumefaciens* transformada com as construções *Ubi:OsHsfA4d* e *35S:OsHsfA4d*. Marcador utilizado: *Low DNA Mass Ladder*.

Cepas de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo *Ubi:OsHsf4d* foram utilizadas para infecção de mesocótilos de arroz da cv. Nipponbare. Após seleção por higromicina foi possível separar plantas putativamente transformadas de plantas não

transformadas (Fig. 11). Nesta etapa inicial do estudo obteve-se 6 plantas putativamente transformadas, as quais foram submetidas ao processo de enraizamento (Fig. 12). Após enraizamento as plantas passaram pela etapa de aclimação (Fig.13).



Figura 11 - Plantas de arroz em meio de seleção (meio MS acrescido de higromicina 20 mg L^{-1}).



Figura 12 - Plantas de arroz putativamente transformadas em meio de enraizamento (meio MS acrescido de sacarose 80 g L^{-1}).

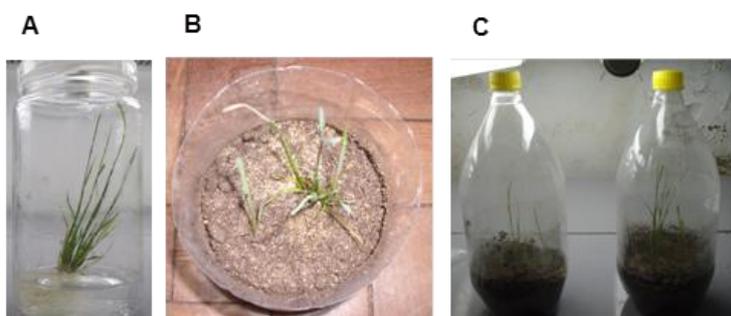


Figura 13- Plantas de arroz putativamente transformadas em processo de aclimação. A: plântula em água; B: plântulas em solo:vermiculita (2:1) e C: plântulas em sala de crescimento.

7.4 Considerações finais e Perspectivas

As construções foram inseridas em arroz cv. Nipponbare por meio de infecção por *A. tumefaciens* em mesocótilos e calos. Até o momento, obteve-se sucesso somente através da transformação de mesocótilos. As plantas obtidas foram aclimatadas e, posteriormente, transferidas para casa de vegetação para produção de sementes.

A obtenção de plantas superexpressando o gene *OsHsfA4d* possibilitará o entendimento da função deste gene e sua participação no mecanismo de resposta a estresses. Além disso, a superexpressão em tomate permitirá uma comparação da ação deste gene entre monocotiledôneas e dicotiledôneas.

7.5 Referências Bibliográficas

- BHARTI, K.; VON KOSKULL-DÖRING, P.; BHARTI, S.; KUMAR, P.; TINTSCHL-KORBITZER, A.; TREUTER, E.; NOVER, L. Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1. **Plant Cell**. v. 16, p. 1521-1535. 2004.
- CHARNG, Y.Y.; LIU, H.C.; LIU, N.Y.; CHI, W.T.; WANG, C.N.; CHANG, S.H.; WANG, T.T. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. v. 143, p. 251-262. 2007.
- CZARNECKA-VERNER, E.; PAN, S.; SALEM, T.; GURLEY, W.B. 2004. Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. **Plant Molecular Biology**. v. 56, p. 57-75. 2004.
- KOTAK, S.; PORT, M.; GANGULI, A.; BICKER, F.; DÖRING, P. Characterization of Cterminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. **The Plant Journal**. v. 39, p. 98-112. 2004.

- KOTAK, S.; VIERLING, E.; BAUMLEIN, H.; VON KOSKULL-DÖRING, P. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. **Plant Cell**. v. 19, p. 182-195. 2007.
- MITTAL, D.; CHAKRABARTI, S.; SARKAR, A.; SINGH, A.; GROVER, A. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, p. 785-795. 2009.
- NOVER, L.; BHARTI, K.; DORING, P.; MISHRA, S.K.; GANGULI, A.; SCHARF, K.D. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress Chaperones**. v. 6, p. 177-189. 2001.
- PELHAM, H.R.B. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. **Cell**. v. 30, p. 517-528. 1982.
- PRÄNDL, R.; HINDERHOFER, K.; EGGERS-SCHUMACHER, G.; SCHÖFFL, F. HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**. v.258, p. 269-278. 1998.
- OGAWA, D.; YAMAGUCHI, K.; NISHIUCHI, T. High-level overexpression of the *Arabidopsis HsfA2* gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 3373-3383. 2007.
- REY, M.S. **Transformação genética e organogênese direta de arroz para obtenção de resistência a patógenos**. 2008. 77p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.
- VON KOSKULL-DÖRING, P.; SCHARF, K.D.; NOVER, L. The diversity of plant heat stress transcription factors. **Trends in Plant Science**. v. 12, p. 452-457. 2007.
- YOSHIDA, T.; SAKUMA, Y.; TODAKA, D.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; MIZOI, J.; KIDOKORO, S.; FUJITA, Y. SHINOZAKI, K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 368, p.515-521. 2008.

WANG, C.; ZHANG, Q.; SHOU, H. Identification and expression analysis of *OsHsfs* in rice. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**. v. 10, p. 291-300. 2009.

8 CAPÍTULO VII

Perfil de expressão gênica em pêssegos tratados com ácido giberélico na pré-colheita e armazenados sob baixas temperaturas na pós-colheita

Camila Pegoraro, Alice Tadiello, Ciane Xavier Gonçalves, Livio Trainotti, Antonio Costa de Oliveira, Cesar Valmor Rombaldi

Resumo

O método mais empregado para a conservação de pêssegos (*Prunus persica* B.) *in natura* é o armazenamento refrigerado. Entretanto, quando o período de estocagem ultrapassa 20 a 25 dias, para a maioria das cultivares de polpa branca fundente, há elevada ocorrência de lanosidade, que se caracteriza pela perda de succulência dos frutos. A aplicação de ácido giberélico (GA₃) em pêssegos antes do endurecimento do caroço tem sido associada com a prevenção da lanosidade após armazenamento a frio. Entretanto, os mecanismos moleculares associados com a ação do ácido giberélico na prevenção da lanosidade são pouco entendidos. Desta forma, com o objetivo de avaliar os efeitos do GA₃ na prevenção da lanosidade, pessegueiros da cultivar Chimarrita foram tratados com GA₃ no início do endurecimento do caroço. Após a colheita, frutos tratados e não tratados foram armazenados em atmosfera refrigerada durante 30 dias. Após o armazenamento refrigerado os frutos foram expostos à temperatura ambiente durante 0, 2 e 4 dias. Além disso, para avaliar o efeito do GA₃ durante o processo de amadurecimento normal, após a colheita os frutos foram mantidos em temperatura ambiente durante 2 e 4 dias. As avaliações de qualidade foram realizadas na colheita, 2 e 4 dias após a colheita, assim como 0, 2 e 4 dias após armazenamento a frio. Neste estudo avaliou-se o perfil transcricional de frutos no momento da colheita (tratados e não tratados com GA₃) assim como frutos que foram armazenados em baixas temperaturas (tratados e não tratados com GA₃) e permaneceram 2 dias em temperatura ambiente. As análises de microarranjos foram realizadas a partir de 1 µg de RNA total usando o chip *µPEACH* 3.0. A partir dos dados obtidos sugere-se que o GA₃ previne o aparecimento de

lanosidade através da indução de genes associados ao metabolismo de lipídios, à degradação da parede celular e à síntese de trealose. Sugere-se que esta regulação se dá por mudanças na conformação do DNA e por eventos de metilação.

Palavras-chave: *Prunus persica*, injúria, lanosidade, genes diferencialmente expressos.

8.1 Introdução

O pêsego (*Prunus persica* L. Bastch.) é um fruto com alta importância econômica e amplamente produzido praticamente em todas as regiões de clima subtropical e temperado. Sob o aspecto tecnológico, pêsegos são frutos caracterizados pela curta vida de prateleira devido à fragilidade, rápida perda de firmeza de polpa e susceptibilidade a podridões. Deste modo, a conservação após a colheita é baseada em métodos que previnem danos mecânicos e a aceleração do metabolismo do próprio fruto e micro-organismos associados (PRINSI et al., 2011). Neste sentido, o armazenamento refrigerado tem sido utilizado para aumentar a vida de prateleira de pêsegos. Porém, dependendo da cultivar, do estágio de maturação no momento da colheita, das condições de temperatura e tempo de armazenamento, podem ser estimulados danos fisiológicos amplamente conhecidos como *chilling injury*, que incluem a lanosidade ou perda de suculência e escurecimento interno (LURIE e CRISOSTO, 2005).

A lanosidade é um distúrbio fisiológico que ocorre na maioria das cultivares de polpa branca e fundente que passaram por períodos prolongados de armazenamento (superior a 20 dias) em atmosfera refrigerada, especialmente em temperatura 2.2 a 7.6°C (LURIE et al., 2011). Esta desordem fisiológica está associada com a degradação anormal da parede celular durante o amadurecimento após a remoção dos frutos da câmara fria (BRUMMELL et al., 2004; LURIE e CRISOSTO, 2005). Porém, o mecanismo que interrompe o metabolismo normal da parede celular em frutos lanosos durante o amadurecimento ainda não está esclarecido (OGUNDIWIN et al., 2008).

Diferentes estudos buscando identificar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da lanosidade foram (OGUNDIWIN et al., 2008; GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; VIZOSO et al., 2009; PEGORARO et al., 2010) e continuam sendo realizados. O desenvolvimento da lanosidade está associado com a repressão de genes que codificam proteínas com atividade no transporte intracelular e no metabolismo de parede celular (GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008). Entretanto, há uma expressão diferencial de genes associados com o metabolismo de plastídios, mitocôndrias, retículo endoplasmático e ribossomos em frutos com lanosidade (VIZOSO et al., 2009). Em frutos lanosos, ocorre a diminuição da atividade de enzimas catalases, NADP-isocitrato desidrogenases, proteínas de resposta a choque térmico (HSP) e poligalacturonases (NILO et al., 2009). Além disso, em frutos lanosos ocorre a inibição de genes que codificam HSPs e proteínas envolvidas na síntese de etileno (OGUNDIWIN et al., 2008; PEGORARO et al., 2010). Além das modificações presentes nos níveis de transcritos de diferentes grupos gênicos, em frutos que passaram por armazenamento a frio, foram identificadas mudanças na regulação da região promotora de alguns genes (TITTARELLI et al., 2009). Embora os estudos estejam bastante avançados com relação à evolução do amadurecimento de pêssegos, a causa exata dos distúrbios ocasionados pelo frio ainda é desconhecida. Além disso, a maioria dos estudos avaliam variáveis mais específicas, como o acúmulo de transcritos de apenas alguns genes (PEGORARO et al., 2010), enzimas (VITTI et al., 2007), proteínas (NILO et al., 2009), metabólitos (JIN et al., 2009a), estrutura celular (APPEZZATO-da-GLÓRIA et al., 2004). Neste trabalho optou-se por se avaliar todo o transcriptoma de frutos num estágio precoce de ocorrência do distúrbio, com o intuito de pôr em evidência genes precocemente expressos e potencialmente envolvidos com a origem do problema.

Várias tecnologias foram testadas visando a prevenção da lanosidade. Dentre as tecnologias que resultaram em êxito pode-se citar a utilização de atmosfera controlada, aquecimento intermitente e aplicação de etileno durante o armazenamento refrigerado (GIRARDI et al., 2005), aplicação de ácido salicílico após a colheita (WANG et al., 2006), condicionamento em baixas temperaturas combinado com a aplicação de metil jasmonato antes do armazenamento (JIN et al.,

2009a), pré-condicionamento combinando ar quente com a aplicação de metil jasmonato antes do armazenamento (JIN et al., 2009b) e aquecimento a 20°C durante 48 horas antes do armazenamento a frio (SASAKI et al., 2010). Entretanto, é importante ressaltar que embora exista uma redução da incidência da lanosidade, a maioria destes tratamentos (exceto a atmosfera controlada) provoca a diminuição da firmeza de polpa, diminuindo o período de armazenamento, e conseqüentemente a vida pós-colheita dos frutos.

Outra alternativa para prevenir a incidência de lanosidade é a diminuição do período de armazenamento, o qual pode ser obtido através do atraso da maturação quando os frutos ainda estão nas plantas. Isto pode ser conseguido através do melhoramento genético de cultivares de maturação tardia, com maior potencial para armazenamento prolongado, ou pelo tratamento das cultivares com o uso de reguladores de crescimento (ZILKAH et al., 1997; JU et al., 1999; MARTINEZ-ROMERO et al., 2000; AMARANTE et al., 2005), ou inibidores de produção de etileno (AVG - aminoetoxivinilglicina) (AMARANTE et al., 2005), ou da ação do etileno (1 - MCP - 1- Metilciclopropeno) (GIRARDI et al., 2005). No caso específico de reguladores de crescimento, Pegoraro et al. (2010) e Pegoraro et al. (2011) avaliaram o efeito da aplicação de ácido giberélico (GA₃) no atraso da maturação de pêssegos da cultivar Chiripá. Estes autores verificaram que, embora a aplicação de GA₃ não tenha efeito positivo no retardamento do amadurecimento, aumentou o tamanho dos frutos e preveniu o aparecimento de lanosidade após o armazenamento em atmosfera refrigerada. Entretanto, o tratamento com GA₃ não gera o mesmo tipo de respostas em todos os genótipos. Como citado, para cv. Chiripá há incremento do tamanho dos frutos, mas não retarda o amadurecimento. Já para a cv. Rubidoux, há aumento do tamanho e retardamento da maturação (AMARANTE et al. 2005), enquanto que em outras cultivares não se observam respostas significativas (ROMBALDI et al. dados não publicados).

Apesar do efeito positivo do GA₃ na prevenção da lanosidade, sua ação molecular e fisiológica é desconhecida. Neste sentido, o estabelecimento do perfil transcricional diferencial entre frutos lanosos (sem aplicação de GA₃) e frutos não lanosos (com aplicação de GA₃ antes do endurecimento do caroço), pode ser

utilizado na identificação de rotas metabólicas envolvidas no mecanismo coordenado pelo GA₃, o qual resulta em prevenção da lanosidade.

8.2 Material e Métodos

Desenho experimental

O delineamento experimental com os tratamentos no campo seguiu exatamente o que foi utilizado por Pegoraro et al. (2011). O experimento foi conduzido no Centro Experimental da Palma (UFPEL) e no Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (FAEM/UFPEL). Após a colheita, optou-se por um delineamento inteiramente casualizado, constituído por unidades experimentais de 40 frutos, com três repetições biológicas. O experimento foi constituído de 4 tratamentos: T1 – frutos não tratados com GA₃, colhidos e mantidos em temperatura ambiente, com coleta de amostras na colheita, dois e quatro dias após; T2 – frutos tratados com GA₃, colhidos e mantidos em temperatura ambiente, com coleta de amostras na colheita, dois e quatro dias após; T3 – frutos não tratados com GA₃, colhidos, armazenados sob refrigeração, seguindo a maturação em temperatura ambiente, com coleta de amostras zero, dois e quatro dias após; e, T4 – frutos tratados com GA₃, colhidos armazenados sob refrigeração, seguindo a maturação em temperatura ambiente, com coleta de amostras zero, dois e quatro dias após. As variáveis de qualidade foram avaliadas em todos os tratamentos e condições, e a expressão transcricional foi verificada somente no momento da colheita e dois dias após armazenamento a frio para frutos controle e tratados com GA₃.

Material Vegetal

Neste estudo utilizaram-se pêssegos da cultivar Chimarrita provenientes de pessegueiros que não receberam aplicação de ácido giberélico (GA₃) na pré-colheita (denominados frutos do tratamento controle) e de pessegueiros tratados com GA₃

antes do endurecimento do caroço (50 mg L^{-1} de GA_3 e surfactante Silwet[®] 0.05%, em pH 4.5) (denominados frutos GA_3).

A colheita foi realizada quando os frutos apresentavam coloração de fundo verde clara, correspondendo ao estágio pré-climatérico. No momento da colheita realizou-se a primeira coleta de amostras para a avaliação geral de qualidade e também para compor as primeiras amostras a serem congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o momento da extração do RNA total. Frutos do tratamento controle e do tratamento com GA_3 foram armazenados em atmosfera refrigerada a $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 90-95% umidade relativa durante 30 dias. Após este período, os frutos foram removidos da câmara fria e mantidos em temperatura ambiente a $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 75-80% de umidade relativa durante zero, dois e quatro dias, quando se realizaram a segunda, terceira e quarta coletas para avaliação de qualidade. As coletas de amostras para a avaliação da expressão diferencial de RNAs foram realizadas dois dias após a retirada da câmara fria, de modo a se ter o perfil transcricional diferencial num estágio anterior ao da presença do distúrbio. Frutos de ambos os tratamentos também foram mantidos em temperatura ambiente para avaliação do processo de maturação normal.

Variáveis de avaliação da qualidade

Para monitorar a qualidade dos frutos e validar o modelo de estudo, os frutos foram analisados quanto à massa, firmeza de polpa, teor de ácido ascórbico, produção de etileno e ocorrência de lanosidade. Os métodos empregados estão detalhados em Girardi et al. (2005), Severo et al. (2011) e Pegoraro et al. (2011).

Os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e submetidos a análise de variância ($p \leq 0.05$). O efeito do tratamento dentro de cada condição, em cada tempo foi avaliado pelo teste t ($p \leq 0,05$). O efeito do tempo dentro de cada condição, em cada tratamento foi avaliado teste de Tukey ($p \leq 0.05$) e o efeito da condição, dentro de cada tratamento em cada tempo foi avaliado pelo teste t ($p \leq 0.05$).

Avaliação da expressão transcricional diferencial de genes

A análise do perfil transcricional foi realizada no *Laboratorio di Biologia Molecolare do Complesso Biologico Interdipartimentale Vallisneri dell' Università degli Studi di Padova*. A extração de RNA foi feita a partir de 2 g de polpa, com a utilização do tampão CTAB (*cetyl trimethylammonium bromide*), segundo protocolo descrito por Chang et al. (1993). A quantidade e qualidade do RNA foram analisadas através de análises em espectrofotômetro *NanoDrop* (NanoDrop p/n ND-1000), eletroforese em gel de agarose (2000 ng) e eletroforese capilar (200 ng μL^{-1}) em equipamento *2100 Bioanalyzer* (Agilent p/n G2938A).

A análise de microarranjos foi realizada utilizando a plataforma $\mu\text{PEACH}3.0$. Após verificar a quantidade e a qualidade do RNA total, 1000 ng de RNA total foram utilizados para síntese de cDNA, seguido por síntese de cRNA e marcação com *Cyanine 3* corante utilizando o *kit Agilent Gene Expression oligo microarrays – One – Color Microarray – Based Gene Expression Analysis*. Após a marcação, as amostras foram purificadas utilizando o *kit RNeasy* (Quiagen). Posteriormente, as amostras foram quantificadas para verificar a concentração de *Cyanine 3 dye* e a concentração de cRNA. A concentração de cRNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) foi utilizada para determinar a produtividade: (concentração de cRNA) x 30 μL (volume da eluição) / 1000 = μg de cRNA. As concentrações de cRNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e *Cyanine 3 dye* ($\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$) foram usadas para determinar a atividade específica: (concentração de *Cye 3*/concentração de cRNA) * 1000 = $\text{pmol } \text{Cye } 3 \mu\text{g cRNA}^{-1}$.

Somente as amostras que apresentaram produtividade acima de 1.65 μg e atividade específica acima de 9.0 $\text{pmol } \text{Cye } 3 \mu\text{g cRNA}^{-1}$ foram utilizadas para hibridização. Cada amostra foi depositada em cada um dos 8 compartimentos presentes na lâmina. Em seguida, a lâmina contendo as 60.000 sondas, representando os 30.000 ESTs do genoma do pessegueiro ($\mu\text{PEACH } 3.0$) em cada 1 dos 8 microarranjos (Agilent p/n G2534-60014), foi depositada sobre a lâmina que continha as amostras. As lâminas foram incubadas em um rotator (Agilent p/n G2530-60029) a 10 g e 65°C durante 18 horas. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas e sumebtidas à varredura (Escâner Agilent p/n G2565BA) com auxílio do programa *Agilent's Scan Control*. Posteriormente, os dados foram extraídos com

o auxílio do programa *Feature Extraction 9.5* (transformação da fluorescência em dados numéricos, correção de *background*, e correção das diferenças entre a capacidade de marcação de cada amostra). Com o auxílio do programa *GeneSpring GX 10.0* realizou-se uma normalização das intensidades entre as réplicas biológicas e entre os tratamentos, e adicionou-se o nome dos genes, de acordo com a posição de cada *spot*.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *Multi Experiment Viewer (MeV)*, *EASE Expression Analysis Systematic Explorer* version 4.6 de acordo com Saeed et al. (2003). O teste SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) (TUSHER et al., 2001), foi utilizado para identificar os genes diferencialmente expressos, usando uma taxa de falsa descoberta (FDR) de 0% para as comparações entre tratamentos, exceto para a comparação da colheita de frutos tratados e não tratados, onde utilizou-se uma FRD de 5%. Dentre os genes significativos, genes induzidos e genes reprimidos foram identificados assumindo \log_2 do nível de expressão maior que 2 e menor que 2, respectivamente. Buscando identificar a ação específica do GA_3 , do frio e da interação GA_3 x frio, diferentes contrastes foram feitos: frutos colheita tratados com GA_3 comparados com frutos colheita controle (C_ GA_3); frutos controle armazenados a frio comparados com frutos colheita controle (C_C-CS); frutos tratados com GA_3 armazenados a frio comparados com frutos colheita tratados com GA_3 ($GA_3_GA_3$ -CS). Além disso, para identificar as diferenças no perfil transcricional de frutos sem lanosidade e frutos com lanosidade, frutos tratados com GA_3 armazenados a frio foram comparados com frutos controle armazenados a frio (C-CS_ GA_3 -CS).

Diagramas de Venn foram obtidos para verificar a especificidade de expressão dos genes induzidos e reprimidos entre os tratamentos. A construção do diagrama de Venn foi realizada com o auxílio do programa *Venny* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) (OLIVEROS, 2007). Para identificar a função molecular, o processo biológico e a que componente celular corresponde cada gene induzido e reprimido, as sequências de todos os genes diferencialmente expressos foram obtidas no banco de dados *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>) e submetidas a análises no software *BLAST2GO* (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) (CONESA et al., 2005). Esta análise permitiu

ainda a identificação das enzimas correspondentes aos genes com função conhecida. Para obtenção dos gráficos de função molecular, processo biológico e componente celular, o nível 3 de Gene Ontology (GO CONSORTIUM, 2006) foi selecionado. Este nível foi escolhido por apresentar uma boa relação entre a qualidade de informação e os genes anotados neste nível (MATEOS *et al.*, 2002).

8.3 Resultados

Caracterização geral dos pêssegos submetidos aos tratamentos com GA₃ armazenados ou não sob atmosfera refrigerada

Com o intuito de caracterizar os frutos do ponto de vista tecnológico e validar o modelo biológico de estudo, os pêssegos, tratados e não tratados com GA₃, foram armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração. A primeira diferença significativa foi a massa dos frutos, em média, 60% superior aos que não receberam o regulador de crescimento (tab. 1). Ao avaliarem-se os frutos durante a maturação em temperatura ambiente, foi observado que há significativa redução da firmeza de polpa, aumento da produção de etileno e da concentração de ácido ascórbico, porém sem efeito do GA₃ nestas variações. Além disso, nos frutos tratados com GA₃ observou-se uma ocorrência de podridões de em média 1,67% e 15,0% dos frutos dois e quatro dias de avaliação após a colheita, respectivamente (tab. 1).

Quando os frutos foram avaliados após o armazenamento em baixa temperaturas ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) houve diferença significativa entre os frutos que haviam recebido aplicação de GA₃ e não tratados, especialmente na ocorrência de lanosidade. Aos dois dias após armazenamento refrigerado, em média 15% dos frutos do tratamento controle apresentavam sintoma de lanosidade, enquanto os tratados com GA₃ este percentual médio foi de 10%. Aos quatro dias, praticamente a totalidade dos frutos não tratados apresentaram sintoma de lanosidade, enquanto os tratados com GA₃, em torno de 18% apresentavam sintoma. Assim, comprova-se a eficácia do GA₃ na prevenção do distúrbio e valida-se o modelo demonstrando que o sintoma é realçado a partir do segundo dia, razão pela qual coletaram-se as amostras para o estudo transcricional dois dias após a retirada da câmara fria.

Tabela 1 - Características de pêssegos Chimarrita não tratados (controle) e tratados com GA₃ (GA₃) na colheita, 2 e 4 dias após armazenamento em temperatura ambiente (RT) e após armazenamento a frio (CS)

Tratamento	Massa (g)					
	0 dias		2 dias		4 dias	
	RT ^{1/}	CS ^{2/}	RT	CS	RT	CS
Controle	103,34 Ab ^{ns3/}	103,33 Ab	98,33 ABb*	94,67 Bb	93,67 Bb ^{ns}	93,00 Bb
GA ₃	163,34 Aa ^{ns}	163,67 Aa	162,67 Aa ^{ns}	155,33 Aba	152,67 Ba ^{ns}	153,34 Ba
Firmeza de polpa (N)						
Controle	50,00 Aa ^{ns}	51,00 Aa	39,00 Ba ^{ns}	40,33 Ba	8,67 Ca*	39,67 Ba
GA ₃	51,00 Aa ^{ns}	50,67 Aa	38,34 Ba ^{ns}	37,67 Ba	8,00 Ca*	13,33 Cb
Etileno (nL g ⁻¹ h ⁻¹)						
Controle	1,14 Aa*	0,60 Bb	1,30 Aa ^{ns}	1,00 Aba	1,80 Aa*	1,13 Aa
GA ₃	1,70 Aa ^{ns}	1,14 Aa	1,37 Aa ^{ns}	1,10 Aa	1,47 Aa*	1,07 Aa
Podridão (%)						
Controle	0,00 Ba ^{ns}	0,00 Ba	0,00 Bb*	12,50 Aa	11,00 Aa ^{ns}	10,00 Ab
GA ₃	0,00 Ba ^{ns}	0,00 Ca	1,67 Ba*	12,50 Ba	15,00 Aa*	20,00 Aa
Incidência de Lanosidade (%)						
Controle	0,00 Aa ^{ns}	0,00 Ca	0,00 Aa*	15,00 Ba	0,00 Aa*	93,34 Aa
GA ₃	0,00 Aa ^{ns}	0,00 Ba	0,00 Aa*	10,00 Aa	0,00 Aa*	18,34 Ab
Ácido ascórbico (mg 100g ⁻¹)						
Controle	2,07 Ca ^{ns}	1,86 Ba	3,24 Ba*	2,47 Aa	4,54 Aa*	2,27 Aba
GA ₃	2,60 Ba ^{ns}	2,15 Aa	3,20 Aa ^{ns}	2,60 Aa	3,70 Ab*	2,50 Aa

^{1/} Colheita

^{2/} Seis horas após armazenamento a frio.

^{3/} Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os tratamentos dentro de cada condição, em cada tempo. Médias acompanhadas por letra maiúscula diferente na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando o tempo dentro de cada condição, em cada tratamento. * e ^{ns} significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) em função de condição, dentro de cada tratamento em cada tempo.

Análise da qualidade do RNA total

Para assegurar a reprodutibilidade e a exatidão dos resultados pela análise em microarranjos, a quantidade, qualidade e pureza das amostras de RNA, estão entre as principais características a serem garantidas. Diante disto, de acordo com a fig. 1A e 1B se pode verificar que o RNA utilizado neste estudo estava íntegro, apresentava quantidade adequada e alta qualidade. Além da visualização clara das bandas de RNA ribossômico, correspondentes às frações 18S e 28S (Fig. 1A), pela cromatografia capilar (Fig. 1B) observou-se a presença dos dois picos nos tempos

de retenção de 40 e 45 minutos. Apenas uma repetição biológica (Control R2) resultou em fração adicional, mas que em gel de agarose apresentou perfil similar às demais amostras. Os valores de RIN (número de integridade do RNA) situaram-se entre 8.5 e 9.3, o que indica a alta integridade do RNA utilizado, uma vez que o valor máximo de RIN é 10, onde o RNA é considerado intacto (SCHROEDER et al., 2006).

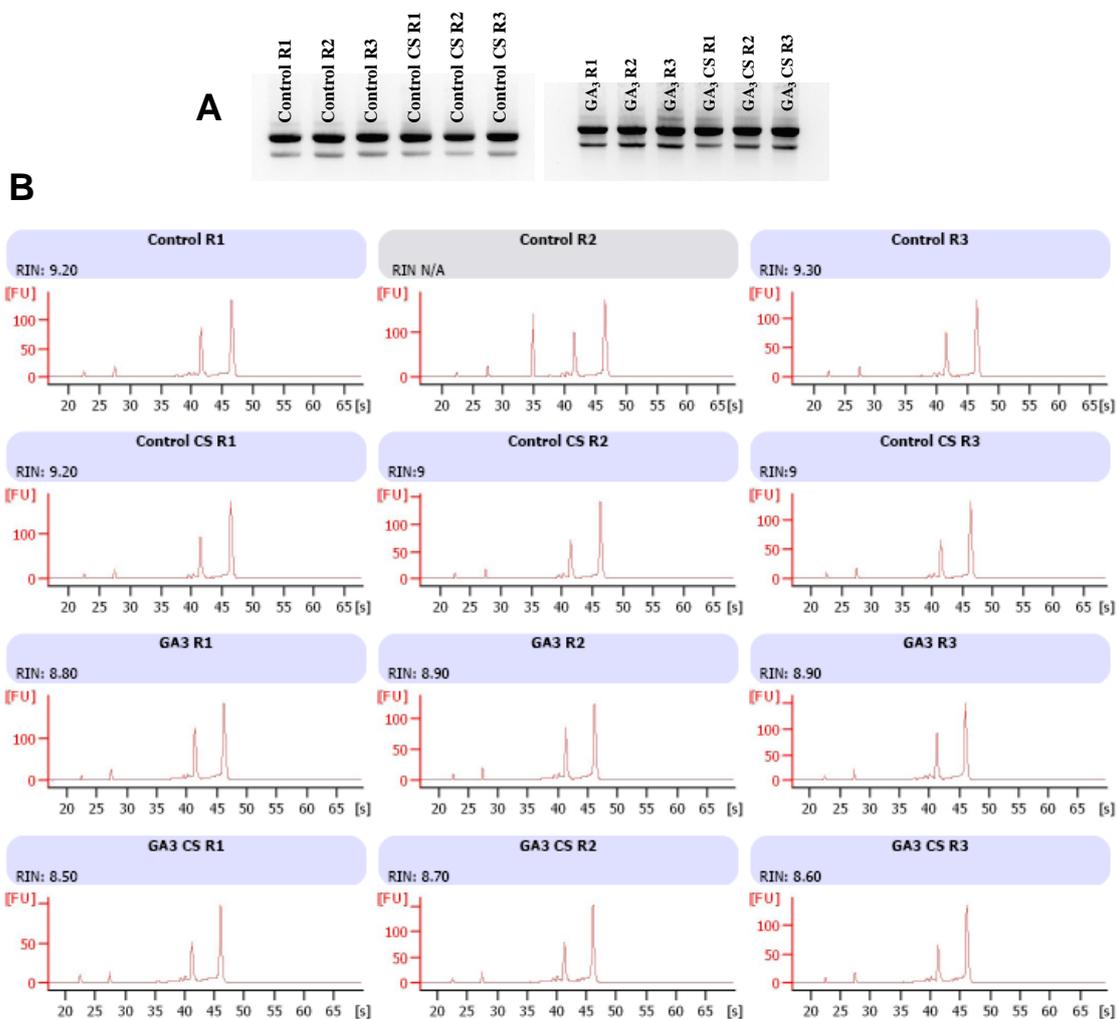


Figura 1 – Análise da qualidade das amostras de RNA. **A**: 2000 ng de RNA total em gel de agarose 1%. **B**: 200 ng de RNA em eletroforese capilar. O pico menor representa o 18S e o pico maior representa o 28S. O eixo X representa o tempo de migração (tamanho dos fragmentos), e o eixo Y representa a fluorescência (concentração). O valor de RIN representa o número da integridade do RNA, o qual é estimado pela presença ou ausência de produtos de degradação. GA₃: frutos colheita tratados com GA₃; C: frutos colheita controle; C-CS frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente; GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente.

Análise da expressão gênica em pêssegos tratados e não tratados com GA₃ armazenados a baixas temperaturas

Visando identificar o efeito da aplicação do GA₃ na prevenção da lanosidade, assim como os efeitos individuais e a interação de cada condição experimental, diferentes comparações foram feitas. Inicialmente, para verificar o efeito da aplicação do GA₃ no perfil transcricional, se compararam a colheita de frutos tratados com GA₃ (GA₃) com a colheita de frutos controle (C). Para identificar o efeito do frio na expressão gênica, compararam-se frutos do tratamento controle armazenados a frio (C-CS) com frutos do tratamento C. Buscando verificar o efeito da interação frio x GA₃ no nível de expressão transcricional, frutos tratados com GA₃ armazenados a frio (GA₃-CS) foram comparados com frutos GA₃. Por fim, para identificar as diferenças no perfil transcricional de frutos sem lanosidade e frutos com lanosidade, frutos GA₃-CS foram comparados com frutos C-CS.

Ao se fazer uma análise de componentes principais entre os tratamentos quantitativamente contrastantes (frutos tratados e não tratados com GA₃, que passaram por armazenamento a frio) pode-se verificar que o componente 1 foi capaz de separar os frutos tratados e não tratados no momento da colheita e frutos do tratamento controle após armazenamento a frio de frutos tratados após armazenamento a frio. O componente 2 separou os frutos tratados e não tratados no momento da colheita de frutos do tratamento controle após armazenamento a frio e frutos tratados após armazenamento a frio (Fig. 2). No momento da colheita, frutos tratados e não tratados com GA₃ apresentaram perfil transcricional similar, observando-se somente 137 genes alterados (45% induzidos e 55% reprimidos) (Fig. 3). Entretanto, quando se compara frutos controle que passaram por armazenamento a frio (C-CS) com frutos do tratamento controle no momento da colheita (C) se observa que a passagem pelo frio afetou de modo marcante a expressão transcricional, havendo 947 genes com expressão induzida ou reprimida (75% induzidos e 25% reprimidos) (Fig. 3). Similarmente, quando se comparam frutos tratados que passaram por armazenamento a frio (GA₃-CS) com frutos do mesmo tratamento, mas no momento da colheita (GA₃), verifica-se a alteração de 619 genes (75% induzidos e 25% reprimidos) (Fig. 3). Finalmente, ao se

compararem frutos sem lanosidade (GA₃-CS) com frutos com lanosidade (C-CS) se observa a alteração de 2899 genes (40% induzidos e 60% reprimidos) (Fig. 3). Assim, sob o aspecto quantitativo, fica evidente que as maiores variações transcricionais ocorrem mais em função do armazenamento e da interação entre GA₃ e frio.

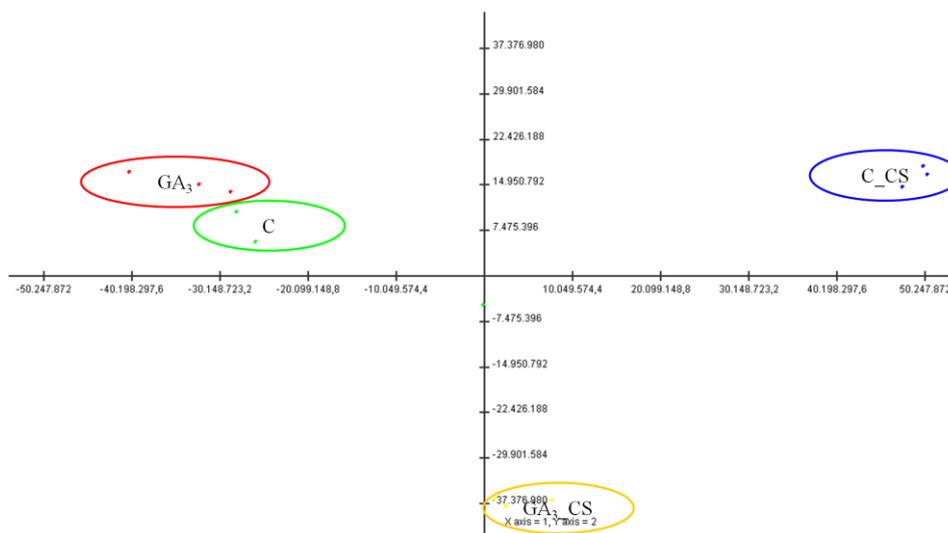


Figura 2 – Distribuição dos tratamentos através da análise de componentes principais. Os componentes 1 e 2 representam 87,2% da variação. GA₃: frutos colheita tratados com GA₃; C: frutos colheita controle; C-CS frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente; GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente.

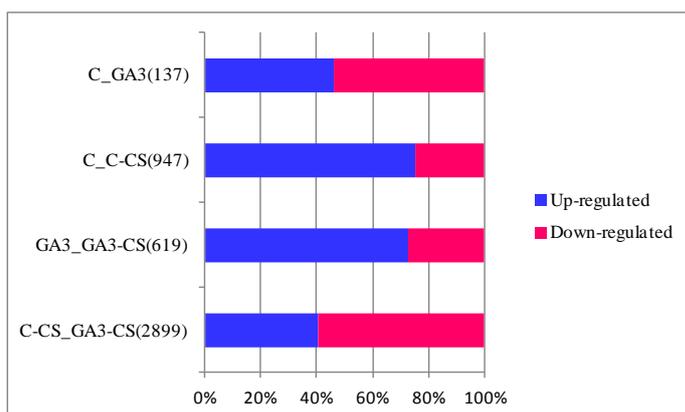


Figura 3 – Representação de genes induzidos e reprimidos nas diferentes condições experimentais. C_GA₃: frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle; C_C-CS frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle; GA₃_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃; C-CS_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente.

Ao se analisar a especificidade de cada gene induzido e reprimido (Fig. 4A e 4B) observou-se que a maioria dos genes é alterada de forma específica de acordo com a condição, demonstrando que o GA₃, o frio e a interação GA₃ x frio agem de forma específica no metabolismo dos frutos.

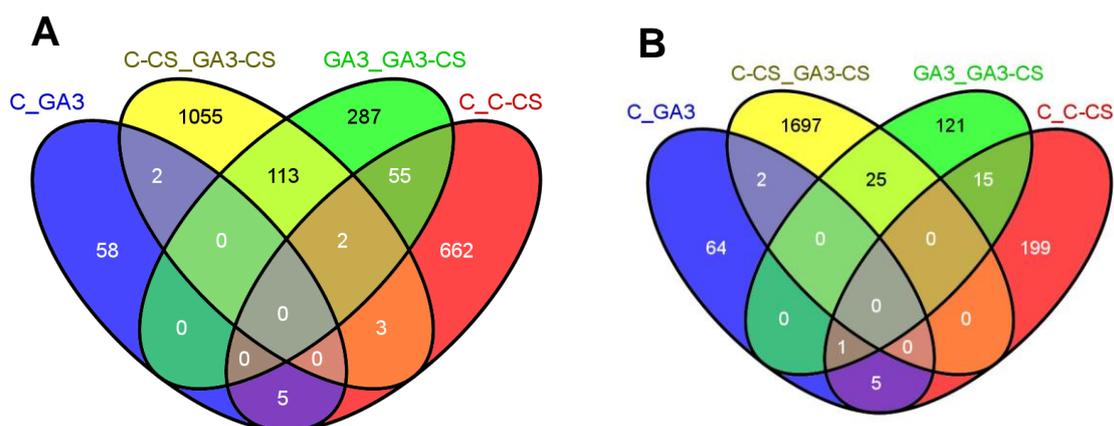


Figura 4 – Genes induzidos (A) e reprimidos (B) específicos em cada condição experimental. C_GA₃: frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle; C_C-CS frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle; GA₃_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃; C-CS_GA₃-CS: frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente.

Identificação da ontologia dos genes induzidos e reprimidos nas diferentes condições experimentais

Buscando caracterizar os genes alterados nas diferentes condições experimentais, as sequências foram submetidas a análises no programa *BLAST2GO*. As análises de *Gene Ontology* (GO) permitiram a identificação dos processos biológicos, da função molecular e a que componente celular cada gene induzido e reprimido correspondem.

Dos 137 genes alterados, quando se compara frutos GA₃ com frutos C, a maioria está relacionada aos seguintes processos biológicos: processo metabólico de pequenas moléculas (60% reprimidos e 40% induzidos), resposta a estresse (45% reprimidos e 55% induzidos), resposta a estímulos químicos (40% reprimidos e 60% induzidos), regulação de processos biológicos (50% reprimidos e 50% induzidos), processo de oxidação e redução (80% reprimidos e 20% induzidos),

processo metabólico relacionado ao nitrogênio (N) (60% reprimidos e 40% induzidos), processo metabólico celular (55% reprimidos e 45% induzidos), resposta celular a estímulos (40% reprimidos e 60% induzidos), processo catabólico (60% reprimidos e 40% induzidos), processo biossintético (45% reprimidos e 55% induzidos), desenvolvimento estrutural (20% reprimidos e 80% induzidos), resposta a estímulos (40% reprimidos e 60% induzidos) e processos metabólicos primários (50% reprimidos e 50% induzidos) (Fig. 5).

Dos 947 genes alterados, quando se compara frutos C-CS com frutos C, o envolvimento maior ocorre aos seguintes processos biológicos: processo metabólico de pequenas moléculas (15% reprimidos e 85% induzidos), complexo de biogênese de ribonucleoproteínas (5% reprimidos e 95% induzidos), resposta a estresses (25% reprimidos e 75% induzidos), resposta a outros organismos (35% reprimidos e 65% induzidos), resposta a estímulos endógenos (50% reprimidos e 50% induzidos), resposta a estímulos químicos (30% reprimidos e 70% induzidos), resposta a estímulos bióticos (35% reprimidos e 65% induzidos), resposta a estímulos abióticos (20% reprimidos e 80% induzidos), processo reprodutivo (10% reprimidos e 90% induzidos), regulação da qualidade biológica (35% reprimidos e 65% induzidos), regulação de processos biológicos (20% reprimidos e 80% induzidos), processos metabólicos primários (10% reprimidos e 90% induzidos), processos de oxidação e redução (30% reprimidos e 70% induzidos), organização de organelas (15% reprimidos e 85% induzidos), processos metabólicos relacionados ao N (15% reprimidos e 85% induzidos), processos metabólicos de macromoléculas (10% reprimidos e 90% induzidos), localização de macromoléculas (15% reprimidos e 85% induzidos), organização de subunidades de macromoléculas (100% induzidos), estabelecimento de localização (20% reprimidos e 80% induzidos), resposta celular a estímulos (25% reprimidos e 75% induzidos), processo metabólico celular (10% reprimidos e 90% induzidos), organização celular de macromoléculas (100% induzidos), localização celular (5% reprimidos e 95% induzidos), processo biossintético (10% reprimidos e 90% induzidos), processo catabólico (20% reprimidos e 80% induzidos) e desenvolvimento estrutural (10% reprimidos e 90% induzidos) (Fig. 6).

Os 619 genes alterados, quando se compara frutos GA₃-CS com frutos GA₃, pertencem especialmente aos seguintes processos biológicos: processo metabólico de pequenas moléculas (15% reprimidos e 85% induzidos), resposta a estresse (25% reprimidos e 75% induzidos), resposta a outros organismos (35% reprimidos e 65% induzidos), resposta a estímulos endógenos (100% induzidos), resposta a estímulos químicos (20% reprimidos e 80% induzidos), resposta a estímulos bióticos (50% reprimidos e 50% induzidos), resposta a estímulos abióticos (15% reprimidos e 85% induzidos), processo reprodutivo (15% reprimidos e 85% induzidos), regulação da qualidade biológica (15% reprimidos e 85% induzidos), regulação de processos biológicos (25% reprimidos e 75% induzidos), processo metabólico primário (25% reprimidos e 75% induzidos), processo de oxidação e redução (10% reprimidos e 90% induzidos), organização de organelas (25% reprimidos e 75% induzidos), processo metabólico relacionado ao N (20% reprimidos e 80% induzidos), processo metabólico de macromoléculas (25% reprimidos e 75% induzidos), localização celular de macromoléculas (30% reprimidos e 70% induzidos), estabelecimento da localização (45% reprimidos e 55% induzidos), resposta celular a estímulos (20% reprimidos e 80% induzidos), processo metabólico celular (25% reprimidos e 75% induzidos), localização celular (25% reprimidos e 75% induzidos), processo catabólico (15% reprimidos e 85% induzidos), processo biossintético (25% reprimidos e 75% induzidos) e desenvolvimento estrutural (20% reprimidos e 80% induzidos) (Fig. 7).

Os 2899 genes alterados quando se compara frutos não lanosos (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS), pertencem principalmente aos seguintes processos biológicos: processo metabólico de pequenas moléculas (65% reprimidos e 35% induzidos), processo de metabólitos secundários (45% reprimidos e 55% induzidos), biogênese de ribonucleoproteínas (65% reprimidos e 35% induzidos), resposta a estresses (55% reprimidos e 45% induzidos), resposta a outros organismos (55% reprimidos e 45% induzidos), resposta a estímulos endógenos (45% reprimidos e 55% induzidos), resposta a estímulos externos (35% reprimidos e 65% induzidos), respostas a estímulos químicos (55% reprimidos e 45% induzidos), resposta a estímulos bióticos (55% reprimidos e 45% induzidos), resposta a estímulos abióticos (55% reprimidos e 45% induzidos), processo reprodutivo (70% reprimidos e 30%

induzidos), regulação da função molecular (35% reprimidos e 65% induzidos), regulação da qualidade biológica (55% reprimidos e 45% induzidos), regulação de processos biológicos (50% reprimidos e 50% induzidos), biogênese de complexos de proteínas (80% reprimidos e 20% induzidos), processo metabólico primário (65% reprimidos e 35% induzidos), processo de metabolismo de pigmentos (20% reprimidos e 80% induzidos), processo de oxidação e redução (40% reprimidos e 60% induzidos), organização de organelas (60% reprimidos e 40% induzidos), processo metabólico relacionado ao N (65% reprimidos e 35% induzidos), processo baseado em microtúbulos (40% reprimidos e 60% induzidos), organização de membranas (65% reprimidos e 35% induzidos), processo metabólico de macromoléculas (70% reprimidos e 30% induzidos), localização de macromoléculas (80% reprimidos e 20% induzidos), organização das subunidades de macromoléculas (85% reprimidos e 15% induzidos), processo metabólico de hormônios (65% reprimidos e 35% induzidos), estabelecimento de localização (65% reprimidos e 35% induzidos), *packaging* DNA (80% reprimidos e 20% induzidos), mudança na conformação do DNA (75% reprimidos e 25% induzidos), desenvolvimento da maturação (70% reprimidos e 30% induzidos), desenvolvimento do crescimento (60% reprimidos e 40% induzidos), ritmo circadiano (40% reprimidos e 60% induzidos), resposta celular a estímulos (50% reprimidos e 50% induzidos), processo metabólico celular (75% reprimidos e 25% induzidos), organização celular de membranas (75% reprimidos e 25% induzidos), organização de subunidades de macromoléculas (85% reprimidos e 15% induzidos), localização celular (85% reprimidos e 15% induzidos), homeostase celular (40% reprimidos e 60% induzidos), processo de desenvolvimento celular (75% reprimidos e 25% induzidos), organização ou biogênese da parede celular (55% reprimidos e 45% induzidos), divisão celular (55% reprimidos e 45% induzidos), morte celular (55% reprimidos e 45% induzidos), ciclo celular (60% reprimidos e 40% induzidos), comunicação celular (40% reprimidos e 60% induzidos), processo catabólico (60% reprimidos e 40% induzidos), processo biossintético (70% reprimidos e 30% induzidos), processo de desenvolvimento estrutural (45% reprimidos e 55% induzidos) e envelhecimento (45% reprimidos e 55% induzidos) (Fig. 8).

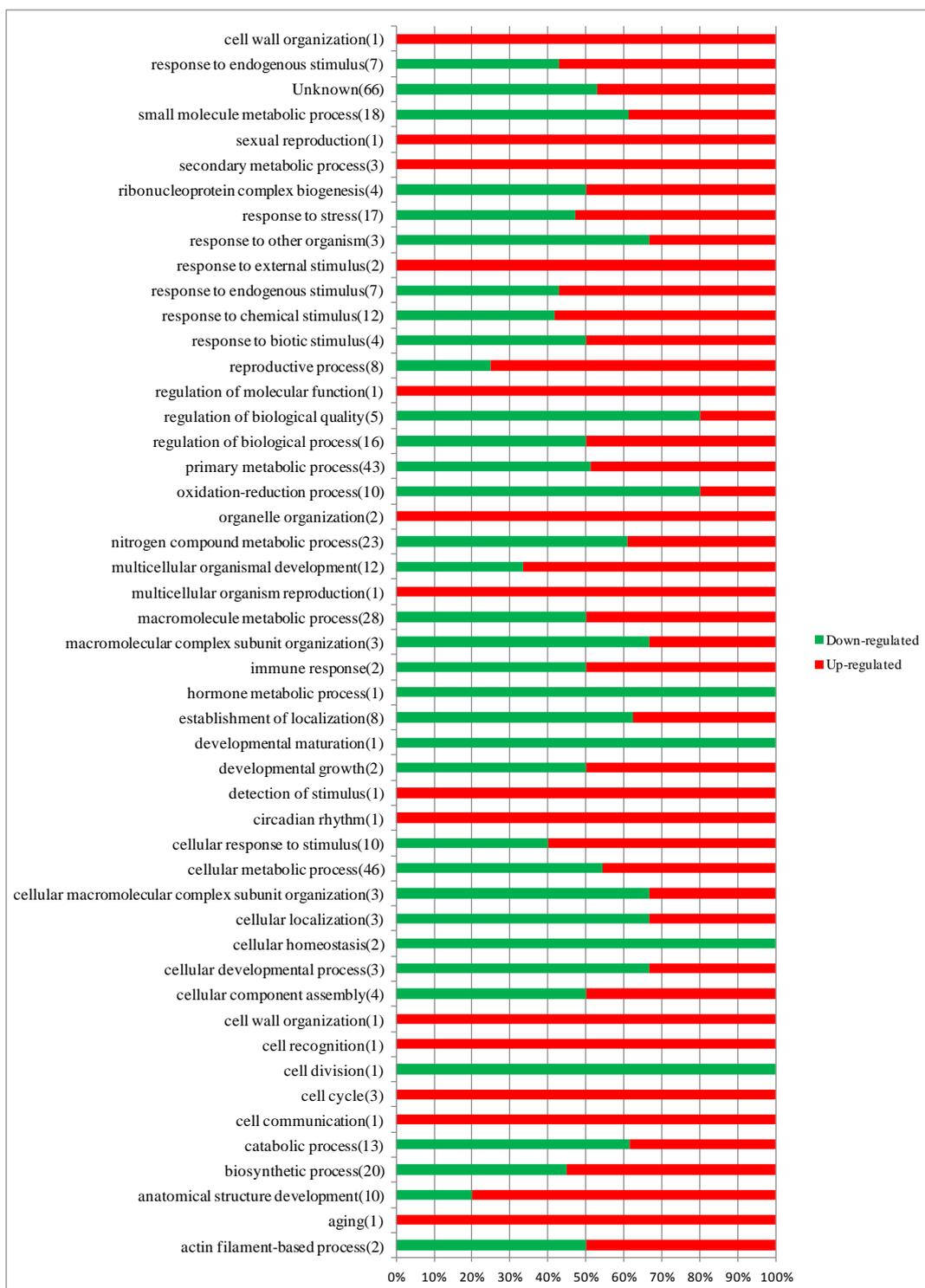


Figura 5 – Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_GA₃ (frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

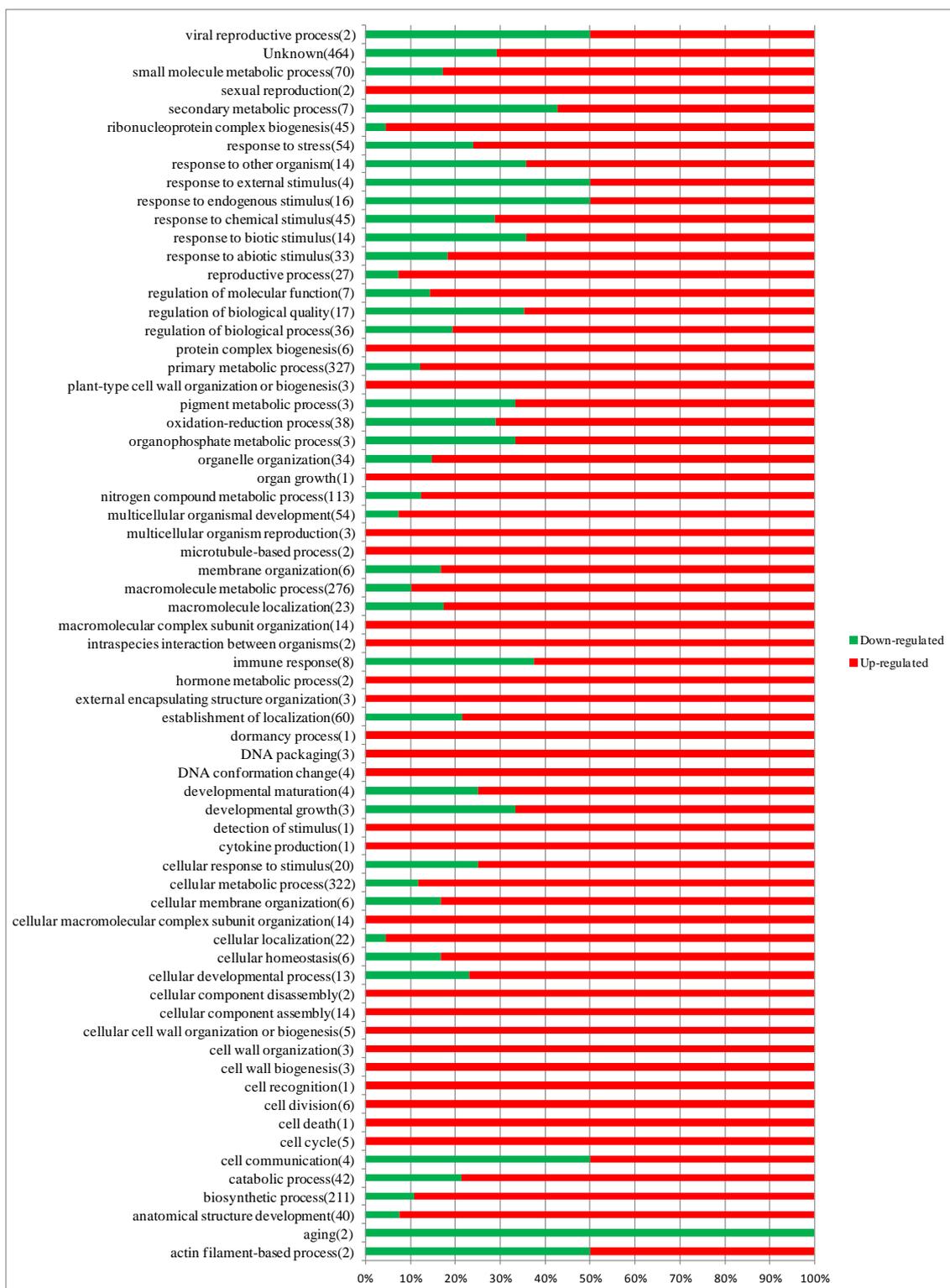


Figura 6 – Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_C-CS (frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).



Figura 7 – Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

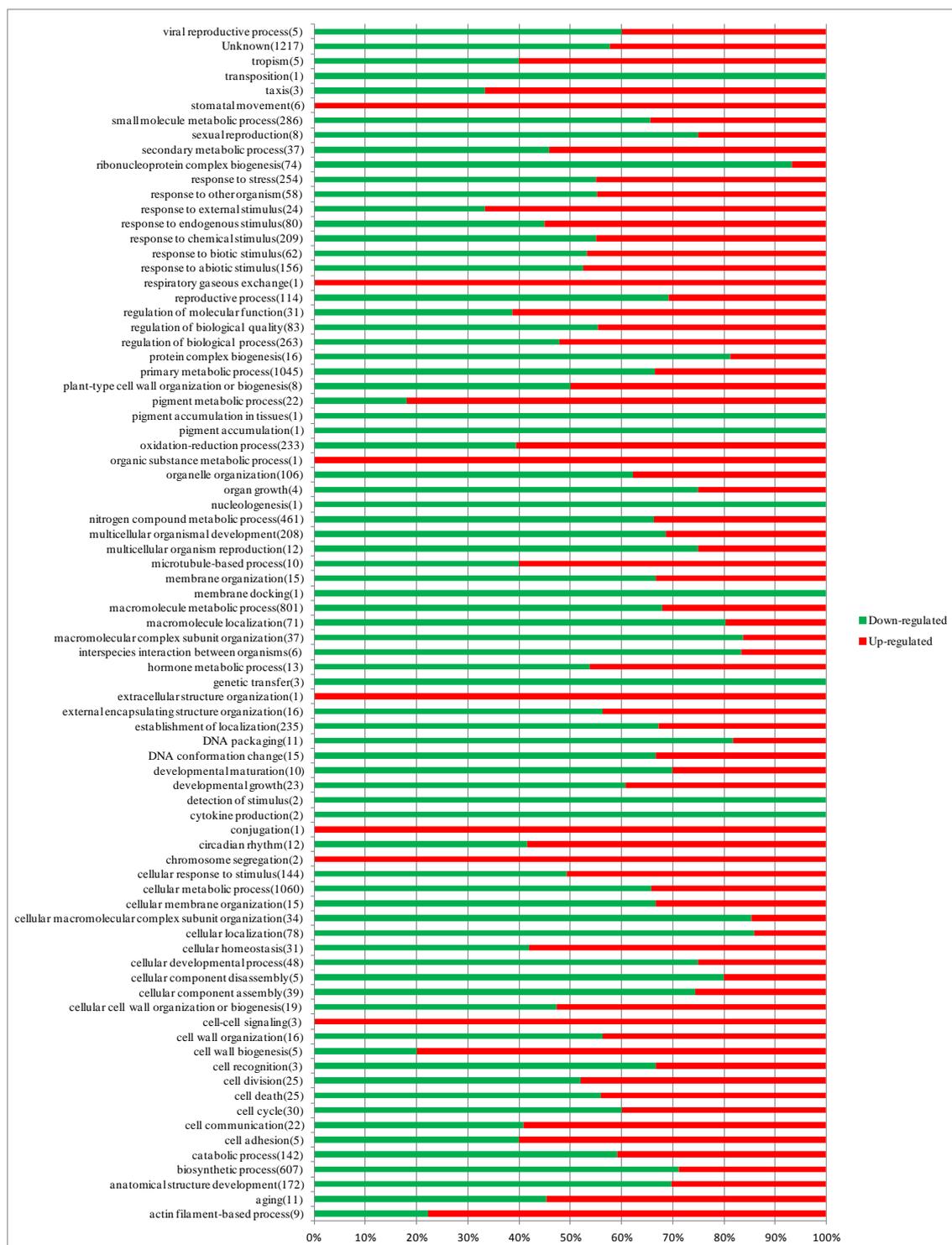


Figura 8 – Porcentagem acumulativa para processos biológicos de genes induzidos e reprimidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

Quando se compara frutos tratados com GA₃ com frutos C observa-se que os componentes celulares afetados pela ação do GA₃ são vesículas (20% reprimidos e

80% induzidos), complexos proteicos (60% reprimidos e 40% induzidos), parte de organelas (75% reprimidos e 25% induzidos), organelas sem membranas (60% reprimidos e 40% induzidos), organelas com membranas (55% reprimidos e 45% induzidos) e partes da célula (55% reprimidos e 45% induzidos) (Fig. 9). Quando se compara frutos C-CS com frutos C observa-se que os componentes celulares afetados pela ação do frio são vesículas (25% reprimidos e 75% induzidos), complexos DNA-proteínas (100% induzidos), complexos proteicos (10% reprimidos e 90% induzidos), parte de organelas (15% reprimidos e 85% induzidos), organelas sem membranas (5% reprimidos e 95% induzidos), organelas com membranas (20% reprimidos e 80% induzidos), partes da célula (20% reprimidos e 80% induzidos) e apoplasto (15% reprimidos e 85% induzidos) (Fig. 10). Quando se compara frutos GA₃-CS com frutos GA₃ observa-se que os componentes celulares afetados pela ação da interação GA₃ x frio são vesículas (35% reprimidos e 65% induzidos), complexos proteicos (15% reprimidos e 85% induzidos), parte de organelas (20% reprimidos e 80% induzidos), organelas sem membranas (25% reprimidos e 75% induzidos), organelas com membranas (20% reprimidos e 80% induzidos), partes da célula (20% reprimidos e 80% induzidos) e apoplasto (20% reprimidos e 80% induzidos) (Fig. 11). Quando se compara frutos não lanosos (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS), os componentes celulares afetados são vesículas (60% reprimidos e 40% induzidos), complexos DNA-proteínas (60% reprimidos e 40% induzidos), complexos proteicos (80% reprimidos e 20% induzidos), partes de organelas (70% reprimidos e 30% induzidos), organelas sem membranas (90% reprimidos e 10% induzidos), organelas com membranas (65% reprimidos e 35% induzidos), partes de regiões extracelulares (35% reprimidos e 65% induzidos), partes da célula (65% reprimidos e 35% induzidos) e apoplasto (35% reprimidos e 65% induzidos) (Fig. 12).

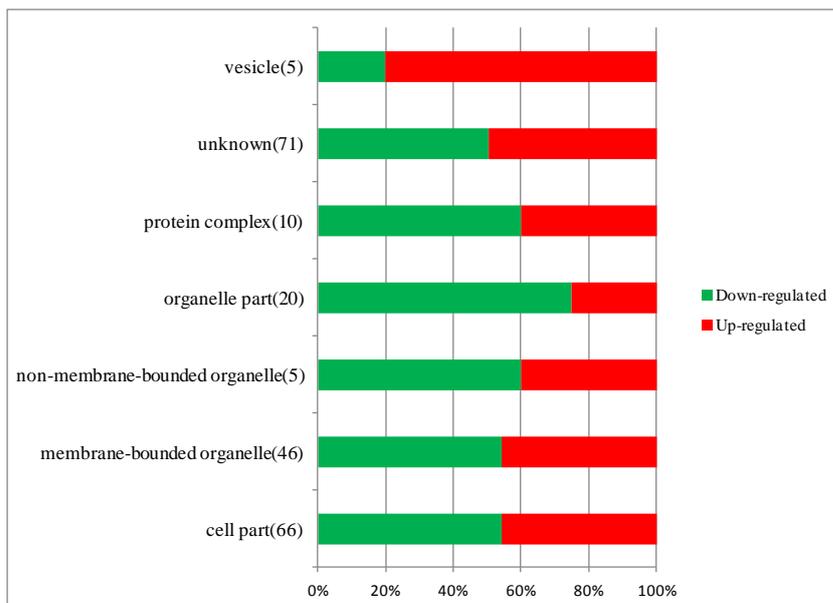


Figura 9 – Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_GA₃ (frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

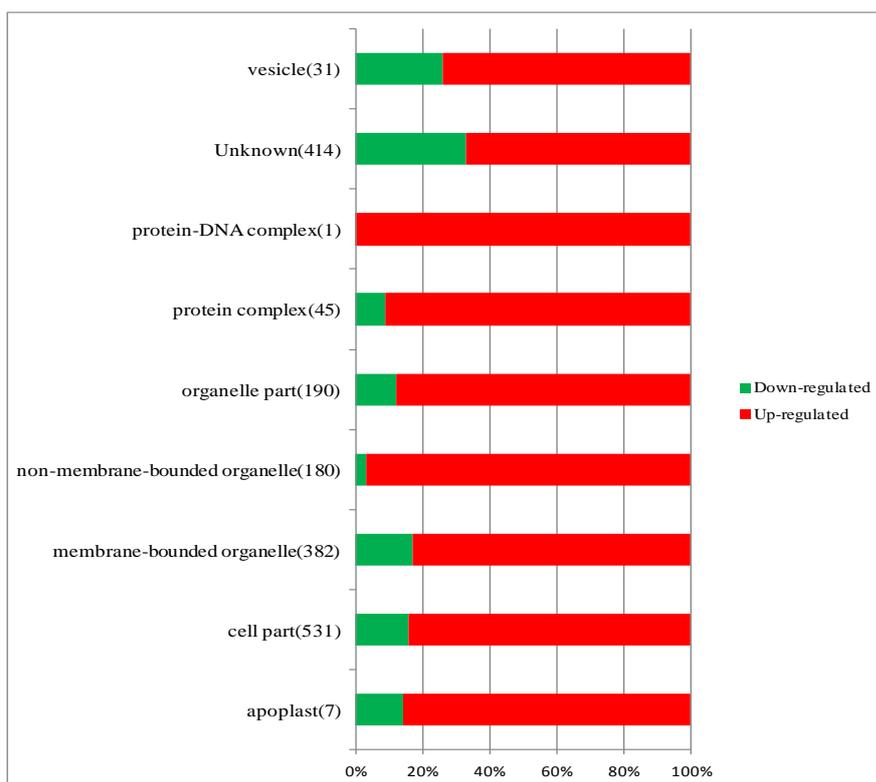


Figura 10 – Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzidos e reprimidos na condição experimental C_C-CS (frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

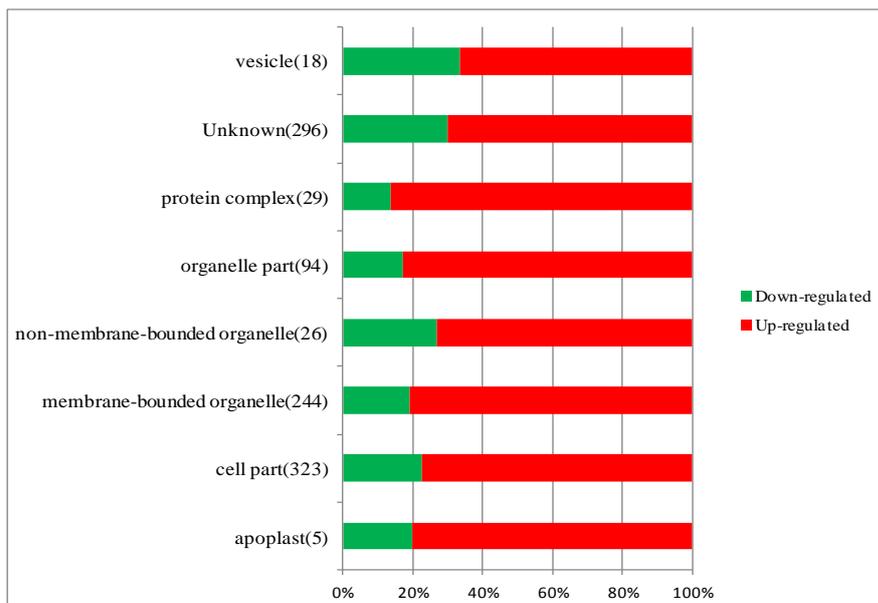


Figura 11 – Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzido e reprimido na condição experimental GA₃-GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

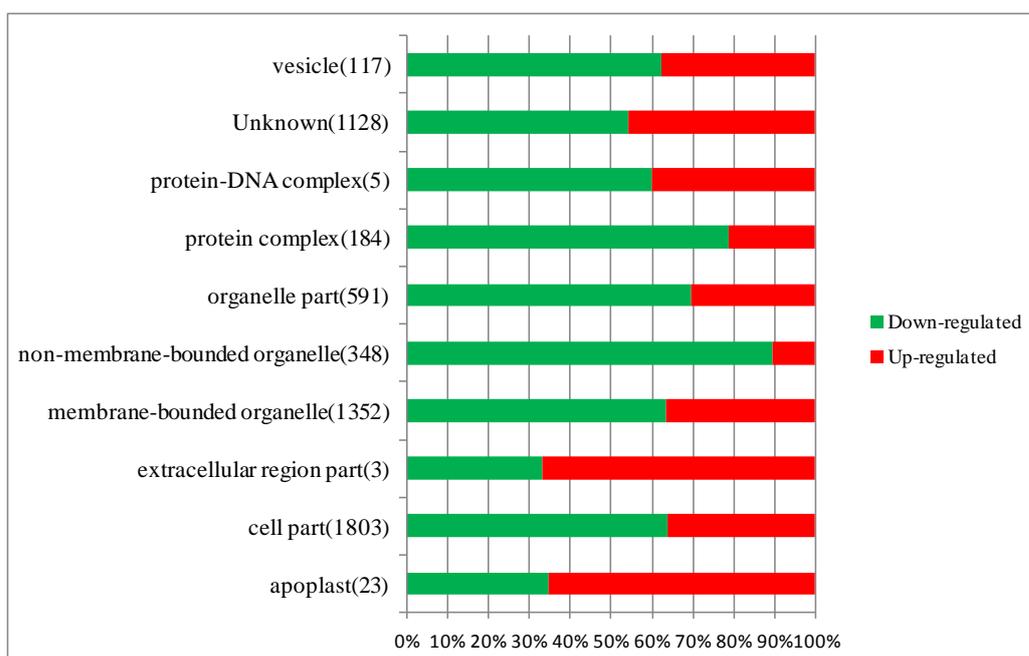


Figura 12 – Porcentagem acumulativa para componentes celulares que correspondem os genes induzido e reprimido na condição experimental C-CS-GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

Quando se compara frutos GA₃ com frutos C, as funções moleculares com maior número de genes afetados pela ação do GA₃ são atividade de transferase

(50% reprimidos e 50% induzidos), ligação de proteínas (60% reprimidos e 40% induzidos), atividade de oxidorreductase (75% reprimidos e 25% induzidos), ligação de nucleotídeos (65% reprimidos e 35% induzidos), ligação de ácidos nucleicos (55% reprimidos e 45% induzidos), ligação de íons (80% reprimidos e 20% induzidos) e atividade de hidrolase (45% reprimidos e 55% induzidos) (Fig. 13).

Quando se compara frutos C-CS com frutos C, as funções moleculares com maior número de genes afetados pela ação do frio são atividade de transporte transmembrana (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de transferase (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de transporte de substrato específico (20% reprimidos e 80% induzidos), constituinte estrutural de ribossomos (5% reprimidos e 95% induzidos), atividade de transdução de sinal (35% reprimidos e 65% induzidos), ligação de proteínas (15% reprimidos e 85% induzidos), atividade de oxidorreductase (35% reprimidos e 65% induzidos), ligação de nucleotídeos (5% reprimidos e 95% induzidos), ligação de ácidos nucleicos (10% reprimidos e 90% induzidos), atividade de liase (40% reprimidos e 60% induzidos), atividade de ligase (5% reprimidos e 95% induzidos), atividade de isomerase (15% reprimidos e 85% induzidos), ligação de íons (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de hidrolase (25% reprimidos e 75% induzidos) e ligação de cofatores (40% reprimidos e 60% induzidos) (Fig. 14).

Quando se compara frutos GA₃-CS com frutos GA₃, as funções moleculares com maior número de genes afetados pela ação da interação GA₃ x frio são atividade de transporte transmembrana (45% reprimidos e 65% induzidos), atividade de transferase (25% reprimidos e 75% induzidos), atividade de transporte específico (45% reprimidos e 55% induzidos), constituinte estrutural do ribossomo (65% reprimidos e 35% induzidos), atividade de transdução de sinal (30% reprimidos e 70% induzidos), atividade de fator de transcrição de ligação de sequência de DNA específica (30% reprimidos e 70% induzidos), ligação de proteínas (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de oxidorreductase (10% reprimidos e 90% induzidos), ligação de nucleotídeos (25% reprimidos e 75% induzidos), ligação de ácido nucleico (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de liase (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de ligase (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de isomerase (25% reprimidos e 75% induzidos), ligação de íons (20% reprimidos e 80% induzidos) e atividade de hidrolase (20% reprimidos e 80% induzidos) (Fig. 15).

Quando se compara frutos não lanosos (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS), as funções moleculares com maior número de genes afetados são ligação de vitaminas (65% reprimidos e 35% induzidos), atividade de transporte transmembrana (70% reprimidos e 30% induzidos), atividade de transferase (50% reprimidos e 50% induzidos), atividade de fator de transcrição (40% reprimidos e 60% induzidos), ligação tetrapirrole (30% reprimidos e 70% induzidos), atividade de transporte de substrato específico (75% reprimidos e 25% induzidos), constituinte estrutural do ribossomo (95% reprimidos e 5% induzidos), atividade de transdução de sinal (35% reprimidos e 65% induzidos), fator de transcrição de ligação de sequência de DNA específica (35% reprimidos e 65% induzidos), ligação de proteínas (65% reprimidos e 35% induzidos), atividade peroxidase (40% reprimidos e 60% induzidos), atividade de oxidoredutase (40% reprimidos e 60% induzidos), ligação de nucleotídeos (65% reprimidos e 35% induzidos), atividade de regulação de nucleosídeo trifosfato (60% reprimidos e 40% induzidos), ligação de ácidos nucleicos (70% reprimidos e 30% induzidos), ligação de metais (20% reprimidos e 80% induzidos), atividade de liase (55% reprimidos e 45% induzidos), ligação de lipídios (45% reprimidos e 55% induzidos), atividade de ligase (60% reprimidos e 40% induzidos), atividade de isomerase (70% reprimidos e 30% induzidos), ligação de íons (55% reprimidos e 45% induzidos), atividade de hidrolase (65% reprimidos e 35% induzidos), atividade de ativador de enzimas (35% reprimidos e 75% induzidos), ligação de cofatores (50% reprimidos e 50% induzidos), ligação de ácido carboxílico (70% reprimidos e 30% induzidos) e ligação de carboidratos (70% reprimidos e 30% induzidos) (Fig. 16).

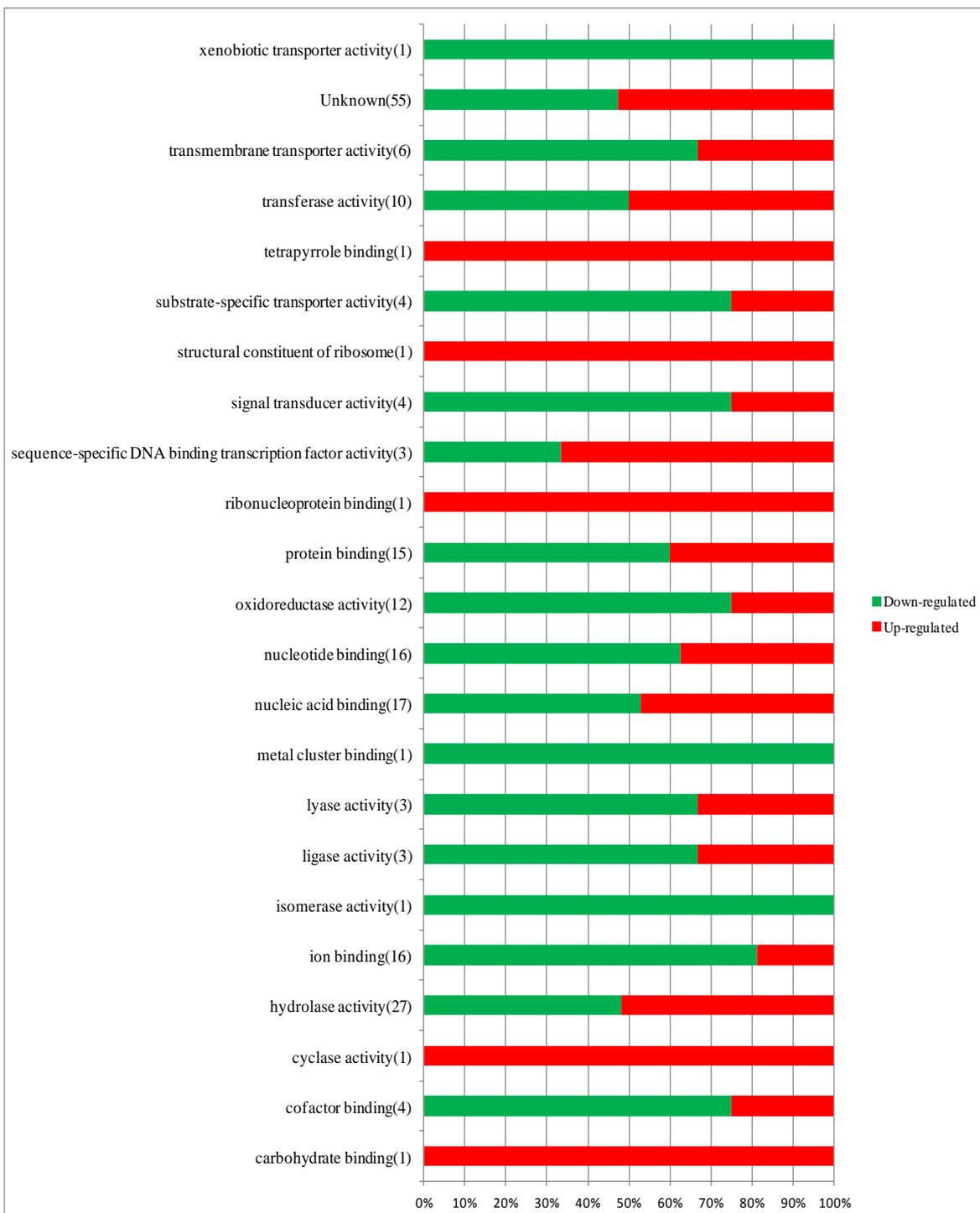


Figura 13 – Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e inibidos na condição experimental C_GA₃ (frutos colheita tratados com GA₃ comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

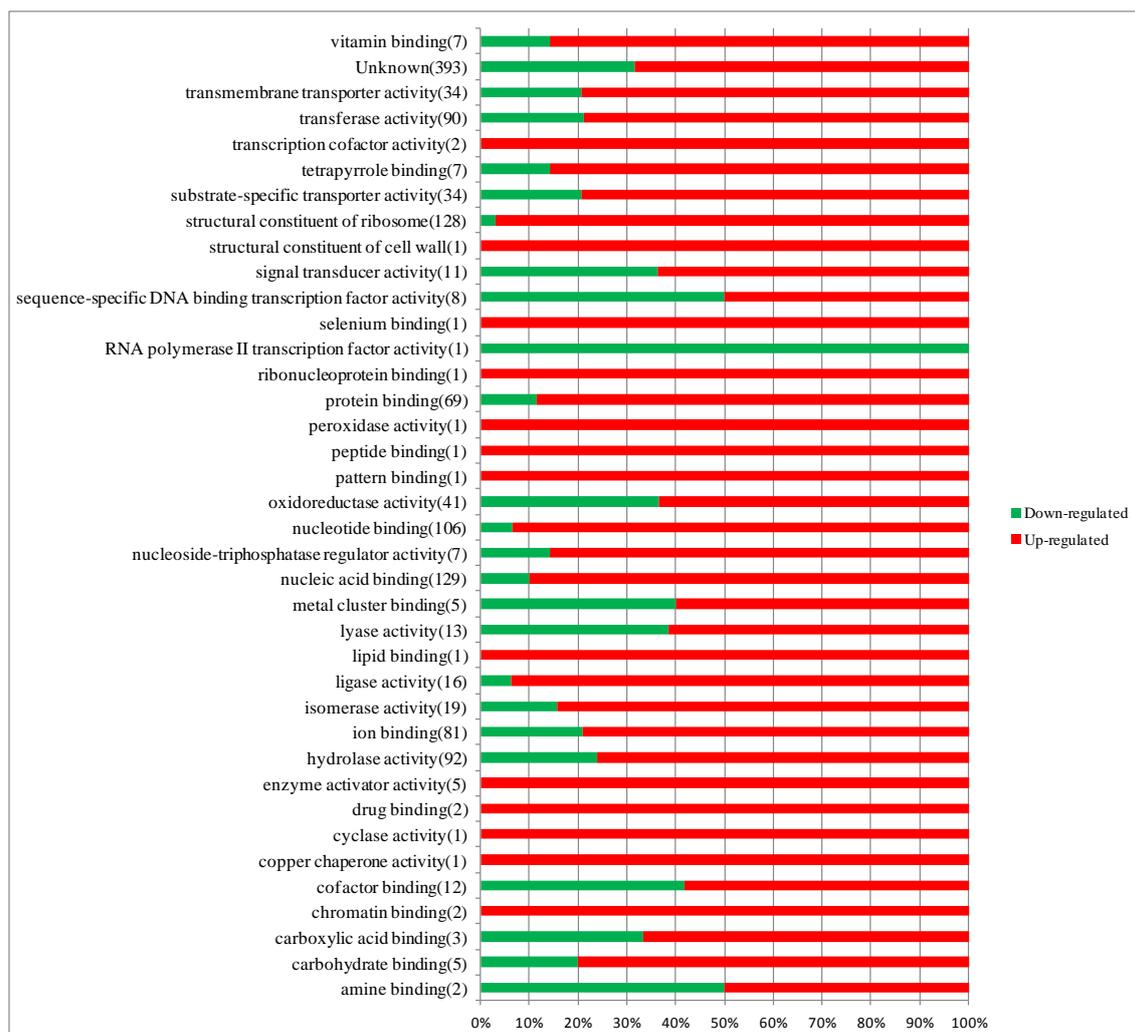


Figura 14 – Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e inibidos na condição experimental C_C-CS (frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita controle). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

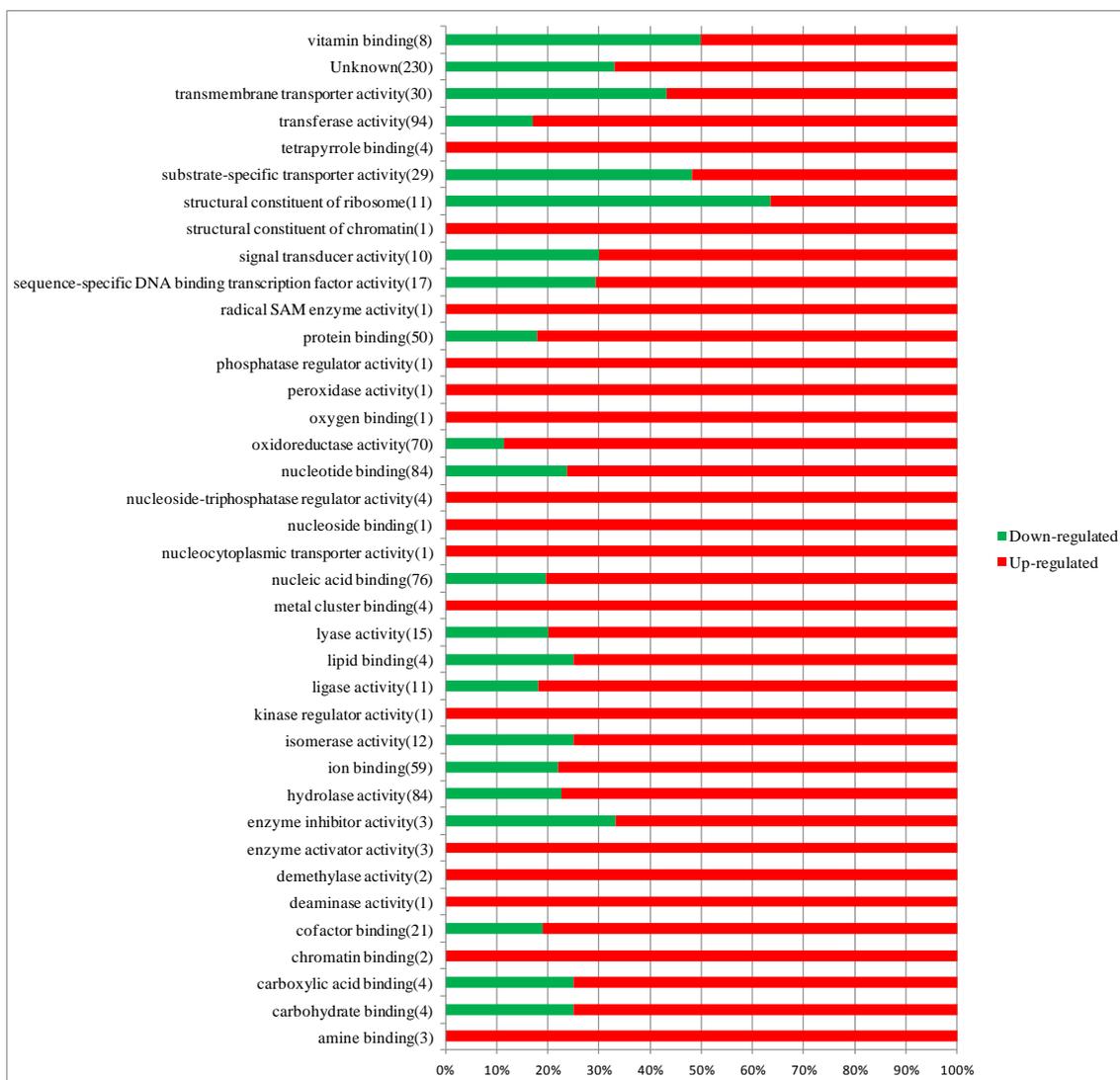


Figura 15 – Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e reprimidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos colheita tratados com GA₃). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).



Figura 16 – Porcentagem acumulativa para função molecular dos genes induzidos e reprimidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio mais dois dias em temperatura ambiente). *Down-regulated*: reprimido e *Up-regulated*: induzido (*Gene Ontology* nível 3).

Identificação das proteínas codificadas pelos genes induzidos e reprimidos nas diferentes condições experimentais

A maioria dos genes exibindo expressão diferencial nas condições experimentais testadas codifica proteínas desconhecidas e/ou não caracterizadas. Entretanto, através da utilização de ferramentas do programa *BLAST2GO*, foi possível a identificação de alguns produtos gênicos, os quais serão apresentados na sequência. Quando se comparam frutos tratados com GA₃ com frutos controle logo após a colheita, verifica-se que dos 137 genes alterados, 20% apresentam função conhecida. Quando se comparam frutos controle que passaram por armazenamento em baixas temperaturas com frutos controle logo após a colheita, verifica-se que dos 947 genes alterados, somente 11% apresentam função conhecida. Quando se comparam frutos tratados com GA₃ que passaram por armazenamento em baixas temperaturas com frutos tratados com GA₃ logo após a colheita, verifica-se que dos 619 genes alterados, 40% apresentam função conhecida. Finalmente, quando se comparam frutos não lanosos (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS) verifica-se que dos 2899 genes alterados, 20% apresentam função conhecida.

Buscando identificar o efeito da aplicação de GA₃, compararam-se frutos tratados com GA₃ com frutos não tratados (controle), ambos imediatamente após a colheita. Observou-se que houve a inibição de genes codificadores de enzimas como succinato-semialdeído desidrogenase (Met. da alanine, aspartato e glutamato), linoleato 13S-lipoxigenase (Met. do ácido α -Linolenico), frutoquinase (Met. amino açúcar e nucleotídeo açúcar), monodeidroascorbato redutase (Met. do ascorbato), adenosilhomocisteinase (Met. da metionina e cisteína), adenilil-sulfato redutase, fosfoadenilil-sulfato redutase, fosfoglicerato mutase (Met. do enxofre), carbonato desidratase (Met. nitrogênio), fosfoserina fosfatase (Met. metano), citocinina desidrogenase (Met. zeatina), glicoquinase (Glicólise e gliconeogênese) e álcool desidrogenase (ANEXO 1).

Por outro lado, a maioria dos genes induzidos em frutos tratados com GA₃ em relação ao controle codificam enzimas associadas ao metabolismo de lipídios, como diacilglicerol quinase e glicerol 3-fosfato aciltransferase (Met. glicerofosfolipídios), ceramida quinase (Met. esfingolipídios), 3-hidroxi-butirato (Síntese e degradação de

corpos cetônicos), triacilglicerol lipase (Met. glicerolipídios), acil-CoA redutase de graxos de cadeia longa (biossíntese de cutina e suberina) e 7-dehidrocolesterol redutase (Met. esteroides). Além destes, os genes codificadores de homocisteína-S-metiltransferase (Met. cisteína e metionina), carboxilesterase (Detoxificação de xenobióticos), 2-hidroxi-3-oxopropionato redutase (Met. glioxilato e dicarboxilato), fosfogluconato desidrogenase (Met. glutationa), pectinaesterease (Met. amido e sacarose), adenosina trifosfatase e guanilato ciclase (Met. purinas) e proteína tirosina quinase não específica (sinalização de MAP quinases) também foram induzidos em frutos tratados com GA₃ (ANEXO 2).

Para verificar o efeito do frio no perfil transcricional durante a maturação, compararam-se frutos controle que passaram por armazenamento a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente com frutos controle no momento da colheita. Dentre os genes inibidos, destacam-se os genes associados ao metabolismo de lipídios, os quais codificam linoleato 13S-lipoxigenase (Met. do ácido alfa linoleico), giberelina 3-beta dioxigenase (Biossíntese de diterpenóides), cicloartenol sintase (Biossíntese de esteroides), hidroximetilglutaril-CoA liase (Degradação do geraniol), glicerol quinase (Met. de glicerolipídios). Além disso, os genes codificadores de enzimas pertencentes aos metabolismos de aminoácidos (alanina, aspartato e glutamato; cisteína e metionina; glicina treonina e glicina), aminoaçúcares e nucleotídeo açúcares, glutationa, enxofre, metano, porfirinas e clorofilas, piruvato e riboflavinas; biossíntese de fenilpropanóides, flavonóides, alcalóides, glicanos e pantotenato e CoA; fixação de carbono; degradação de clorobenzene, clorociclohexano e glicanos, glicólise e gliconeogênese e transdução de sinal das quinases também foram inibidos pelo frio (ANEXO 3).

Os genes induzidos em resposta ao frio codificam as enzimas pertencentes a diferentes metabolismos, sendo verificados alguns processos biológicos com maior número de genes induzidos. Dentre estes, destacam-se o metabolismo de purinas (adenosina trifosfatase, adenilato quinase, nucleosídeo-trifosfato-adenilato-quinase, fosforibosil aminoimidazole carboxamida formiltransferase, fosforibosil formil glicinamidina sintase e fosforibosil formil glicinamidina formiltransferase), o metabolismo de aminoácidos (alanina, aspartato e glutamato; cisteína e metionina; fenilalanina; triptofano; degradação de lisina, valina, leucina e isoleucina), o

metabolismo de carboidratos (frutoquinase, pectato liase, exopoligalacturonase A, glucano endo-1,3- β -D-glucosidase), a biossíntese de aminoacil t-RNA (asparagina-tRNA ligase, aspartato-tRNA ligase, fenilalanina t-RNA ligase, prolina t-RNA ligase), a biossíntese de flavonóides (naringenim chalcona sintase, flavona 3-dioxigenase, flavonoide 3',5'-hidroxilase, flavonol sintase). As demais enzimas codificadas pelos genes induzidos pelo frio são quitinase e poligalacturonato 4- α -galacturonosil-transferase (Met. de amino açúcar e nucleotídeo açúcar), dodecil-CoA isomerase (Met. ácidos graxos), 5-oxoprolinase e glicose-6-fosfato desidrogenase (Met. glutationa), formil tetra hidrofolato deformilase (Met. glioxilato e dicarboxilato), adenilil sulfto redutase e fosfoadenilil-sulfato redutase (Met. enxofre), carbonato desidratase (Met. nitrogênio), DNA polimerase (Met. pirimidinas), lactoilglutaciona liase (Met. piruvato), fosfatase ácida (Met. da riboflavina), nucleosídeo trifosfatase (Met. tiamina), 4-cumarato-CoA-ligase e O-succinil-CoA ligase (Biossíntese de terpenóides), polineuridina aldeído esterase (Biossíntese de alcalóides), fosfomevalonato quinase e fosfoproteína fosfatase (Biossíntese de terpenóides), peroxidase (Biossíntese de fenilpropanóides), dolcil difosfo oligosacarídeo (Biossíntese de N-glicanos), cinamil álcool desidrogenase (Biossíntese de Fenilpropanóides), t-RNA dimetilaliltransferase (Biossíntese de zeatina), aspartato transaminase, frutose bifosfato aldolase, triose-fosfato isomerase (Fixação de carbono), carboxilesterase e hipoxantina fosforibosiltransferase (Detoxificação de xenobióticos), enoil-CoA-hidratase (Degradação de limoneno e pineno), citocromo c-oxidase e ubiquinol-citocromo-c-redutase (Fosforilação oxidativa), 6-fosfogluconolactonase (Rota das pentoses) e proteína tirosina quinase não específica (transdução de sinal das quinases) (ANEXO 4).

Buscando identificar o efeito da interação GA₃ e frio durante o amadurecimento, frutos tratados com GA₃ armazenados em ambiente refrigerado seguido de dois em temperatura ambiente foram comparados com aqueles avaliados logo após a colheita, mas que haviam sido tratados com GA₃. Observou-se que houve a inibição de genes codificadores de enzimas pertencentes a diferentes metabolismos, não sendo verificado nenhum processo biológico com grande número de genes inibidos. Os genes encontrados codificam as enzimas glutamato descarboxilase (Met. alanina, aspartato e glutamato), linoleato 13S-

lipoxigenase (Met. do ácido α -linolenico), UDP-arabinose-4-epimerase (Met. de amino açúcares e nucleotídeo açúcares), procolageno-prolina dioxigenase (Met. arginina e prolina), UDP-glicose-4-epimerase (Met. galactose), cisteína sintase (Met. enxofre), colina-fosfato-citidilil-transferase (Met. fosfonato e fosfinato), RNA polimerase (Met. de purinas), α -galactosidase (Met. esfingolípídios), nucleosídeo trifosfatase (Met. tiamina), hidroximetilglutaril-CoA-liase (Degradação do geraniol), ATPase de exportação (Fosforilação oxidativa), pantotenato quinase (Biossíntese de pantoteno e CoA), fosfoproteína fosfatase (Sinalização das quinases), proteína tirosina quinase não específica (Transdução de sinal das quinases), pectinaesterase (Met. da sacarose e do amido) e álcool desidrogenase (ANEXO 5).

Após o armazenamento refrigerado, grande parte dos genes induzidos em frutos tratados com GA₃, codificam enzimas relacionadas aos metabolismos de lípidios, glicólise/gliconeogênese e carboidratos. Os genes relacionados ao metabolismo de lípidios codificam as enzimas ácido abscísico 8-hidroxilase (Biossíntese de carotenóides), fosfatidato fosfatase (Met. éter), 3-hidroxidecanoil desidratase acetil CoA-carboxilase, crotonoil hidratase, 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase e enoil-CoA-hidratase (Met. de ácidos graxos), acilglicerol lipase, triacilglicerol lipase e UDP sulfoquinovose sintase (Met. de glicerolípídios), delta-12-ácido graxo desidrogenase, linoleato 13S-lipoxigenase (Met. ácido linoleico), lipoil sintase (Met. ácido lipóico) e dimetilalil trans transferase (Biossíntese de terpenóides). Os genes associados à glicólise e gliconeogênese codificam as enzimas 6-fosfofrutoquinase, dihidrolipoil desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, fosfoglicerato mutase, fosfopiruvato hidratase, piruvato quinase e triose fosfato isomerase. Os genes associados ao metabolismo da sacarose e do amido codificam as enzimas frutoquinase, glucano endo-1,3-beta-D-glucosidase, fosforilase, α - α -trealose sintase, trealose-fosfatase, pectato liase, pectina esterase, poligalacturonase, 1,3- β -glucan sintase, α -glucosidase, β -glucosidase e galacturano 1,4- α -galacturonidase/Exopolygalacturonase A. Além destes grupos gênicos, também apresentaram indução os genes codificadores de enzimas associadas aos metabolismos de aminoácidos (alanina, aspartato e glutamato; arginina e prolina; glicina, serina e treonina; lisina; valina, leucina e isoleucina; triptofano, fenilalanina e tirosina), galactose, glutationa, enxofre, purinas e pirimidinas, porfirinas e clorofilas,

amino açúcares e nucleotídeo açúcar, frutose e manose, glioxilato e dicarboxilato, fosfato isositol, pentoses fosfato, fenilalanina, propanoato, riboflavina, de compostos com selênio, vitamina B6; Biossíntese de aminoacil-tRNA, de alcaloides, de flavonas e flavonoides, de glicosaminoglicanos, do pantoteno, de zeatina; Degradação de aminobenzoato, do clorociclo hexano, de glicano; Fosforilação oxidativa, Ciclo do Citrato e transdução de sinal das quinases (ANEXO 6).

Ao comparar frutos sem lanosidade com frutos lanosos (frutos tratados com GA₃ armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente) verificou-se que houve um grande número de genes com expressão transcricional alterada. Os metabolismos de lipídios, glioxilato e dicarboxilato, purinas, pirimidinas, carboidratos, biossíntese de aminoacil t-RNA, glicólise e gliconeogênese e fosforilação oxidativa são os que apresentam maior número de genes reprimidos. Os genes reprimidos relacionados ao metabolismo de lipídios, codificam as enzimas jasmonato O-metil transferase (Met. ácido α -linolenico), diacilglicerol colina fosfotransferase (Met. éter), 3-hidroxidecanoil-desidratase e ácido graxo-acil-CoA-sintase (Biossíntese de ácidos graxos), aldeído desidrogenase, dodecenoil-CoA-isomerase, enoil-CoA hidratase e monooxigenase (Met. ácidos graxos), galactolipase (Met. glicerolipídios), CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidil transferase, colina-fosfato citidilil transferase, fosfatidilcolina-esterol-O-aciltransferase, fosfatidil-N-metiletanol amine N-metiltransferase e fosfoetanol amine N-metiltransferase (Met. glicerofosfolipídios), fosfatidil inositol N-acetilglicosaminil transferase (Biossíntese de Glicosil fosfatidil inositol GPI), 3-oxo-5- α -esteroide 4-desidrogenase e estradiol 13 β -desidrogenase (Biossíntese de esteroides), giberelina 3 β -dioxigenase (Biossíntese de diterpenóides), fosfomevalonato quinase e succinil benzoato CoA ligase (Biossíntese de terpenóides). Os genes reprimidos relacionados ao metabolismo do glioxilato e dicarboxilato codificam as enzimas citrato sintase, formilmetionina deformilase, isocitrato liase, malato desidrogenase e oxalato oxidase. Os genes reprimidos relacionados ao metabolismo de purinas codificam as enzimas adenosina desaminase, adenosina trifosfatase, adenilato quinase, GMP sintase, GTP difosfoquinase, guanilato ciclase, hipoxantina fosforibosil transferase, IMP ciclohidrolase, fosforibosil aminoimidazole carboxilase, fosforibosil amino

imidazole carboxamida formil transferase, fosforibosil amino imidazole succino carboxamida sintase, fosforibosil formil glicinamidina ciclo-ligase, fosforibosil formil glicinamidina sintase, ribose-fosfato difosfo quinase e RNA polimerase. Os genes associados ao metabolismo de pirimidinas codificam as enzimas 5'-nucleotidase, CTP sintase, DNA polimerase, dMTP quinase, nucleosídeo trifosfato adenilato quinase, uracil fosforibosiltransferase e uridina quinase. Os genes reprimidos relacionados ao metabolismo do amido e da sacarose codificam as enzimas 1,3- β -glucan sintase, α -glicosidase, β -frutofuranosidase, celulose sintase, frutoquinase, galacturano-1,4- α -galacturonidase, sacarose α -glicosidase, sacarose sintase, UDP-glucoronato descarboxilase, β -galactosidase, β -glucuronidase, pectato liase, pectinaesterase e poligalacturonase. Os genes reprimidos associados à biossíntese de aminoácil t-RNA codificam as enzimas asparagina t-RNA ligase, glutamato t-RNA ligase, glicina t-RNA ligase, histidina t-RNA ligase, isoleucina t-RNA ligase, leucina t-RNA ligase, lisina t-RNA ligase, fenilalanina t-RNA ligase, prolina t-RNA ligase, treonina t-RNA ligase, triptofano t-RNA ligase e valina t-RNA ligase. Os genes reprimidos associados à glicólise e gliconeogênese codificam as enzimas 6-fosfofrutoquinase, álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, dihidrolipoil lisina acetil transferase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e piruvato desidrogenase. Os genes reprimidos relacionados à fosforilação oxidativa codificam as enzimas citocromo c-oxidase, ATPase, difosfatase inorgânica, NADH desidrogenase, NADH ubiquinona redutase e ubiquinol citocromo c-redutase.

Os demais genes reprimidos codificam enzimas envolvidas nos metabolismos de aminoácidos (alanina, aspartato e glutamato; arginina e prolina; lisina; fenilalanina; cisteína e metionina; glicina, treonina e serina; cianoaminoácidos), aminoaçúcares e nucleotídeo açúcares, ácido araquidônico, ascorbato e aldarato, butanoato, fixação de C, ciclo de Krebs, frutose e manose, glutationa, nicotianamida, N, pentose fosfato, porfirinas e clorofilas, propanoato, piruvato e riboflavina. Na biossíntese de antocianinas, ansamicinas, flavonoides, folatos, glicosaminoglicanos, glicosil fosfatidil inositol, alcaloides, N-glicanos, pantoteno e CoA, e zeatina. E na degradação do clorociclohexano e clorobenzeno, flurobenzoato e glicosaminoglicanos.

O metabolismo que mais apresenta genes induzidos em frutos sem lanosidade é o metabolismo de lipídios. Os metabolismos da galactose, da fenilalanina, porfirinas e clorofilas, purinas, pirimidinas e carboidratos também apresentam um número elevado de genes induzidos em frutos sem lanosidade. Os genes induzidos associados com o metabolismo de lipídios codificam as enzimas 12-oxofitodienoato redutase, hidroperóxido desidratase e linoleato 13-lipoxigenase (Met. do ácido α -linolênico), fitoeno sintase (Met. de terpenóides), ent-caureno oxidase (Biossíntese de diterpenóides), acil-CoA sintase (Biossíntese de ácidos graxos), acetil-CoA C-acetiltransferase, acil-CoA carboxilase, acil-CoA desidrogenase, acil-CoA oxidase, álcool desidrogenase, acil-CoA ligase e monooxigenase (Met. ácidos graxos), acilglicerol lipase, álcool desidrogenase, aldeído redutase, diacil glicerol O-aciltransferase, galactolipase, monogalactosil diacilglicerol sintase, fosfolípido diacil glicerol aciltransferase e triacil glicerol lípase (Met. glicerolípídios), diacilglicerol quinase, fosfatidato citidilil transferase, fosfatidato fosfatase, fosfatidil colina esteroil O- aciltransferase e fosfolipase D (Met. glicerofosfolípídios), delta 12-ácido graxo desidrogenase (Met. ácido linoleico), lipoil sintase (Met. ácido lipóico), 3-deoxi-mano-octulosanate citidilil transferase (Biossíntese de lipopolissacarídeos), mentol desidrogenase e neomentol desidrogenase (Biossíntese de monoterpenóides), glucosil ceramidase, serina C-palmitoil transferase (Met. esfingolípídios), cicloartenol sintase, 3- α -hidroxiesteróide desidrogenase, 3- β -hidroxi-delta-5-esteróide desidrogenase e delta-4-3-oxoesteróide-5- β -redutase (Biossíntese de esteróides), 3-hidroxiisobutirato desidrogenase (Síntese e degradação de corpos cetônicos), farnesil difosfato sintase, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintase, dimetilalil transferase, geranilgeranil difosfato sintase, heptaprenil difosfato sintase e O-succinilbenzoato CoA ligase (Biossíntese de terpenóides). Os genes relacionados ao metabolismo da galactose codificam as enzimas β -galactosidase, galactinol rafinose galactosil transferase, galactinol sacarose galactosil transferase, galactoquinase e inositol 3- α -galactosil transferase. Os genes relacionados ao metabolismo da fenilalanina codificam as enzimas fenilalanina 4-cumarato-CoA ligase, 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, amidase, D-aminoácido desidrogenase, D-aminoácido transaminase e peroxidase. Os genes relacionados ao metabolismo das porfirinas e clorofilas

codificam as enzimas clorofilase, ferroquelatase, ferroxidase, mangnésio protoporfirina IX metil transferase, mangnésio protoporfirim IX mono-metil-éster, porfilinogen sintase e protoclorofilil redutase. Os genes associados ao metabolismo das purinas codificam as enzimas adenosina nucleosidase, adenosina trifosfatase, adenilato quinase, alantoato deiminase, alantoinase, GTP difosfoquinase, guanosina 3', 5' bis difosfato, inosina nucleosidase e RNA polimerase. Os genes associados ao metabolismo das pirimidinas codificam as enzimas 5'nucleotidase, DNA polimerase, RNA polimerase, uracil fosforibosil transferase e uridina quinase. Os genes associados ao metabolismo do amido e da sacarose codificam as enzimas 1,3- β -glucan sintase, enzima 1,4- α -glucan, α - α -trealose fosfato sintase, α -amilase, α -glicosidase, β -amilase, β -glicosidase, β -glucoronidase, celulose sintase, galacturano 1,4- α -galacturonidase, glucan endo 1,3- β -D-glicosidase, glicose-1-fosfato adenililtransferase, glucuronosil transferase, fosforilase, amido sintase, sacarose sintase, sacarose fosfato sintase, trealose fosfatase, pecto liase, pectina esterase e poligalacturonase.

Os demais genes induzidos codificam enzimas pertencentes aos metabolismos de aminoácidos (alanina, aspartato e glutamato; glicina, serina e treonina; fenilalanina, tirosina e triptofano; arginina e prolina; cisteína e metionina; cianoaminoácidos), amino açúcares e amino nucleotídeos, frutose e manose, glutationa, glioxilato e dicarboxilato, fosfato inositol, enxofre, metano, nicotianamida, N, pentose fosfato, propanoato, piruvato, riboflavina, taurina e hipotaurina e tiamina. Biossíntese de aminoacil t-RNA, antocianinas, sideróforos, flavonoides, folatos, glicosaminoglicanos, alcaloides, glicanos, peptídeoglicanos e fenilpropanóides. Degradação de aminobenzoato, clorociclohexano e clorobenzeno, glicanos, e ciclo de Krebs, etileno, gliólise e gliconeogênese, fosforilação oxidativa, sinalização fosfatidilinositol.

8.4 Discussão

Para identificar os mecanismos moleculares coordenados pelo GA₃ na prevenção da lanosidade em pêssegos, neste estudo analisou-se o perfil de expressão gênica de 30.000 ESTs. Esta análise foi feita no momento da colheita e

dois dias após armazenamento a frio ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) em pêssegos tratados e não tratados com GA_3 na pré-colheita. Como era esperado para este modelo biológico (PEGORARO et al., 2010 e PEGORARO et al., 2011), a aplicação de GA_3 na pré-colheita previne parcialmente a ocorrência de lanosidade em pêssegos armazenados a frio, enquanto que em pêssegos não tratados, este distúrbio atinge a totalidade dos frutos (tab. 1). A manifestação máxima do sintoma ocorre quatro dias após a retirada dos frutos da câmara fria, assim, como se buscou estudar mecanismos potencialmente reguladores deste problema, as avaliações comparativas de perfis transcricionais foram realizadas anteriormente a externalização fisiológica, ou seja, dois dias após CS. Além disso, a colheita de frutos tratados e não tratados também foi avaliada.

Nos estudos anteriores que precedem este trabalho, e que deram sustentação à hipótese, foi observado que: i) a lanosidade é decorrência de um amadurecimento anormal devido a danos fisiológicos causados por baixas temperaturas (LURIE e CRISOSTO, 2005); ii) o amadurecimento normal de pêssegos é precedido da ativação transcricional de genes envolvidos com a biossíntese de etileno, respiração celular e metabolismo de parede celular, (TRAINOTTI et al., 2003; TRAINOTTI et al., 2006; VIZOSO et al., 2009); iii) os perfis transcricionais diferenciais entre frutos com e sem lanosidade apontam para o estímulo de genes relacionados com metabolismo de parede celular e inibição de genes relacionados ao metabolismo de etileno, metabolismo de parede celular, homeostase celular, tráfico endomembranas (GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; OGUNDIWIN et al., 2008; VIZOSO et al., 2009; SUN et al., 2010). Como pêssegos das cultivares Chimarrita e Chiripá são altamente sensíveis à ocorrência de lanosidade (tab. 1), e sabe-se que a aplicação de GA_3 antes do endurecimento do caroço previne o problema (PEGORARO et al., 2010; PEGORARO et al., 2011), buscou-se entender qual o envolvimento deste regulador de crescimento no controle da lanosidade. Neste estudo observou-se que há respostas estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) frente a aplicação de GA_3 , do armazenamento a frio e da interação GA_3 x frio.

Ontologia dos genes induzidos e reprimidos nas diferentes condições experimentais

Dentre os processos biológicos alterados quando se compara frutos sem lanosidade (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS), pode-se destacar metabólitos secundários, processo reprodutivo, processo de oxidação e redução, organização de organelas, processo baseado em microtúbulos, processo metabólico de hormônios, estabelecimento da localização celular, mudanças na conformação do DNA, organização celular e membranas, homeostase celular, metabolismo de parede celular, desenvolvimento da maturação e comunicação celular. Destes 14 processos, 12 já haviam sido citados em trabalhos anteriores (GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; VIZOSO et al., 2009; PEGORARO et al., 2010; SUN et al., 2010). Entretanto, a alteração dos perfis transcricionais de genes relacionados com a conformação do DNA e comunicação celular ainda não haviam sido associados com desenvolvimento de lanosidade.

Neste estudo, um grande número de genes apresentou perfil de expressão diferencial nas condições experimentais estudadas, conseqüentemente, inúmeras funções moleculares foram alteradas. A atividade de transporte transmembrana, atividade de transdução de sinal, fator de transcrição de ligação de sequência de DNA específica, ligação de proteínas, atividade de oxidoredutase, ligação de nucleotídeos e ligação de lipídios estão entre as principais funções moleculares alteradas quando se compara frutos não lanosos (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS). Estes resultados sugerem que a ocorrência da lanosidade está associada com um desequilíbrio entre as funções de sinalização gênica, com alteração na constituição das membranas, no transporte intracelular e dos processos de oxidorredução, provavelmente induzidos por alterações epigenéticas, como é o caso da conformação do DNA.

Os componentes celulares alterados quando se compara frutos não lanosos com frutos lanosos são principalmente vesículas, organelas e membranas. Estes resultados reforçam estudos prévios (GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; VIZOSO et al., 2009), os quais demonstraram que a lanosidade está associada com alterações ocasionas nestes componentes celulares.

Proteínas codificadas pelos genes induzidos e reprimidos nas diferentes condições experimentais

Frutos tratados com GA₃ comparados com frutos controle no momento da colheita

Comparado às demais condições experimentais, no momento da colheita foi observada pouca alteração no perfil transcricional entre frutos tratados e não tratados com GA₃. Em frutos tratados, destacam-se a indução de genes associados ao metabolismo de lipídios, como *Ceramida quinase*, pertencente ao metabolismo de esfingolipídios e *Diacil glicerol quinase* e *Glicerol-3-fosfato aciltransferase*, pertencentes ao metabolismo glicerofosfolipídios. Este resultado sugere que o GA₃ tem ação sobre a composição das membranas e a sinalização celular. Esfingolipídios e glicerofosfolipídios são os principais componentes estruturais das membranas, distribuídos assimetricamente, tornando as membranas estáveis e permitindo o transporte vesicular (KIHARA e IGARASHI, 2004). Além disso, esfingolipídios atuam como moléculas bioativas no processo de transdução de sinal e regulação celular (WORRALL et al., 2003; DUNN et al., 2004). Muitos agentes estressores regulam o metabolismo de esfingolipídios e causam acúmulo de ceramidas (biorreguladores), responsáveis por induzir muitas respostas a estresse, como apoptose e paralização do ciclo celular (HANNUM e LUBERTO 2000). Além das mudanças ocasionadas no perfil transcricional de genes associados com o metabolismo de lipídios, acredita-se que o GA₃ atua nos níveis de conformação e metilação do DNA. Esta hipótese é fundamentada a partir dos dados de expressão, onde se verificou que os frutos com perfil de expressão semelhante no momento da colheita apresentaram um perfil de expressão altamente diferencial após armazenamento refrigerado seguido de dois dias em temperatura ambiente. Estudos prévios já tem demonstrado a associação do GA₃ com metilação de DNA em plântulas de trigo *in vitro*, as quais demonstram que o GA₃ atua na indução da metilação do DNA, com um aumento na incorporação de CH₃ de 30-65%, quando comparado com as plântulas sem adição deste hormônio (VLASOVA et al., 1995).

Frutos controle armazenados a frio comparados com frutos controle no momento da colheita

Para verificar o efeito do frio no transcriptoma de pêssegos durante a maturação, comparou-se o perfil de expressão de frutos controle submetidos a armazenamento refrigerado seguido de dois dias em temperatura ambiente com frutos controle no momento da colheita. Neste caso, verificou-se a alteração na expressão de 947 genes. Dentre os genes inibidos destacam-se alguns genes codificadores de enzimas associadas ao metabolismo de lipídios. Lipídios são constituintes das membranas biológicas, e alteração no conteúdo e composição dos lipídios significa alteração na constituição das membranas das células (GUIMARÃES et al., 2011). O comprometimento das membranas celulares sob condições de estresse por frio é um processo bastante conhecido e estudado (ZHANG e TIAN, 2009; CAO et al., 2011). Genes codificadores de enzimas associadas ao metabolismo de aminoácidos e de metabólitos secundários também foram inibidos. Alterações no metabolismo de aminoácidos implicam na viabilidade das células, pois, além de serem vitais para síntese de proteínas, servem como precursores de um grande grupo de metabólitos com múltiplas funções na resposta a vários estresses, como metabólitos secundários e hormônios (LESS e GALILI, 2008).

Os genes induzidos em resposta ao frio pertencem a diversos processos celulares, dentre estes se destacam os metabolismos de aminoácidos, purinas, carboidratos, e biossíntese de flavonoides e aminoacil t-RNA. A indução de genes associados com purinas, aminoácidos e aminoacil t-RNA sugere que o frio induz a síntese de novas proteínas. Neste estudo, observou-se que houve a indução de genes associados ao metabolismo de flavonoides, possivelmente como mecanismo de defesa da célula contra o estresse ocasionado pelo frio. Resultados similares foram observados em laranjas (CRIFÒ et al., 2011) e em plantas de *Arabidopsis* (KREPS et al., 2002) submetidas a estresse por frio. Os genes associados ao metabolismo de carboidratos codificam enzimas de parede celular como pectato liase e poligalaturonase. Estes resultados já eram esperados, uma vez que inúmeros estudos relatam a alteração destas enzimas (induzidas ou inibidas) durante o amadurecimento de pêssegos que passaram por armazenamento a frio (BRUMMELL

et al., 2004; LURIE e CRISOSTO, 2005; GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; VIZOSO et al., 2009; PEGORARO et al., 2010).

Frutos tratados com GA₃ armazenados a frio comparados com frutos tratados com GA₃ no momento da colheita

Embora a aplicação de GA₃ tenha causado poucas alterações no perfil transcricional de pêssegos no momento da colheita, quando se compara frutos tratados com GA₃ após o armazenamento refrigerado seguido de dois em temperatura ambiente com a colheita de frutos tratados com GA₃ observa-se a alteração de 619 genes. Os genes inibidos estão associados a diferentes metabolismos, não sendo verificado nenhum metabolismo com grande número de genes inibidos.

Dentre os genes induzidos, destacam-se os genes associados aos metabolismos de lipídios, carboidratos e glicólise e gliconeogênese. A indução de genes associados ao metabolismo de lipídios já havia sido verificada no momento da colheita dos frutos, entretanto, a indução de genes associados ao metabolismo de carboidratos e glicólise e gliconeogênese ocorreu em função da interação frio x GA₃. Os genes associados ao metabolismo de carboidratos codificam dois grupos de enzimas importantes: as pertencentes ao metabolismo de parede celular, e as associadas à trealose. No metabolismo de parede celular, verificou-se que o GA₃ induz genes codificadores de enzimas pectato liase, pectina metil esterase, poligalacturoase, β-glicosidase e α-glicosidase. Uma das explicações mais frequentemente dada para a ocorrência da lanosidade em pêssegos e nectarinas é o desequilíbrio de atuação de enzimas atuantes na solubilização da parede celular (BEN-ARIE e SONEGO, 1980; ZHOU et al., 2000a, b, c; BRUMMELL et al., 2004; GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2008; VIZOSO et al., 2009; PEGORARO et al., 2010). Neste estudo, verifica-se que o GA₃ atua mantendo níveis elevados de transcritos dos genes codificadores deste conjunto de enzimas, sugerindo que este seja um dos mecanismos coordenados pelo GA₃ na prevenção da lanosidade, mas que só se manifestou diferentemente quando associado ao armazenamento a frio.

Ainda no metabolismo de carboidratos, dois genes induzidos (α - α -trealose fosfato sintase e trealose fosfatase) codificam enzimas que fazem parte da última etapa da síntese de trealose (VOGEL et al., 1998). A trealose (α -D-glucopyranosyl-[1,1]- α -D-glucopyranoside) é um açúcar não redutor, constituído por duas unidades de glicose. É amplamente distribuído na natureza, e atua com função de proteção contra estresses e serve como armazenamento de energia (EASTMOND et al., 2002). A incapacidade de detectar trealose em plantas sugere que a maioria das plantas superiores tenha perdido a capacidade de sintetizar este açúcar (CROWE et al., 1992), embora apresente a enzima trealase, capaz de degradar trealose (MÜLLER et al., 1995). Com a aplicação de um inibidor de trealase, plantas de tabaco e batata apresentaram níveis detectáveis de trealose (GODDIJN et al.; 1997), além disso, Müller et al. (1995) verificaram que *Myrothamnus flabellifolia* é capaz de acumular trealose. Dessa forma, sugere-se que GA₃ induz as enzimas da síntese de trealose, fazendo com esta se acumule nas células, exercendo um papel de proteção contra o estresse por frio. Evidentemente, para que esta hipótese seja comprovada, é necessário que se proceda a quantificação dos níveis de trealose nos tecidos dos frutos tratados com GA₃.

A indução de genes associados com glicólise e gliconeogênese indica uma aceleração na respiração celular, o que é normal durante o amadurecimento de frutos climatéricos como o pêssego.

Frutos tratados com GA₃ armazenados a frio (não lanosos) comparados com frutos controle armazenados a frio (lanosos)

Quando se comparou frutos sem lanosidade (GA₃-CS) com frutos lanosos (C-CS), observou-se a alteração de 2899 genes, sendo 60% destes inibidos e 40% induzidos em frutos não lanosos. Dentre os genes inibidos identificados destacam-se os genes associados aos metabolismos de lipídios, glioxilato e dicarboxilato, purinas, pirimidinas, carboidratos, biossíntese de aminoácil t-RNA, glicólise e gliconeogênese e fosforilação oxidativa.

Em frutos sem lanosidade, observa-se que alguns genes associados ao metabolismo de lipídios foram inibidos, principalmente glicerofosfolipídios, o que

pode ser consequência da disfunção das membranas celulares, evento primário do dano ocasionado pelo frio. Entretanto, um número consideravelmente maior de genes associados à este metabolismo foi induzido, sugerindo que frutos que não desenvolveram lanosidade apresentam alterações no conteúdo e composição dos lipídios. O funcionamento normal da membrana celular depende da sua fluidez, a qual é fortemente influenciada pela composição dos lipídios (SQUIER et al., 1988). Quando se compara a membrana celular de plantas resistentes ao frio com a membrana celular de plantas sensíveis, observa-se que nas plantas resistentes há maior quantidade de ácidos graxos insaturados, resultando em maior fluidez (SAKAMOTO e MURATA, 2002). Neste sentido, a indução de um grande número de genes associados com o metabolismo de lipídios pode ser responsável por manter a fluidez das membranas durante o armazenamento a 4°C, prevenindo danos na integridade das mesmas. Estes resultados podem ser associados aos dados obtidos por González-Agüero et al. (2008), que observaram a inibição de genes associados com tráfego endomembranas em frutos lanosos. A alteração no metabolismo de lipídios, especialmente esfingolipídios e glicerofosfolídeos, reforça a hipótese de que a lanosidade está associada com alterações na integridade e funcionalidade das membranas celulares assim como na sinalização celular. Esfingolipídios atuam como protetores físicos das células, através da formação de um mecanismo estável e quimicamente resistente da parte externa da bicamada lipídica da membrana plasmática, e além disso, esta molécula atua na sinalização celular. O efeito de proteção depende das propriedades físicas dos esfingolipídios e a função de sinalização envolve interações específicas dos esfingolipídios com lipídios similares de células próximas ou com proteínas (MEER e LISMAN, 2002). Glicerofosfolipídios proporcionam um ambiente adequado à membrana, fluidez e permeabilidade iônica (FAROOQUI, 2009).

Genes codificadores de enzimas de parede celular foram induzidos e reprimidos em frutos não lanosos. Nesta condição, tiveram expressão alterada 8 genes codificadores de poligacturonase (4 induzidos e 4 reprimidos), 5 genes codificadores de pectina metil esterase (4 induzidos e 1 reprimidos) e 3 genes codificadores de pectato liase (2 induzidos e 1 reprimido).

No metabolismo de carboidratos, além da indução de genes codificadores de enzimas associadas à parede celular, verifica-se novamente a presença dos genes codificadores das enzimas α - α -trealose fosfato sintase e trealose fosfatase, reforçando a hipótese de que o GA₃ induz a síntese de trealose, e este metabólito atua na proteção das células contra os danos ocasionados pelo frio, prevenindo o aparecimento de lanosidade.

Em frutos não lanosos observou-se também um grande número de genes induzidos associados ao metabolismo da galactose, um monossacarídeo, constituinte da parede celular. Dentre os genes induzidos pode-se destacar o codificador da enzima β -galactosidase, que atua na degradação de galactose, resultando no amolecimento dos frutos, processo normal durante o amadurecimento.

Um indicativo adicional de que a maturação ocorreu de modo mais adequado nos frutos não lanosos, foi a indução do gene *Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano sintase* nestes frutos.

8.5. Considerações finais

A prevenção da lanosidade em frutos tratados com GA₃ é um evento complexo, que envolve a ativação e repressão de genes pertencentes a vários mecanismos. Acredita-se que o GA₃ previne o aparecimento de lanosidade através da indução de genes associados ao metabolismo de lipídios, à degradação da parede celular e à síntese de trealose. Sugere-se que esta regulação se dê através de mudanças na conformação do DNA e por eventos de metilação.

8.6 Referências Bibliográficas

AMARANTE, C.V.T.D.; DREHMER, A.M.F.; SOUZA, F.D.; FRANCESCATTO, P. 2005. A pulverização pré-colheita com ácido giberélico (GA₃) e aminoetoxivinilglicina (AVG) retarda a maturação e reduz as perdas de frutos na cultura do pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 1-5. 2005.

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; BRON, I.U.; MACHADO, S.R. Lanosidade em cultivares de pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch): estudos anatômicos e ultra-estruturais. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 27, p. 55-61. 2004.
- BEN-ARIE, R.; SONEGO, L. Pectolytic enzyme activity involved in woolly breakdown of stored peaches. **Phytochemistry**. v. 19, p. 2553-2555. 1980.
- BRUMMELL, D. A., CIN, V. D., LURIE, S., CRISOSTO, C. H., LABAVITCH, J. M. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, p. 2041-2052. 2004.
- CAO, S.; YANG, Z.; CAI, Y.; ZHENG, Y. Fatty acid composition and antioxidant system in relation to susceptibility of loquat fruit to chilling injury. **Food Chemistry**. v. 127, p. 1777-1783. 2011.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 11, p. 113-116, 1993.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**. v. 21, p. 3674-3676. 2005.
- CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**. v. 54, p. 579-599. 1992.
- CRIFÒ, T.; PUGLISI, I.; PETRONE, G.; RECUPERO, G.R.; LO PIERO, A.R. Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: Implication of the flavonoid biosynthetic pathway. **Gene**. v. 476, p. 1-9. 2011.
- DUNN, T.M.; LYNCH, D.V.; MICHAELSON, L.V.; NAPIER, J.A. A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**. v. 93, p. 483-497. 2004.
- EASTMOND, P.J.; LI, Y.; GRAHAM, I.A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? **Journal of Experimental Botany**, v. 54, pp. 533-537. 2003.
- FAROOQUI, A.A. Glycerophospholipids. eLS. The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA. 2009.
- GIRARDI, C. L.; CORRENT, A. R.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M. R.; COSTA, T. S. D.; BRACKMANN, A.; TWYMAN, R.M., NORA, F.R.; NORA, L.; SILVA, J. A.;

- ROMBALDI, C. V. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 38, p. 25-33. 2005.
- GODDIJN, O.J.M.; VERWOERD, T.C.; VOOGD, E.; KRUTWAGEN, R.W.; DE GRAAF, P.T.; VAN DUN, K.; POELS, J.; PONSTEIN, A.S.; DAMM, B.; PEN, J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. **Plant Physiology**. v. 113, p. 181-190. 1997.
- GONZÁLEZ-AGÜERO, M.; PAVEZ, L.; IBÁÑEZ, F.; PACHECO, I.; CAMPOS-VARGAS, R.; MEISEL, L. A.; ORELLANA, A.; RETAMALES, J.; SILVA, H.; GONZÁLEZ, M.; CAMBIAZO, V. Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 1973-1986. 2008.
- GUIMARÃES, F.V. A.; LACERDA, C.F.; MARQUES, E.C.; MIRANDA, M.R.A.; ABREU, C.E.B.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Calcium can moderate changes on membrane structure and lipid composition in cowpea plants under salt stress. **Plant Growth Regulation**. v. 65, p. 55-63. 2011.
- HANNUM, Y.A.; LUBERTO, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. **Trends in Cell Biology**. v. 10, p. 73-80. 2000.
- JIN, P.; WANG, K.; SHANG, H.; TONG, J.; ZHENG, Y. Low-temperature conditioning combined with methyl jasmonate treatment reduces chilling injury of peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 89, p. 1690-1696. 2009a.
- JIN, P.; ZHENG, Y.; TANG, S.; RUI, H.; WANG, C.Y. A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 52, p. 24-29. 2009b.
- JU, Z.G.; DUAN, Y.S.; JU, Z.Q. Combinations of GA₃ and AVG delay fruit maturation, increase fruit size and improve storage life of 'Feicheng' peaches. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. v. 74, p. 579-583. 1999.
- KIHARA, A.; IGARASHI, Y. Cross Talk between Sphingolipids and Glycerophospholipids in the Establishment of Plasma Membrane Asymmetry. **Molecular Biology of the Cell**. v.15, p. 4949-4959. 2004.

- KREPS, J.A.; WU, Y.; CHANG, H.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J.F. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**. v. 130, p. 2129-2141. 2002.
- LESS, H.; GALILI, G. Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. **Plant Physiology**. v. 147, p. 316-330. 2008.
- LURIE, S.; CRISOSTO, C.H. Chilling injury in peach and nectarine. **Postharvest Biology and Technology**. v. 37, p. 195-208. 2005.
- LURIE, S.; VANOLI, M.; DAGAR, A.; WEKSLER, A.; LOVATI, F.; ECCHER ZERBINI, P.; SPINELLI, L.; TORRICELLI, A.; FENG, J.; RIZZOLO, A. Chilling injury in stored nectarines and its detection by time-resolved reflectance spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**. v. 59, p. 211-218, 2011.
- MARTINEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M.; BURLO, F.; CARBONELL, A.; BURGOS, L.; RIQUELME, F. Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (*Prunus persica* L.) storability improvement. **Journal of Food Science**. v. 65, p. 288-294. 2000.
- MATEOS, A.; HERRERO, J.; TAMAMES, J.; DOPAZO, J. Supervised neural networks for clustering conditions in DNA array data after reducing noise by clustering gene expression profiles. In Lin, S. and Johnson, K. (eds), **Methods of Microarray Data Analysis II**. Kluwer Academic Publishers, Boston. p. 91-103. 2002.
- MEER, G.V.; LISMAN, Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 25855–25858. 2002.
- MÜLLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science**. v. 112, p. 1-9. 1995.
- NILO, R., SAFFIE, C., LILLEY, K., BAEZA-YATES, R., CAMBIAZO, V., CAMPOS-VARGAS, R.; GONZÁLEZ, M.; MEISEL, L.A.; RETAMALES, J.; SILVA, H.; ORELLANA, A. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). **BMC Genomics**. v. 11, p. 43. 2010.
- OGUNDIWIN, E.A.; MARTÍ, C.; FORMENT, J.; PONS, C.; GRANELL, A.; GRADZIEL, T.M.; PEACE, C.P.; CRISOSTO, C.H. Development of ChillPeach

genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach fruit. **Plant Molecular Biology**. v. 68, p. 379-397. 2008.

OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. 2007.

PEGORARO, C.; ZANUZO M.R.; CHAVES, F.C.; BRACKMANN, A.; GIRARDI, C.L.; LUCCHETTA, L.; NORA, L.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C.V. Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. **Postharvest Biology and Technology**. v. 57, p. 19-26. 2010.

PEGORARO, C.; CHAVES, F.C.; DAL CERO, J.; GIRARDI, C.L.; ROMBALDI, C.V. Effects of pre-harvest gibberellic acid spraying on gene transcript accumulation during peach fruit development. **Plant Growth Regulation**. v. 65, p. 231-237. 2011.

PRINSI, B., NEGRI, A.S., FEDELI, C., MORGUTTI, S., NEGRINI, N., COCUCCHI, M., ESPEN, L. Peach fruit ripening: A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages. **Phytochemistry**. v. 72, p. 1251-62. 2011.

SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, p. 374-378. 2003.

SASAKI, F.F.; CERQUEIRA, T.S.; SESTARI, I.; DEL AGUILA J.S.; KLUGE, R.A. Woolliness control and pectin solubilization of 'Douradão' peach after heat shock treatment. **Acta Horticulturae**. v. 877, p. 539-543. 2010.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**. 7:3, 2006.

SEVERO, J.; TIECHER, A.; CHAVES, F.C.; SILVA, J.A. ROMBALDI, C.V. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during

- developmental stages of strawberry cv. Camarosa. **Food Chemistry**. v. 126, p. 995-1000. 2011.
- SUN, J.-H.; CHEN, J.-Y.; KUANG, J.-F.; CHEN, W.-X.; LU, W.-J. Expression of *sHSP* genes as affected by heat shock and cold acclimation in relation to chilling tolerance in plum fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 55, p. 91-96. 2010.
- TITTARELLI, A., SANTIAGO, M., MORALES, A., MEISEL, L.A., SILVA, H. Isolation and functional characterization of cold-regulated promoters, by digitally identifying peach fruit cold-induced genes from a large EST dataset. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 121. 2009.
- TRAINOTTI, L.; ZANIN, D.; CASADORO, G. A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p.1821-1832. 2003.
- TRAINOTTI, L.; BONGHI, C.; ZILIOFFO F.; ZANIN, D.; RASORI, A.; CASADORO, G.; RAMINA, A.; TONUTTI, P. The use of microarray μ PEACH1.0 to investigate transcriptome changes during transition from pre-climacteric to climacteric phase in peach fruit. **Plant Science** v. 170, p. 606-613. 2006.
- TUSHER, V.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 98, p. 5116-5121. 2001.
- THE GO CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) project in 2006. **Nucleic Acids Research**. v. 34, p. 322-326. 2006.
- VITTI, D.C.C.; KLUGE, R.A.; JACOMINO, A.P. LIMA, G.P.P. Tratamento térmico para controle da lanosidade em pêssegos 'Dourado-2' refrigerados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, 2007.
- VIZOSO, P.; MEISEL, L.A.; TITTARELLI, A.; LATORRE, M.; SABA, J.; CAROCA, R.; MALDONADO, J.; CAMBIAZO, V.; CAMPOS-VARGAS, R.; GONZALEZ, M.; ORELLANA, A.; SILVA, H. Comparative EST transcript profiling of peach fruits under different post-harvest conditions reveals candidate genes associated with peach fruit quality. **BMC Genomics**. v. 10, p. 423. 2009.
- VLASOVA, T.I.; DEMIDENKO, Z.N.; KIRNOS, M.D.; VANYUSHIN, B.F. *In vitro* DNA methylation by wheat nuclear cytosine DNA methyltransferase: effect of phytohormones. **Gene**. v. 157, p. 279-281. 1995.

- VOGEL, G.; AESCHBACHER, R.A.; MÜLLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. **The Plant Journal**. v. 13, p. 673-683. 1998.
- WANG, L.; CHENA, S.; KONG, W.; LI, S.; ARCHBOLD, D.D. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 41, p. 244-251. 2006.
- WORRALL, D.; NG, C.K.Y.; HETHERINGTON, A.M. Sphingolipids, new players in plant signaling. **TRENDS in Plant Science**. v. 8, p. 317-320. 2003.
- ZILKAH, S.; LURIE, S.; LAPSKER, Z.; ZUTHI, Y.; DAVID, I.; YESSELSON, Y.; ANTMAN, S.; BEN ARIE, R. The ripening and storage quality of nectarine fruits in response to preharvest application of gibberellic acid. **The Journal of Horticultural Science**. v. 72, p. 355-362. 1997.
- ZHOU, H.W.; BEN-ARIE, R.; LURIE, S. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. **Phytochemistry**. v. 55, p. 191-195. 2000a.
- ZHOU, H.W.; LURIE, S.; LERS, A.; KHATCHITSKI, A.; SONEGO, L.; BEN-ARIE, R. Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. **Postharvest Biology and Technology**. v. 18, p. 133-141. 2000b.
- ZHOU, H.W.; SONEGO, L.; KHALCHITSKI, A.; BEN-ARIE, R.; LERS, A.; LURIE S. Cell wall enzymes and cell wall changes in 'Flavortop' nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectic and neutral polymers during ripening and in woolly fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v. 125, p. 630-637. 2000c.
- ZHANG, C.; TIAN S. Crucial contribution of membrane lipids' unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0°C. **Food Chemistry**. v. 115, p. 405-411. 2009.

9 CAPÍTULO VIII

Conclusões gerais

Um estresse é o estímulo ou influência que está fora do controle homeostático de uma célula ou organismo. A tolerância se dá pela ativação de mecanismos moleculares, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, fazendo com que a homeostase celular seja re-estabelecida. O estudo do transcriptoma é o passo inicial para a identificação de fatores chaves nas redes de sinalização em resposta a estresses bióticos e abióticos.

Neste trabalho, a partir de estudos de expressão gênica, em diferentes espécies, submetidas a diferentes condições ambientais, verificou-se que:

- Em plantas de arroz, membros da família gênica *ERF* apresentam regulação particular, onde alguns membros apresentam regulação simples, enquanto que outros apresentam regulação complexa. Os genes *ERFs* são responsivos a diferentes condições de estresse, apresentando expressão específica ou comum sob a mesma condição, revelando a diversidade funcional existente dentro da família *ERF*.

- Em arroz, genes codificadores de proteínas pertencentes aos complexos TIM/TOM e TIC/TOC foram inibidos pelo estresse por falta de oxigênio, sugerindo uma interrupção no transporte das proteínas codificadas pelo núcleo para os cloroplastos e mitocôndrias.

- Sob condições de anoxia, proteínas HSPs têm um papel importante na resposta ao estresse, entretanto não estão diretamente envolvidas na tolerância do arroz a baixos níveis de oxigênio.

- Em tomate, o estresse por hipoxia causou a indução de dois genes *sHSP*, um com localização prevista em cloroplasto e outro em mitocôndria.

- Em pêssegos, a aplicação de GA_3 previne o aparecimento de distúrbios fisiológicos através da indução de genes associados ao metabolismo de lipídios, à degradação da parede celular e à síntese de trealose.

As informações obtidas neste estudo de expressão gênica auxiliam no entendimento da resposta das plantas às condições de estresses. Entretanto,

estudos de genômica, proteômica e metabolômica são necessários para esclarecer os processos celulares relacionados com a tolerância a estresses bióticos e abióticos. É necessário ainda, o entendimento de como os genes, proteínas e metabólitos trabalham em conjunto para o funcionamento das células.

10.0 ANEXOS

ANEXO 1

Enzimas codificadas por genes reprimidos na condição experimental C-GA₃ (Colheita de frutos tratados comparados com a colheita de frutos controle).

Enzima	Metabolismo	Sequências
Succinate-semialdehyde dehydrogenase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa004155m
Linoleate 13S-lipoxygenase	Alpha-Linolenic acid metabolism	ppa001016m
Fructokinase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa004715m, ppa004431m
Monodehydroascorbate reductase	Ascorbate and aldarate metabolism	ppa005968m
Adenosylhomocysteinase	Cysteine and methionine metabolism	ppa004934m
Glucokinase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004715m
Adenylyl-sulfate reductase	Sulfur metabolism	ppa005352m
Phosphoglycerate mutase	Sulfur metabolism	ppa004214m
Carbonate dehydratase	Sulfur metabolism	ppa009928m
Phosphoserine phosphatase	Methane metabolism	ppa009310m
Cytokinin dehydrogenase	Zeatin biosynthesis	ppa004276m
Alcohol dehydrogenase		ppa007137m

ANEXO 2

Enzimas codificadas por genes induzidos na condição experimental C-GA₃ (Colheita de frutos tratados comparados com a colheita de frutos controle).

Enzimas	Metabolismo	Sequências
Long-chain-fatty-acyl-CoA reductase	Cutin, suberine and wax biosynthesis	ppa024183m
Homocysteine S-methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism	ppa008421m
Carboxylesterase	Drug metabolism	ppa010005m
2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa009408m
Phosphogluconate dehydrogenase	Glutathione metabolism	ppa009408m
Triacylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	ppa016063m
Diacylglycerol kinase	Glycerophospholipid metabolism	ppa004781m
Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa009795m
Adenosine triphosphatase	Purine metabolism	ppa000530m
Guanylate cyclase	Purine metabolism	ppa011194m
Ceramide kinase	Sphingolipid metabolism	ppa004781m
Pectinesterase	Starch and sucrose metabolism	ppa016574m
7-dehydrocholesterol reductase	Steroid biosynthesis	ppa013180m
3-hydroxybutyrate dehydrogenase	Synthesis and degradation of ketone bodies	ppa009408m
Non-specific protein-tyrosine kinase	Signal transduction of kinase	ppa000659m

ANEXO 3

Enzimas codificadas por genes reprimidos na comparação dos tratamentos C_C-CS (Frutos controle armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com a colheita de frutos controle).

Enzimas	Metabolismo	Sequências
Alanine transaminase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa002642m
Linoleate 13S-lipoxygenase	Alpha-Linolenic acid metabolism	ppa001634m
Chitinase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa013010m
Fructose-bisphosphatase	Carbon fixation in photosynthetic organisms	ppa008222m
Carboxymethylenebutenolidase	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	ppa009589m
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Cysteine and methionine metabolism	ppa007180m
Gibberellin 3beta-dioxygenase	Diterpenoids biosynthesis	ppa019644m
Dihydrokaempferol 4-reductase	Flavonoids biosynthesis	ppa008673m
Alpha-mannosidase	Glycan degradation	ppa003534m
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	Geraniol degradation	ppa006068m
Phosphoglycerate mutase	Glycolysis and gluconeogenesis	ppa004214m
Aldose 1-epimerase	Glycolysis and gluconeogenesis	ppa009111m
Gamma-glutamyltransferase	Glutathione metabolism	ppa002642m
Glycerol kinase	Glycerolipid metabolism	ppa004097m
Glycine transaminase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa002642m
Reticuline oxidase	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ppa004127m
S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	Methane metabolism	ppa019020m, ppa006426m
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	N-glycan biosynthesis	ppa003534m
Dihydropyrimidinase	Pantothenate and CoA biosynthesis	ppa003789m
Cinnamoyl-CoA reductase	Phenylpropanoid biosynthesis	ppa008673m
magnesium protoporphyrin IX methyltransferase	Porphyrins and chlorophylls metabolism	ppa008655m
Lactoylglutathione lyase	Pyruvate metabolism	ppa009462m, ppa015560m
Acid phosphatase	Riboflavin metabolism	ppa005973m
Non-specific protein-tyrosine kinase	Signal transduction of kinase	ppa019902m, ppa008918m
Cycloartenol synthase	Steroid biosynthesis	ppa001806m
Cysteine synthase	Sulfur metabolism	ppa008600m
Alcohol dehydrogenase		ppa019020m, ppa007137m

ANEXO 4

Enzimas codificadas por genes induzidos na codição experimental C_C-CS (Frutos controle armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com a colheita de frutos controle).

Enzima	Metabolismo	Sequências
Amidophosphoribosyltransferase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa003335m
Chitinase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa008859m
Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa002758m
Aspartate-tRNA ligase	Aminoacyl-t-RNA biosynthesis	ppa003076m
Phenylalanine-tRNA ligase	Aminoacyl-t-RNA biosynthesis	ppa003276m
Proline-tRNA ligase	Aminoacyl-t-RNA biosynthesis	ppa016283m
Aspartate transaminase	Carbon fixation in photosynthetic organisms	ppa006743m, ppa005426m
Fructose-bisphosphate aldolase	Carbon fixation in photosynthetic organisms	ppa007714m
Triose-phosphate isomerase	Carbon fixation in photosynthetic organisms	ppa022148m, ppa010312m
Isopenicillin-N epimerase	Cephalosporin biosynthesis	ppa004689m
Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Cysteine and methionine metabolism	ppa007135m
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism	ppa022377m
Carboxylesterase	Drug metabolism	ppa010240m
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Drug metabolism	ppa012004m
Dodecenoyl-CoA isomerase	Fatty acid metabolism	ppa010715m
Naringenin-chalcone synthase	Flavonoids biosynthesis	ppa006899m
Flavonoid 3',5'-hydroxylase	Flavonoids biosynthesis	ppa019068m, ppa014572m, ppa004664m
Flavonol synthase	Flavonoids biosynthesis	ppa008322m
5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	Glutathione metabolism	ppa000342m
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Glutathione metabolism	ppa002276m
Formyltetrahydrofolate deformylase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa009232m
Polyneuridine-aldehyde esterase	Indole alkaloid biosynthesis	ppa007173m
Enoyl-CoA hydratase	Limonene and pinene degradation	ppa006533m
Dihydrodipicolinate synthase	Lysine biosynthesis	ppa007510m
LL-diaminopimelate aminotransferase	Lysine biosynthesis	ppa006743m, ppa005426m
Histone-lysine N-methyltransferase	Lysine degradation	ppa002266m
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase	N-glycan biosynthesis	ppa004628m
Carbonate dehydratase	Nitrogen metabolism	ppa009928m
Cytochrome-c oxidase	Oxidative phosphorylation	ppa014546m
Ubiquinol-cytochrome-c reductase	Oxidative phosphorylation	ppa014373m

6-phosphogluconolactonase	Pentose pathway	ppa010073m
Amidase	Phenylalanine metabolism	ppa003231m
Peroxidase	Phenylpropanoid biosynthesis	ppa023689m
Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	Phenylpropanoid biosynthesis	ppa024217m
Adenosinetriphosphatase	Purine metabolism	ppa004704m
Adenylate kinase	Purine metabolism	ppa019039m, ppa010508m
Nucleoside-triphosphate-adenylate kinase	Purine metabolism	ppa010508m
Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	Purine metabolism	ppa006291m
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Purine metabolism	ppa000246m
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	Purine metabolism	ppa009232m
DNA-directed DNA polymerase	Pyrimidine metabolism	ppa000454m, ppa013345m, ppa000330m
Lactoylglutathione lyase	Pyruvate metabolism	ppa012380m
Acid phosphatase	Riboflavin metabolism	ppa005956m
Non-specific protein-tyrosine kinase	Signal transduction kinase	ppa017920m
Pectate lyase	Starch and sucrose metabolism	ppa007270m
Polygalacturonase	Starch and sucrose metabolism	ppa025098m, ppa007271m
Fructokinase	Starch and sucrose metabolism	ppa003690m, ppa004931m
Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase	Starch and sucrose metabolism	ppa025098m
Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa010634m
Adenylyl-sulfate reductase	Sulfur metabolism	ppa007707m
Phosphomevalonate kinase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa004466m
Phosphoprotein phosphatase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa008241m
Nucleoside-triphosphatase	Thiamine metabolism	ppa000454m, ppa010452m, ppa005005m
Unspecific monooxygenase	Tryptophan metabolism	ppa004449m
4-coumarate-CoA ligase	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	ppa017093m
O-succinylbenzoate-CoA ligase	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	ppa005794m
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	Valine, leucine and isoleucine degradation	ppa006533m
tRNA dimethylallyltransferase	Zeatin biosynthesis	ppa005482m

ANEXO 5

Enzimas codificadas por genes reprimidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS (Frutos tratados com GA₃ armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com a colheita de frutos tratados com GA₃).

Enzima	Metabolismo	Sequências
Glutamate decarboxylase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa004567m
Linoleate 13S-lipoxygenase	Alpha-Linolenic acid metabolism	ppa001631m
UDP-arabinose 4-epimerase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa006315m
Procollagen-proline dioxygenase	Arginine and proline metabolism	ppa023428m
isopenicillin-N epimerase	Cephalosporin biosynthesis	ppa005612m
UDP-glucose 4-epimerase	Galactose metabolism	ppa006315m
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	Geraniol degradation	ppa006068m
H ⁺ -exporting ATPase	Oxidative phosphorylation	ppa021822m, ppa000937m
Pantothenate kinase	Pantothenate and CoA biosynthesis	ppa005996m
Choline-phosphate cytidyltransferase	Phosphonate and phosphinate metabolism	ppa009646m
RNA-directed RNA polymerase	Purine metabolism	ppa000422m
alpha-galactosidase	Sphingolipid metabolism	ppa006179m, ppa005977m
Phosphoprotein phosphatase	Signal transduction of kinase	ppa008194m
Non-specific protein-tyrosine kinase	Signal transduction of kinase	ppa002429m
Pectinesterase	Starch and sucrose metabolism	ppa011607m
Cysteine synthase	Sulfur metabolism	ppa007292m
Nucleoside-triphosphatase	Thiamine metabolism	ppa007842m, ppa007788m
alcohol dehydrogenase		ppa008957m

ANEXO 6

Enzimas codificadas por genes induzidos na condição experimental GA₃_GA₃-CS Frutos tratados com GA₃ armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com a colheita de frutos tratados com GA₃).

Enzima	Metabolismo	Sequências
Aspartate carbamoyltransferase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa006647m
Glutamate-ammonia ligase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa007772m
Linoleate 13S-lipoxygenase	Alpha-Linolenic acid metabolism	ppa001016m, ppa001311m
Cytochrome-b5 reductase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa009801m
Threonine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa002440m
Vanillate monooxygenase	Aminobenzoate degradation	ppa003695m
Acetylglutamate kinase	Arginine and proline metabolism	ppa008517m

(+)-abscisic acid 8'-hydroxylase	Carotenoid biosynthesis	ppa005020m
Carboxymethylenebutenolidase	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	ppa010646m
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	Citrate cycle TCA cycle	ppa005320m
Carboxylesterase	Drug metabolism	ppa019167m, ppa005102m, ppa024437m, ppa008273m, ppa018291m
Phosphatidate phosphatase	Ether lipid metabolism	ppa007663m
3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	Fatty acid biosynthesis	ppa012082m
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Fatty acid metabolism	ppa009256m
Enoyl-CoA hydratase	Fatty acid metabolism	ppa006573m
Flavonoid 3',5'-hydroxylase	Flavone and flavonol biosynthesis	ppa004664m, ppa014572m
Dihydrokaempferol 4-reductase	Flavonoid biosynthesis	ppa017116m
Diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	Fructose and mannose metabolism	ppa003635m, ppa002571m
UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase	Galactose metabolism	ppa008036m
5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	Glutathione metabolism	ppa000342m
Glutathione peroxidase	Glutathione metabolism	ppa010584m
Glutathione transferase	Glutathione metabolism	ppa009087m
Alpha-mannosidase	Glycan degradation	ppa000717m
Acylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	ppa006906m
Triacylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	ppa001457m, ppa003930m
UDP-sulfoquinovose synthase	Glycerolipid metabolism	ppa005001m
Phosphoserine phosphatase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa009310m
Phosphoserine transaminase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa006013m
6-phosphofructokinase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa003635m, ppa002571m
Dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004441m
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa006087m
Phosphoglycerate mutase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004214m, ppa004729m
Phosphopyruvate hydratase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004863m
Pyruvate kinase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa003316m, ppa004145m
Triose-phosphate isomerase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa022148m, ppa010312m
Galactosylxylosylprotein 3-beta-galactosyltransferase	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	ppa002606m
Formyltetrahydrofolate deformylase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa009232m
Deacetoxyvindoline 4-hydroxylase	Indole alkaloid biosynthesis	ppa022015m, ppa007487m,

		ppa027196m
Phosphoinositide phospholipase C	Inositol phosphate metabolism	ppa007132m
Primary-amine oxidase	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ppa005584m
Delta12-fatty acid dehydrogenase	Linoleic acid metabolism	ppa005574m
Lipoyl synthase	Lipoic acid metabolism	ppa007502m
Aspartate kinase	Lysine biosynthesis	ppa000606m
Diaminopimelate decarboxylase	Lysine biosynthesis	ppa004857m
Homoserine dehydrogenase	Lysine biosynthesis	ppa000606m
Cytochrome-c oxidase	Oxidative phosphorylation	ppa005658m
NADH:ubiquinone reductase (H ⁺ -transLOCating)	Oxidative phosphorylation	ppa012740m
Ubiquinol-cytochrome-c reductase	Oxidative phosphorylation	ppa014373m
Pantetheine-phosphate adenylyltransferase	Pantothenate and CoA biosynthesis	ppa012315m
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	ppa015545m
D-amino-acid dehydrogenase	Phenylalanine metabolism	ppa007360m
Tryptophan synthase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa005257m
porphobilinogen synthase	Porphyrin and chlorophyll metabolism	ppa006215m
Protochlorophyllide reductase	Porphyrin and chlorophyll metabolism	ppa007847m, ppa008452m, ppa019738m, ppa008709m
1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	Propanoate metabolism	ppa019738m
Adenosinetriphosphatase	Purine metabolism	ppa001430m, ppa005791m, ppa001470m, ppa001101m
Adenylate kinase	Purine metabolism	ppa010585m
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	Purine metabolism	ppa009232m
DNA-directed DNA polymerase	Pyrimidine metabolism	ppa000878m, ppa021601m
DNA-directed RNA polymerase	Pyrimidine metabolism	ppa002270m, ppa012315m
Uracil phosphoribosyltransferase	Pyrimidine metabolism	ppa005201m
Acid phosphatase	Riboflavin metabolism	ppa007663m, ppa010275m, ppa021353m
Selenocysteine lyase	Selenocompound metabolism	ppa005298m
Mitogen-activated protein kinase	Signal transduction of kinase	ppa004489m
Non-specific protein-tyrosine kinase	Signal transduction of kinase	ppa006060m, ppa000872m, ppa017603m
Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa001305m
Fructokinase	Starch and sucrose metabolism	ppa003690m, ppa004931m
Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa005641m

Phosphorylase	Starch and sucrose metabolism	ppa000958m
Trehalose-phosphatase	Starch and sucrose metabolism	ppa007021m, ppa001305m
Pectate lyase	Starch and sucrose metabolism	ppa022128m
Pectinesterase	Starch and sucrose metabolism	ppa004300m, ppa017649m
Polygalacturonase	Starch and sucrose metabolism	ppa005310m, ppa002440m
1,3-beta-glucan synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa000121m, ppa000112m
Alpha-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa004287m
Beta-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa026252m
Adenylyl-sulfate reductase	Sulfur metabolism	ppa005352m
Serine O-acetyltransferase	Sulfur metabolism	ppa009552m
Dimethylallyltranstransferase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa017682m
Cysteine desulfurase	Thiamine metabolism	ppa005298m
Nucleoside-triphosphatase	Thiamine metabolism	ppa011922m, ppa019981m
3-isopropylmalate dehydrogenase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	ppa006579m
Branched-chain-amino-acid transaminase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	ppa006309m
Pyridoxine 4-dehydrogenase	Vitamin B6 metabolism	ppa007985m
Cytokinin dehydrogenase	Zeatin biosynthesis	ppa004276m
Alcohol dehydrogenase		ppa017116m
D-cysteine desulfhydrase		ppa019738m
Phosphoglycerate dehydrogenase		ppa007293m

ANEXO 7

Enzimas codificadas por genes reprimidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (Frutos tratados com GA₃ armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente).

Enzime	Metabolismo	Sequências
Adenylosuccinate lyase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa003401m
Adenylosuccinate synthase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa004750m
Argininosuccinate synthase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa004728m
Asparagine synthase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa004038m
Aspartate carbamoyltransferase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa006647m
Glutamate-ammonia ligase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa001481m
Jasmonate O-methyltransferase	alpha-Linolenic acid metabolism	ppa012364m
Alpha-N-arabinofuranosidase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa002372m

Chitinase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa008859m
Cytochrome-b5 reductase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa008641m
Asparagine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa003076m
Glutamate-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa001925m
Glycine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa001964m
Histidine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa003021m
Isoleucine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa000564m
Leucine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa000578m
Lysine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa003157m
Phenylalanine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa004882m
Proline-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa016283m
Threonine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa002055m
Tryptophan-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa025950m
Valine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa026682m
Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	Anthocyanin biosynthesis	ppa020867m
Leukotriene-A4 hydrolase	Arachidonic acid metabolism	ppa003396m
Agmatine deiminase	Arginine and proline metabolism	ppa007104m
Aminoacylase	Arginine and proline metabolism	ppa005858m
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	Arginine and proline metabolism	ppa011829m
Ornithine carbamoyltransferase	Arginine and proline metabolism	ppa007159m
Procollagen-proline dioxygenase	Arginine and proline metabolism	ppa009459m, ppa009336m
L-ascorbate peroxidase	Ascorbate and aldarate metabolism	ppa006270m, ppa009538m
Monodehydroascorbate reductase (NADH)	Ascorbate and aldarate metabolism	ppa005003m
Transketolase	Ansamycins biosynthesis	ppa001865m
Acetoacetyl-CoA reductase	Butanoate metabolism	ppa008746m
Acetolactate synthase	C5-Branched dibasic acid metabolism	ppa005063m
ATP citrate synthase	Carbon fixation pathways in prokaryotes	ppa003053m
2-hydroxy-1,4-benzoquinone reductase	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	ppa011617m
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	Citrate cycle TCA cycle	ppa025496m, ppa004007m
Isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)	Citrate cycle TCA cycle	ppa007185m
3-cyanoalanine hydratase	Cyanoamino acid metabolism	ppa024268m
Amidase	Cyanoamino acid metabolism	ppa003071m, ppa003231m
Glycine hydroxymethyltransferase	Cyanoamino acid metabolism	ppa004090m
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism	ppa000190m, ppa019831m
Gibberellin 3beta-dioxygenase	Diterpenoid biosynthesis	ppa008125m

Carboxylesterase	Drug metabolism	ppa016730m, ppa017417m, ppa007411m, ppa011789m
Diacylglycerol cholinephosphotransferase	Ether lipid metabolism	ppa023261m
3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier- protein] dehydratase	Fatty acid biosynthesis	ppa010832m
Fatty-acyl-CoA synthase	Fatty acid biosynthesis	ppa003893m
Aldehyde dehydrogenase (NAD+)	Fatty acid metabolism	ppa002252m
Dodecenoyl-CoA isomerase	Fatty acid metabolism	ppa010715m, ppa010700m
Enoyl-CoA hydratase	Fatty acid metabolism	ppa006533m
Unspecific monooxygenase	Fatty acid metabolism	ppa004449m
Chalcone isomerase	Flavonoid biosynthesis	ppa011476m, ppa009406m
Leucocyanidin oxygenase	Flavonoid biosynthesis	ppa007738m
Naringenin-chalcone synthase	Flavonoid biosynthesis	ppa006899m, ppa008402m
Muconate cycloisomerase	Fluorobenzoate degradation	ppa006194m
GTP cyclohydrolase I	Folate biosynthesis	ppa005313m
Diphosphate-fructose-6-phosphate 1- phosphotransferase	Fructose and mannose metabolism	ppa002571m
GDP-L-fucose synthase	Fructose and mannose metabolism	ppa008630m
Glutathione transferase	Glutathione metabolism	ppa011307m
Peroxiredoxin	Glutathione metabolism	ppa011667m
Galactolipase	Glycerolipid metabolism	ppa000303m
CDP-diacylglycerol-glycerol-3- phosphate 3-phosphatidyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa007257m
Choline-phosphate cytidyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa009646m
Phosphatidylcholine-sterol O- acyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa005653m
Phosphatidyl-N-methylethanolamine N-methyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa012562m
Phosphoethanolamine N- methyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa005983m
Guanidinoacetate N-methyltransferase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa008553m
6-phosphofructokinase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004086m, ppa002571m
Alcohol dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa010022m
Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+]	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa002252m
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004007m
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa006087m
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa001237m
Pyruvate dehydrogenase (acetyl- transferring)	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa006652m, ppa007259m

Glucuronyl-galactosyl-proteoglycan 4-alpha-N-acetylglucosaminyltransferase	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	ppa008488m
Alpha-N-acetylglucosaminidase	Glycosaminoglycan degradation	ppa001555m
Beta-N-acetylhexosaminidase	Glycosaminoglycan degradation	ppa002753m
Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase	Glycosylphosphatidylinositol GPI - anchor biosynthesis	ppa012117m
Citrate (Si)-synthase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa005193m
Formylmethionine deformylase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa009947m, ppa023556m
Isocitrate lyase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa003428m
Malate dehydrogenase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa008270m, ppa006378m
Oxalate oxidase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa008630m
Primary-amine oxidase	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ppa011021m, ppa005584m
Delta12-fatty acid dehydrogenase	Linoleic acid metabolism	ppa007057m
Aspartate kinase	Lysine biosynthesis	ppa003561m
Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Lysine biosynthesis	ppa007135m
Dihydrodipicolinate reductase	Lysine biosynthesis	ppa010095m
Dihydrodipicolinate synthase	Lysine biosynthesis	ppa007510m
LL-diaminopimelate aminotransferase	Lysine biosynthesis	ppa005426m, ppa006743m
Procollagen-lysine 5-dioxygenase	Lysine degradation	ppa006976m
Glucan 1,3-alpha-glucosidase	N-Glycan biosynthesis	ppa001032m
Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	N-Glycan biosynthesis	ppa006984m
Nicotinate phosphoribosyltransferase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	ppa003633m
Carbonate dehydratase	Nitrogen metabolism	ppa010328m, ppa010344m, ppa000670m
Nitrate reductase (NADH)	Nitrogen metabolism	ppa025894m
Cytochrome-c oxidase	Oxidative phosphorylation	ppa014546m, ppa022392m, ppa012107m, ppa011101m, ppa013816m
H ⁺ -exporting ATPase	Oxidative phosphorylation	ppa000934m
Inorganic diphosphatase	Oxidative phosphorylation	ppa011444m
NADH dehydrogenase	Oxidative phosphorylation	ppa013287m, ppa013032m
NADH:ubiquinone reductase (H ⁺ -transLOCating)	Oxidative phosphorylation	ppa013741m, ppa012419m, ppa003286m, ppa003771m, ppa012763m, ppa009098m, ppa010853m

Ubiquinol-cytochrome-c reductase	Oxidative phosphorylation	ppa014374m
Pantothenate kinase	Pantothenate and CoA biosynthesis	ppa007505m
Phosphopantothenate-cysteine ligase	Pantothenate and CoA biosynthesis	ppa026217m
6-phosphogluconolactonase	Pentose phosphate pathway	ppa010073m
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	ppa004323m
Phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	Pentose phosphate pathway	ppa007259m
Ribokinase	Pentose phosphate pathway	ppa008494m
4-coumarate-CoA ligase	Phenylalanine metabolism	ppa003893m, ppa017093m
Hippurate hydrolase	Phenylalanine metabolism	ppa005752m
Peroxidase	Phenylalanine metabolism	ppa023689m, ppa001937m, ppa011667m
3-dehydroquinate dehydratase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa004026m
Anthranilate synthase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa009800m
Aspartate transaminase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa006743m
Histidinol-phosphate transaminase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa006306m
Indole-3-glycerol-phosphate synthase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa006907m
Shikimate dehydrogenase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa004026m
Beta-glucosidase	Phenylpropanoid biosynthesis	ppa002559m
Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	Phenylpropanoid biosynthesis	ppa024217m
Protein kinase C	Phosphatidylinositol signaling system	ppa004929m
Protoporphyrinogen oxidase	Porphyrin and chlorophyll metabolism	ppa004576m
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	Propanoate metabolism	ppa006533m
Adenosine deaminase	Purine metabolism	ppa010304m
Adenosinetriphosphatase	Purine metabolism	ppa004704m, ppa005048m
Adenylate kinase	Purine metabolism	ppa010508m, ppa009418m, ppa019039m
GMP synthase (glutamine-hydrolysing)	Purine metabolism	ppa004038m
GTP diphosphokinase	Purine metabolism	ppa004113m
Guanylate cyclase	Purine metabolism	ppa000652m
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Purine metabolism	ppa012004m
IMP cyclohydrolase	Purine metabolism	ppa006291m
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	Purine metabolism	ppa002748m
Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	Purine metabolism	ppa017490m
Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	Purine metabolism	ppa006639m

Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Purine metabolism	ppa000246m
Ribose-phosphate diphosphokinase	Purine metabolism	ppa006599m
RNA-directed RNA polymerase	Purine metabolism	ppa000422m
5'-nucleotidase	Pyrimidine metabolism	ppa003757m
CTP synthase	Pyrimidine metabolism	ppa003314m, ppa003624m, ppa003615m
DNA-directed DNA polymerase	Pyrimidine metabolism	ppa000330m, ppa008426m, ppa013345m
dTMP kinase	Pyrimidine metabolism	ppa011118m
Nucleoside-triphosphate-adenylate kinase	Pyrimidine metabolism	ppa010508m
Uracil phosphoribosyltransferase	Pyrimidine metabolism	ppa009527m
Uridine kinase	Pyrimidine metabolism	ppa005044m
Lactoylglutathione lyase	Pyruvate metabolism	ppa012380m, ppa007459m
5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase	Riboflavin metabolism	ppa020208m
Acid phosphatase	Riboflavin metabolism	ppa005293m, ppa006335m, ppa005956m
Riboflavin synthase	Riboflavin metabolism	ppa010865m
1,3-beta-glucan synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa003008m
Alpha-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa001232m, ppa001032m
Beta-fructofuranosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa003670m
Cellulose synthase (UDP-forming)	Starch and sucrose metabolism	ppa011405m
Fructokinase	Starch and sucrose metabolism	ppa004931m, ppa008494m
Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase	Starch and sucrose metabolism	ppa007271m, ppa025098m, ppa006130m
Sucrose alpha-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa003670m
Sucrose synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa001535m
UDP-glucuronate decarboxylase	Starch and sucrose metabolism	ppa008154m, ppa008159m, ppa008156m
Beta-galactosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa002177m, ppa001345m
Beta-glucuronidase	Starch and sucrose metabolism	ppa003804m
Pectate lyase	Starch and sucrose metabolism	ppa007270m
Pectinesterase	Starch and sucrose metabolism	ppa011318m
Polygalacturonase	Starch and sucrose metabolism	ppa003712m, ppa006130m
3-oxo-5alpha-steroid 4-dehydrogenase	Steroid hormone biosynthesis	ppa024349m
Estradiol 17beta-dehydrogenase	Steroid hormone biosynthesis	ppa008500m, ppa008746m

Quinate O-hydroxycinnamoyltransferase	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	ppa005873m, ppa005872m
Phosphomevalonate kinase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa004466m
Cysteine desulfurase	Thiamine metabolism	ppa005512m
Nucleoside-triphosphatase	Thiamine metabolism	ppa005005m, ppa010452m, ppa000799m, ppa001904m, ppa007842m, ppa005076m
O-succinylbenzoate-CoA ligase	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	ppa005737m, ppa005794m, ppa021932m
Dihydroxy-acid dehydratase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	ppa002982m
Ketol-acid reductoisomerase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	ppa003271m
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase	Various types of N-glycan biosynthesis	ppa002999m, ppa003432m, ppa004628m, ppa005950m, ppa003870m, ppa002285m, ppa005938m
Pyridoxal kinase	Vitamin B6 metabolism	ppa008165m
tRNA dimethylallyltransferase	Zeatin biosynthesis	ppa005482m
Mon-specific protein-tyrosine kinase		ppa017272m, ppa005935m
Phosphoprotein phosphatase		ppa008241m, ppa001785m, ppa000652m, ppa008194m, ppa005429m
Phosphorylase		ppa001354m

ANEXO 8

Enzimas codificadas por genes induzidos na condição experimental C-CS_GA₃-CS (Frutos tratados com GA₃ armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente comparados com frutos controle armazenados a frio seguido de dois dias em temperatura ambiente).

Enzimas	Metabolismo	Sequências
alanine transaminase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa005017m
glutamate dehydrogenase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa006442m
glutamate dehydrogenase (NADP+)	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa002737m
glutamate-ammonia ligase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ppa007772m
12-oxophytodienoate reductase	alpha-Linolenic acid metabolism	ppa007490m, ppa1027192m
hydroperoxide dehydratase	alpha-Linolenic acid metabolism	ppa004799m

linoleate 13S-lipoxygenase	alpha-Linolenic acid metabolism	ppa001311m, ppa001016m
Chitinase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa013010m, ppa002019m
UDP-glucose 4,6-dehydratase	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ppa002417m
asparagine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa003379m, ppa023215m
aspartate-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa003379m
threonine-tRNA ligase	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ppa002440m
4-nitrophenylphosphatase	Aminobenzoate degradation	ppa009109m, ppa013379m
vanillate monooxygenase	Aminobenzoate degradation	ppa003695m
anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	Anthocyanin biosynthesis	ppa014698m
nitric-oxide synthase	Arginine and proline metabolism	ppa003526m
pyrroline-5-carboxylate reductase	Arginine and proline metabolism	ppa009660m
isochorismate synthase	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	ppa003652m
phytoene synthase	Biosynthesis of terpenoids and steroids	ppa006596m
acetolactate synthase	C5-Branched dibasic acid metabolism	ppa004716m
haloalkane dehalogenase	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	ppa013578m, ppa010168m
isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)	Citrate cycle TCA cycle	ppa007359m
Asparaginase	Cyanoamino acid metabolism	ppa016260m
gamma-glutamyltransferase	Cyanoamino acid metabolism	ppa005017m
D-cysteine desulfhydrase	Cysteine and methionine metabolism	ppa019738m
ent-kaurene oxidase	Diterpenoid biosynthesis	ppa004372m
Carboxylesterase	Drug metabolism	ppa018291m, ppa006446m, ppa010154m, ppa019167m, ppa004437m
thiopurine S-methyltransferase	Drug metabolism	ppa010661m
1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	ethylene	ppa005017m
fatty-acyl-CoA synthase	Fatty acid biosynthesis	ppa003871m, ppa003658m, ppa025970m, ppa023245m
acetyl-CoA C-acetyltransferase	Fatty acid metabolism	ppa006371m
acetyl-CoA carboxylase	Fatty acid metabolism	ppa001950m
acyl-CoA dehydrogenase	Fatty acid metabolism	ppa001473m
acyl-CoA oxidase	Fatty acid metabolism	ppa002282m
alcohol dehydrogenase	Fatty acid metabolism	ppa007137m, ppa006317m, ppa019020m, ppa008957m
long-chain-fatty-acid-CoA ligase	Fatty acid metabolism	ppa002540m
unspecific monooxygenase	Fatty acid metabolism	ppa026124m,

		ppa004199m
dihydrokaempferol 4-reductase	Flavonoid biosynthesis	ppa008662m, ppa015314m, ppa008673m
flavonol synthase	Flavonoid biosynthesis	ppa007342m, ppa008310m, ppa008462m
leucocyanidin oxygenase	Flavonoid biosynthesis	ppa007342m
aminodeoxychorismate lyase	Folate biosynthesis	ppa006695m
aminodeoxychorismate synthase	Folate biosynthesis	ppa001080m
gamma-glutamyl hydrolase	Folate biosynthesis	ppa006962m
Fucokinase	Fructose and mannose metabolism	ppa000586m
fucose-1-phosphate guanylyltransferase	Fructose and mannose metabolism	ppa000586m
mannose-6-phosphate isomerase	Fructose and mannose metabolism	ppa001192m
beta-galactosidase	Galactose metabolism	ppa002839m
galactinol-raffinose galactosyltransferase	Galactose metabolism	ppa001744m
galactinol-sucrose galactosyltransferase	Galactose metabolism	ppa001744m
Galactokinase	Galactose metabolism	ppa004568m, ppa000586m
inositol 3-alpha-galactosyltransferase	Galactose metabolism	ppa026497m
5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	Glutathione metabolism	ppa000342m
glutathione peroxidase	Glutathione metabolism	ppa012407m, ppa010584m, ppa012378m, ppa011682m, ppa012412m
glutathione transferase	Glutathione metabolism	ppa011371m, ppb013116m
phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase	Glutathione metabolism	ppa012407m, ppa010584m, ppa011682m, ppa012412m
alpha-mannosidase	glycan degradation	ppa026880m
acylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	ppa006753m, ppa006906m
alcohol dehydrogenase (NADP+)	Glycerolipid metabolism	ppa008632m
aldehyde reductase	Glycerolipid metabolism	ppa007552m
diacylglycerol O-acyltransferase	Glycerolipid metabolism	ppa004668m
Galactolipase	Glycerolipid metabolism	ppa007043m, ppa006519m
monogalactosyldiacylglycerol synthase	Glycerolipid metabolism	ppa003927m
phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	Glycerolipid metabolism	ppa002500m
triacylglycerol lipase	Glycerolipid metabolism	ppa003973m, ppa007043m, ppa003930m, ppa006519m

diacylglycerol kinase (ATP dependent)	Glycerophospholipid metabolism	ppa021564m, ppa002021m
phosphatidate cytidyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa009034m
phosphatidate phosphatase	Glycerophospholipid metabolism	ppa018484m, ppa007663m
phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	ppa002500m
phospholipase D	Glycerophospholipid metabolism	ppa001519m
alanine-glyoxylate transaminase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa005017m
glycine transaminase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa005017m
phosphoserine phosphatase	Glycine, serine and threonine metabolism	ppa009310m
fructose-bisphosphatase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa007036m
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+)	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004622m
phosphoglycerate mutase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa004214m
pyruvate kinase	Glycolysis / Gluconeogenesis	ppa003316m
galactosylxylosylprotein 3-beta-galactosyltransferase	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	ppa008209m
glucuronyl-galactosyl-proteoglycan 4-alpha-N-acetylglucosaminyltransferase	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	ppa007532m
2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa009408m
malate dehydrogenase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa005860m
phosphoglycolate phosphatase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ppa018215m, ppa009109m, ppa013379m
deacetoxyvindoline 4-hydroxylase	Indole alkaloid biosynthesis	ppa027196m, ppa007487m
strictosidine synthase	Indole alkaloid biosynthesis	ppa001074m
inositol-polyphosphate 5-phosphatase	Inositol phosphate metabolism	ppa000518m
phosphoinositide 5-phosphatase	Inositol phosphate metabolism	ppa000518m
phosphoinositide phospholipase C	Inositol phosphate metabolism	ppa007132m, ppa023600m, ppa003890m
reticuline oxidase	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ppa004189m
Delta12-fatty acid dehydrogenase	Linoleic acid metabolism	ppa005574m
lipoyl synthase	Lipoic acid metabolism	ppa007043m, ppa006519m, ppa012324m
3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	Lipopolysaccharide biosynthesis	ppa009246m
cysteine synthase	Sulfur metabolism	ppa008604m
serine O-acetyltransferase	Sulfur metabolism	ppa006784m
ferredoxin hydrogenase	Methane metabolism	ppa005089m
S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	Methane metabolism	ppa006317m, ppa019020m

(-)-menthol dehydrogenase	Monoterpenoid biosynthesis	ppa008632m
(+)-neomenthol dehydrogenase	Monoterpenoid biosynthesis	ppa008632m
mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	N-glycan biosynthesis	ppa026880m
NAD ⁺ diphosphatase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	ppa005825m, ppa010545m
carbonate dehydratase	Nitrogen metabolism	ppa008559m
nitronate monooxygenase	Nitrogen metabolism	ppa022894m
H ⁺ -exporting ATPase	Oxidative phosphorylation	ppa000931m
succinate dehydrogenase (ubiquinone)	Oxidative phosphorylation	ppa007934m
phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	Pentose phosphate pathway	ppa008030m, ppa009408m
Ribokinase	Pentose phosphate pathway	ppa007069m
ribose-5-phosphate isomerase	Pentose phosphate pathway	ppa009259m
Transaldolase	Pentose phosphate pathway	ppa006960m
D-alanine-D-alanine ligase	Peptidoglycan biosynthesis	ppa022398m
phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	Peptidoglycan biosynthesis	ppa006314m
4-coumarate-CoA ligase	Phenylalanine metabolism	ppa003871m, ppa003658m, ppa025970m, ppa023245m
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Phenylalanine metabolism	ppa005851m
Amidase	Phenylalanine metabolism	ppa003050m
D-amino-acid dehydrogenase	Phenylalanine metabolism	ppa007360m
D-amino-acid transaminase	Phenylalanine metabolism	ppa006695m, ppa008003m
Peroxidase	Phenylalanine metabolism	ppa001114m
anthranilate synthase	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ppa001080m
cinnamoyl-CoA reductase	Phenylpropanoid biosynthesis	ppa008662m, ppa015314m, ppa008673m
protein kinase C	Phosphatidylinositol signaling system	ppa000304m
dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	Polyketide sugar unit biosynthesis	ppa002417m
dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Polyketide sugar unit biosynthesis	ppa002417m
Chlorophyllase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa014909m
Ferrochelataase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa005689m
Ferroxidase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa026887m, ppa010086m
magnesium protoporphyrin IX methyltransferase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa008655m
magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa007723m
porphobilinogen synthase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa006215m
protochlorophyllide reductase	Porphyryr and chlorophyll metabolism	ppa008709m, ppa019738m, ppa008468m,

		ppa008299m, ppa008889m, ppa008452m
1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	Propanoate metabolism	ppa019738m
methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating)	Propanoate metabolism	ppa008148m
adenosine nucleosidase	Purine metabolism	ppa001219m
Adenosinetriphosphatase	Purine metabolism	ppa018576m
adenylate kinase	Purine metabolism	ppa010585m
allantoate deiminase	Purine metabolism	ppa005027m
Allantoinase	Purine metabolism	ppa004531m
GTP diphosphokinase	Purine metabolism	ppa005600m
guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-diphosphatase	Purine metabolism	ppa005600m
inosine nucleosidase	Purine metabolism	ppa001219m
RNA-directed RNA polymerase	Purine metabolism	ppa000513m
5'-nucleotidase	Pyrimidine metabolism	ppa011683m
DNA-directed DNA polymerase	Pyrimidine metabolism	ppa000171m, ppa022694m, ppa018609m
DNA-directed RNA polymerase	Pyrimidine metabolism	ppa003788m, ppa006920m, ppa004393m, ppa004259m
uracil phosphoribosyltransferase	Pyrimidine metabolism	ppa005095m
uridine kinase	Pyrimidine metabolism	ppa005095m
lactoylglutathione lyase	Pyruvate metabolism	ppa011371m, ppb013116m
malate dehydrogenase (NADP+)	Pyruvate metabolism	ppa005860m
malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+)	Pyruvate metabolism	ppa004674m, ppa003214m, ppa003142m
acid phosphatase	Riboflavin metabolism	ppa018484m, ppa000633m, ppa010275m, ppa021353m, ppa007663m
FAD diphosphatase	Riboflavin metabolism	ppa018345m
selenocysteine lyase	Selenocompound metabolism	ppa005298m
Glucosylceramidase	Sphingolipid metabolism	ppa000954m
serine C-palmitoyltransferase	Sphingolipid metabolism	ppa004859m
1,3-beta-glucan synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa000077m, ppa000074m
1,4-alpha-glucan branching enzyme	Starch and sucrose metabolism	ppa001312m
alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	Starch and sucrose metabolism	ppa001048m
alpha-amylase	Starch and sucrose metabolism	ppa001639m, ppa000905m
alpha-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa000927m

beta-amylase	Starch and sucrose metabolism	ppa004334m, ppa003539m
beta-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppb011574m
beta-glucuronidase	Starch and sucrose metabolism	ppa019445m
cellulose synthase (UDP-forming)	Starch and sucrose metabolism	ppa026497m
galacturan 1,4-alpha-galacturonidase	Starch and sucrose metabolism	ppa005310m
glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	ppa020393m, ppa004643m, ppa010568m, ppa005641m
glucose-1-phosphate adenyltransferase	Starch and sucrose metabolism	ppa004135m
Glucuronosyltransferase	Starch and sucrose metabolism	ppa005437m
Phosphorylase	Starch and sucrose metabolism	ppa000587m, ppa000958m
starch synthase (glycosyl-transferring)	Starch and sucrose metabolism	ppa002995m, ppa001074m, ppa000758m
sucrose synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa002723m
sucrose-phosphate synthase	Starch and sucrose metabolism	ppa000716m, ppa006010m
trehalose-phosphatase	Starch and sucrose metabolism	ppa001048m
pectate lyase	Starch and sucrose metabolism	ppa022128m, ppa017310m
Pectinesterase	Starch and sucrose metabolism	ppa015829m, ppa011699m, ppa004300m, ppa004437m
Polygalacturonase	Starch and sucrose metabolism	ppa008161m, ppa005310m, ppa002440m, ppa006590m
cycloartenol synthase	Steroid biosynthesis	ppa001806m
3alpha(or 20beta)-hydroxysteroid dehydrogenase	Steroid hormone biosynthesis	ppa009553m
3beta-hydroxy-Delta5-steroid dehydrogenase	Steroid hormone biosynthesis	ppa008365m, ppa023813m
Delta4-3-oxosteroid 5beta-reductase	Steroid hormone biosynthesis	ppa023813m
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Synthesis and degradation of ketone bodies	ppa008030m, ppa009408m
cysteamine dioxygenase	Taurine and hypotaurine metabolism	ppb017440m
(2E,6E)-farnesyl diphosphate synthase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa007368m
(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl- diphosphate synthase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa002111m
Dimethylallyltranstransferase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa007368m
geranylgeranyl diphosphate synthase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa007368m
heptaprenyl diphosphate synthase	Terpenoid backbone biosynthesis	ppa006010m, ppa007368m
cysteine desulfurase	Thiamine metabolism	ppa005298m
nucleoside-triphosphatase	Thiamine metabolism	ppa002155m

hyoscyamine (6S)-dioxygenase	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	ppa007969m
Catalase	Tryptophan metabolism	ppa002665m
o-succinylbenzoate-CoA ligase	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	ppa003716m
mitogen-activated protein kinase		ppa003297m, ppa006536m, ppa004489m, ppa006129m
non-specific protein-tyrosine kinase		ppa005531m, ppa019902m, ppa004394m, ppa008676m, ppa002871m, ppa006060m, ppa006035m, ppa023447m, ppa017603m, ppa000872m
phosphoprotein phosphatase		ppa004252m

11.0 VITAE

Camila Pegoraro, nascida em 29/10/1984 em Nova Prata/RS, ingressou na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em abril de 2003, concluindo o curso em março de 2008. Foi bolsista de iniciação científica (FAPERGS e CNPq), no período de 2003 a 2008. Em março de 2008, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, área de concentração em Fisiologia Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças, sob orientação dos professores Jorge Adolfo Silva e Cesar Valmor Rombaldi, concluindo em fevereiro de 2010. Em março do mesmo ano, ingressou no doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitomelhoramento sob orientação dos professores Antonio Costa de Oliveira, Cesar Valmor Rombaldi, Luciano Carlos da Maia e Livio Trainotti, concluindo o curso em setembro 2012.