



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS E
PEROXISSOMAIS DE ASCORBATO PEROXIDASE EM ARROZ
(*Oryza sativa* L.)**

SÍLVIA BARCELLOS ROSA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Márcia Margis-Pinheiro

PORTO ALEGRE – RS

Fevereiro de 2008.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS
SEGUINTE INSTITUIÇÕES:**

Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

United National Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO).

A meus pais,

Otoni e Amarilis

**Pelo constante incentivo e
amor dedicado.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Márcia Margis-Pinheiro pela exímia educação oferecida, que além de orientadora do meu trabalho de mestrado em tempo integral, foi amiga acima de tudo. Pelos seus ensinamentos e por me oportunizar a realização de cursos no Rio de Janeiro e EUA – os quais foram de grande importância para minha formação. Pela confiança depositada. Agradeço a Dra. Márcia por sua paciência, dedicação e esforço para proporcionar as melhores condições de trabalho. Uma pessoa pela qual tenho imensa admiração.

Ao Dr. Rogério Margis por inestimável ajuda, ensinamentos oferecidos, disposição e amizade. Pelo seu questionamento sempre pertinente, o qual me fez aprender muito. Agradeço por sua participação como membro da comissão de acompanhamento e por ser revisor desta dissertação.

À Dra. Janette Fett pela sua disposição e discussão crítica de minha dissertação como membro da minha comissão de acompanhamento, além de sua participação na banca de examinadores da dissertação. Ainda por permitir a utilização de seu laboratório durante vários experimentos.

À Dra. Luciane Passaglia e Dra. Irene Schrank por se disporem a participar na banca de defesa de minha dissertação de mestrado.

Ao Dr. Marcio Alves Ferreira pela sua participação na avaliação desta dissertação e também pela realização das análises de microarranjo das plantas silenciadas, o que permitirá o seguimento deste trabalho.

Ao Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira pela realização das análises bioquímicas das plantas silenciadas.

Ao Dr. Mauro da Rosa pelo auxílio no desenvolvimento do estresse com radiação UV e pelas análises fotossintéticas em desenvolvimento.

Ao Dr. Arthur Germano Fett Neto pela disponibilidade de uso de seu laboratório para experimentos e aos seus alunos pela ajuda.

Ao professor Giancarlo Pasquali por permitir que o auxiliasse a ministrar sua disciplina de Biologia Molecular para Farmácia.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e da Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos.

Ao grupo da Genética Vegetal por permitirem a realização de meu trabalho de forma agradável. Agradeço principalmente a todos os integrantes do Núcleo de Genômica Funcional de Plantas e a Débora, Beatriz, Ricardo e Sílvia Richter pela preciosa ajuda e convivência.

Agradeço a imensa ajuda e amizade da aluna de iniciação científica Fernanda Lazzarotto nos últimos 8 meses. A presença de Fernanda permitiu a finalização de meu trabalho em tempo hábil.

A todos do Laboratório de Genomas e Populações de Plantas, em especial a Andréia, Júlio e Guilherme Loss.

Agradeço de maneira especial,

Aos meus queridos grandes amigos pela compreensão de minha ausência por inúmeras vezes, pelo seu carinho, força e por tornar minha vida mais alegre.

A minha família que sempre confiou em mim e pelo amor dedicado. Principalmente, a Maria e Guilherme pelos conselhos e pela companhia sempre que possível. Pessoas imprescindíveis na minha vida.

Agradeço principalmente aos meus pais. Minhas conquistas foram obtidas graças a eles. Inicialmente, por me abrirem os caminhos da pesquisa desde minha infância. Quem diria que os dias em que passava quando criança ajudando minha mãe a fazer leitura de ferrugem da folha iria resultar em uma futura pesquisadora na área vegetal? A paixão pelo que fazem estimulou que eu escolhesse esta área. Agradeço pela confiança, ajuda, dedicação, incentivo e pelo imenso amor.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	13
Estresse oxidativo.....	13
Espécies reativas de oxigênio.....	13
Defesa <i>versus</i> morte celular.....	14
Mecanismos de defesa antioxidante na célula vegetal.....	17
Ascorbato peroxidase.....	20
O modelo vegetal.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
Construção dos vetores visando o silenciamento gênico.....	39
Transformação de <i>Escherichia coli</i>	41
Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
Transformação de <i>Oryza sativa</i> L. subespécie <i>japonica</i> cultivar Nipponbare.....	43
Minipreparação de plasmídeo (Miniprep).....	45
Extração de DNA.....	46
Extração de RNA.....	46
Síntese de DNA complementar (cDNA).....	47
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	48
PCR em Tempo Real Quantitativo (qRT-PCR).....	49
Estresses Abióticos.....	50
Alta Intensidade de Radiação UV-B em Plantas Jovens.....	50
Estresse com Alta Concentração de Alumínio.....	50
Análise Estatística.....	51
6. RESULTADOS.....	52
6.1. Obtenção das Plantas Transgênicas.....	52

6.2. Caracterização funcional dos genes das ascorbato peroxidases citosólicas...	57
Silenciamento simultâneo dos genes <i>OsAPx1</i> e <i>OsAPx2</i>	57
<i>Activation of compensatory antioxidant mechanisms in response to post-transcriptional silencing of cytosolic APx genes in rice (Oryza sativa)</i>	58
Plantas <i>OsAPx1s</i> silenciadas no gene <i>OsAPx1</i>	93
Plantas <i>OsAPX2s</i> silenciadas no gene <i>OsAPx2</i>	96
6.3. Caracterização funcional das ascorbato peroxidases peroxissomais.....	100
Silenciamento simultâneo dos genes <i>OsAPx3</i> e <i>OsAPx4</i>	100
Plantas <i>OsAPx3s</i> silenciadas do gene <i>OsAPx3</i>	103
Plantas <i>OsAPx4s</i> silenciadas do gene <i>OsAPx4</i>	106
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
APÊNDICE 1: Seqüências genômicas e cDNA dos genes <i>OsAPx</i> e alinhamento dos “primers” utilizados nas construções RNAi e para análise da expressão transcricional por RT-PCR quantitativo.....	134
APÊNDICE 2: Meios de cultura e solução nutritiva utilizados na transformação de arroz.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA – ácido abscísico

AO – ascorbato oxidase

APx – ascorbato peroxidase

AS – ácido salicílico

AsA – ácido ascórbico ou ascorbato

AU – unidade de atividade enzimática

CAM – metabolismo ácido das crassuláceas

cAPx – APx citosólica

Cat – catalase

cDNA – DNA complementar

CuZn SoD – superóxido dismutase cobre-zinco

DAB – tetrahydrocloro de diaminobenzidina

DHA – dehidroascorbato

DHAR – dehidroascorbato redutase

DNA – ácido desoxirribonucléico

dsRNA – RNA de dupla fita

eF – fator de alongação

ERO – espécies reativas de oxigênio

EST – fragmentos de sequências expressas em mRNA

FDh – formaldeído desidrogenase

FL-cDNA – seqüência completa de DNA complementar

GFP – proteína de fluorescência verde

GR – glutathione redutase

GPX – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSH – glutathione oxidada

Gus – β -glucuronidase

hpRNA – RNA em estrutura grampo ou “hairpin”

Hpt – gene de resistência à higromicina

HSE – elemento responsivo ao choque térmico

IR – repetições invertidas
JA – ácido jasmônico
KO- s/mAPX – nocaute no gene *APx* do estroma cloroplástica/ mitocondrial
LB – meio de cultura bacteriano Luria Broth
Mb – mega bases
MDAR – monodehidroascorbato redutase
MDHA – monodehidroascorbato
mRNA – RNA mensageiro
MS – meio de cultura de tecidos Murashige e Skoog
MV – metilviologênio
N6D – meio de indução de calos
NB – meio de cultura de tecidos
NBA – NB com acetoseringona
NB-HTC – NB com higromicina, timentina e cefotaxima
NBT – Cloreto de azul nitrotetrazolium
NO- óxido nítrico
NPTII – gene de resistência à canamicina (Neomicina fosfotransferase)
nt - nucleotídeo
NT – planta não-transformada
OsAPx – ascorbato peroxidase de *Oryza sativa*
OsAPx1s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx1*
OsAPx1/2s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx1* e *APx2*
OsAPx2s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx2*
OsAPx3s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx3*
OsAPx3/4s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx3* e *APx4*
OsAPx4s – plantas de *Oryza sativa* silenciadas para o gene *APx4*
OsPip – proteína intrínseca da membrana plasmática de arroz
pAPx – APx peroxissomal
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia da DNA polimerase
PEG – polietilenoglicol
PET – transporte de elétron fotossintético

PrxR – peroxirredoxina
qRT-PCR – PCR em Tempo Real quantitativo
RDRP – RNA polimerase dependente de RNA
RISC – complexo de silenciamento de RNAi
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – RNA de interferência
ROS – espécie reativa de oxigênio
RT – transcriptase reversa
sAPx – APx do estroma cloroplástico
SER – Elemento *cis* regulatório do processamento de transcritos
SoD – superóxido dismutase
tAPx – APx do tilacóide cloroplástico
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
T-DNA – DNA transferido pela *Agrobacterium tumefaciens*
Ubi – ubiquitina
UTR- região não-transcrita
UV- radiação ultravioleta

Caracterização funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.)

Autor: Sílvia Barcellos Rosa

Orientadora: Marcia Margis-Pinheiro

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas constantemente pelo metabolismo aeróbico. Em situações de estresse biótico ou abiótico, a produção é aumentada e a toxicidade das ERO pode conduzir a diversos danos celulares. As ERO atuam também como moléculas sinalizadoras regulando a expressão de genes de defesa a estresses, senescência, morte programada da célula, crescimento e desenvolvimento da planta, entre outros processos metabólicos. Uma vez que as ERO são tóxicas e também participam de eventos de sinalização, as células vegetais requerem mecanismos que regulem finamente a concentração intracelular destas moléculas. A ascorbato peroxidase (APx) é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, catalisando a decomposição do H₂O₂. Em arroz, a APx é codificada por oito genes, cujas isoformas são caracterizadas por sua localização subcelular: citosólica, peroxissomal, mitocondrial ou cloroplástica. O objetivo deste trabalho foi caracterizar funcionalmente as APx citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*) e peroxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*). A estratégia utilizada foi o silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi) dos genes individualmente e de ambos os genes codificantes de isoformas do mesmo compartimento subcelular. A redução da expressão de cada gene, assim como de ambos os genes de um compartimento, resultou na produção de diferentes sinais. As plantas RNAi mostraram diferentes fenótipos e padrões de expressão transcricional dos genes da família *OsAPx*. Analisando as plantas silenciadas para os genes *OsAPx1* e *OsAPx2* sob estresse com radiação UV e altas doses de alumínio, foi observada compensação por outras enzimas antioxidantes e aclimatação, possivelmente sinalizados pelos níveis mais elevados de H₂O₂. Estes resultados indicam que cada isoforma de *OsAPx* pode apresentar funções específicas na célula.

Functional characterization of cytosolic and peroxisomal isoforms of ascorbate peroxidase in rice (*Oryza sativa* L.)

Author: Sílvia Barcellos Rosa

Advisor: Marcia Margis-Pinheiro

ABSTRACT

Reactive Oxygen Species (ROS) are continually produced by aerobic metabolism. Under biotic and abiotic stresses, the production is enhanced and the ROS toxicity can lead to cell damage. ROS act also as signalling molecules and are able to regulate the expression of resistance genes, senescence, programmed cell death, plant growth and development, among other metabolic processes. By the fact that ROS are cytotoxic and make part of signalling events, plant cells need mechanisms to tightly regulate the intracellular concentration of these molecules. Ascorbate peroxidase (APx) is a fundamental enzyme of the antioxidant metabolism, it catalyses the H₂O₂ decomposition. In rice, APx are encoded by a small multigene family, and the different isoforms are classified according to their subcellular localization: cytosolic, peroxisomal, mitochondrial or chloroplastic. The present work aimed to characterize the function of cytosolic (*OsAPx1* and *OsAPx2*) and peroxisomal (*OsAPx3* and *OsAPx4*) APx isoforms. The strategy was the post-transcription silencing by interference RNA (RNAi) of single genes and both genes of the same subcellular localization. The reduced expression of each gene or both genes from the same compartment resulted in the development of different signals. RNAi plants showed changes in the phenotype and in the transcriptional expression of the *OsAPx* gene family. The analyses of *OsAPx1* and *OsAPx2* silenced plants under stresses with UV radiation and aluminum revealed that the lack of APx was compensated by other antioxidant enzymes and the acclimation could be signaled by the increased level of H₂O₂. These results indicate that each isoform of APx should have specific functions in the cell.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Estresse oxidativo

Organismos aeróbicos, em um mecanismo eficiente de obtenção de energia, utilizam o oxigênio atmosférico (O_2) para oxidar componentes orgânicos. A redução univalente da molécula de O_2 produz um conjunto de formas parcialmente reduzidas de oxigênio, denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO). Desta forma, a produção de ERO é inevitável em condições ótimas de crescimento. A imposição de condição de estresse biótica ou abiótica conduz à elevação da produção destas moléculas. O acúmulo das ERO, causado pelo aumento de sua produção e ineficiência dos mecanismos antioxidantes em decomporem estas moléculas em formas menos tóxicas, pode resultar em diversos danos oxidativos em nível celular (SHIGEOKA *et al.*, 2002).

A disponibilidade das seqüências gênicas completas de *Arabidopsis thaliana* e de arroz (*Oryza sativa*) e os avanços nas pesquisas, como em genômica funcional e proteômica, têm permitido um melhor entendimento da função das ERO em plantas, referente ao seu papel na toxicidade celular e como molécula sinalizadora de diversos mecanismos celulares, entre esses, defesa a estresses bióticos e abióticos.

Espécies reativas de oxigênio

ERO são formadas a partir da excitação do O_2 que resulta na forma de oxigênio singlete (1O_2) ou pela transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 formando, respectivamente, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila (HO^\bullet) (MITTLER, 2002).

As ERO são produtos secundários inevitáveis do metabolismo aeróbico (KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Reações formadoras de ERO estão envolvidas com o metabolismo normal, como na fotossíntese e respiração, assim como pertencem a vias induzidas durante estresses abióticos (MITTLER, 2002). As ERO podem ser geradas por diversas atividades enzimáticas, por exemplo, pela atividade das NADPH oxidases (MITTLER *et al.*, 2004). Durante condições normais de crescimento, a produção de ERO é

baixa ($240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ e $0,5 \mu\text{M s}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ em cloroplastos). Entretanto, diante de diversos tipos de estresse, quando a homeostase celular é rompida, ocorre aumento da produção destas espécies ($240-720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ e $5-15 \mu\text{M s}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ em cloroplastos) (POLLE, 2001; MITTLER, 2002).

Organelas com alta atividade metabólica oxidativa ou com intenso fluxo de elétrons, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, são as maiores fontes de produção de ERO nas células vegetais. O H_2O_2 , além de ser produzido durante a fotossíntese, fotorrespiração e respiração, também é gerado na matriz extracelular. O citosol não é considerado grande fonte de ERO, mas atua como um depósito para estas moléculas derivadas de outros compartimentos subcelulares (SLEVAK *et al.*, 2007).

O peróxido de hidrogênio é a molécula mais estável entre as ERO e apresenta papel crucial como molécula sinalizadora em vários processos fisiológicos. Níveis intracelulares e intercelulares de H_2O_2 elevam-se em estresses ambientais. O H_2O_2 é o fator chave na mediação do fenômeno de aclimatação e tolerância cruzada, através do qual uma exposição prévia a um estresse pode induzir tolerância as subseqüentes exposições ao mesmo ou outro estresse (SATO *et al.*, 2001; NEILL *et al.*, 2002). H_2O_2 interage com proteínas contendo o grupo funcional tiol e ativa diferentes vias de sinalização, assim como fatores de transcrição. O H_2O_2 é transportado através das membranas juntamente com água pelos canais de água aquaporina (HENZLER & STEUDLE, 2000). Conseqüentemente, H_2O_2 é capaz de regular expressão gênica e processos do ciclo celular (SLESÁK *et al.*, 2007).

Defesa *versus* morte celular

As ERO, além de indicadores celulares de estresse, são mensageiras secundárias envolvidas em vias de transdução de sinal de resposta a estresses. A concentração intracelular de ERO deve ser controlada finamente, pois o acúmulo destas espécies pode resultar em morte celular (MITTLER, 2002). Seu duplo papel nas reações metabólicas, atuando como produto secundário tóxico do metabolismo aeróbico e como regulador chave de crescimento, desenvolvimento e vias de defesa, é dependente da sua concentração intracelular (FOYER & NOCTOR, 2005; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Uma

questão pertinente é como as ERO, principalmente H_2O_2 , são capazes de atuar especificamente, apesar do duplo papel funcional e das diversas respostas biológicas em que participam (Figura 1).

As ERO, como moléculas sinalizadoras, controlam diversos processos metabólicos: ciclo celular, crescimento, morte programada da célula, senescência, sinalização hormonal, resposta a estresses abióticos, defesa a patógenos, respostas sistêmicas e desenvolvimento (MITTLER *et al.*, 1998; MITTLER, 2002; VRANOVÁ *et al.*, 2002; VANDENABEELE *et al.*, 2003; VACCA *et al.*, 2004; DE PINTO *et al.*, 2006; KWAK *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2006; QUEVAL *et al.*, 2007; SLESAK *et al.*, 2007; ZAVALETA-MANCERA *et al.*, 2007). Uma alteração sutil na homeostasia de ERO conduz a uma modificação da regulação da expressão de um conjunto específico de genes, como a alteração na expressão de genes codificantes de proteínas antioxidantes e de proteínas envolvidas na cascata de fosforilação, através da ativação de MAPK (KOVTON *et al.*, 2000; NEILL *et al.*, 2002; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Diferentes tipos de ERO afetam a expressão gênica nuclear ativando distintas vias de sinalização. Estresses que induzem a formação de 1O_2 afetam aproximadamente 5 % do total do genoma de *Arabidopsis*, entretanto a expressão destes genes não é afetada da mesma forma quando ocorre elevação dos níveis de O_2^- / H_2O_2 . Não se sabe até o momento se estas vias operam separadamente ou interagem entre si. Inclusive, parece existir antagonismo entre H_2O_2 e 1O_2 no que se refere às respostas a estresses abióticos. Uma interação cruzada entre as ERO parece ser essencial para o controle fino dos ajustes antioxidantes quando em situação de estresse (LALOI *et al.*, 2007).

Tem sido sugerido que as ERO são necessárias para a indução da resistência a doenças e para mediar a tolerância a múltiplos estresses em plantas (KOTCHONI & GACHOMO, 2006). A indução de genes relacionados à defesa e à morte celular requer moléculas sinalizadoras adicionais para transduzir e/ou amplificar o sinal, como ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmônico, auxina e etileno. Estas moléculas sinalizadoras participam possivelmente dos mecanismos de defesa das plantas induzido pelas ERO (VAN CAMP *et al.*, 1998; BOLWELL, 1999; NEILL *et al.*, 2002; VANDENABEELE *et al.*, 2003; FOYER & NOCTOR, 2005; KOTCHONI & GACHOMO, 2006).



FIGURA 1. O papel central das ERO na resposta das plantas a vários estresses ambientais. Condições desfavoráveis conduzem ao aumento da produção de ERO. Dependendo da eficiência do sistema antioxidante, a alteração dos níveis das ERO ocasiona vários efeitos em nível celular e no organismo. (Modificado a partir de SLES AK *et al.*, 2007)

Quando as plantas são submetidas a situações de estresse (frio, intensa luminosidade, ozônio, seca, estresse salino, patógenos, irradiação UV), a geração de ERO é intensificada. O acúmulo excessivo destas moléculas exige a ativação de defesas adicionais (KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Em uma situação na qual o organismo é incapaz de metabolizar efetivamente o excesso de ERO, estas irão rapidamente provocar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA. Conseqüentemente, estes danos conduzirão à disfunção celular, lesões necróticas ou ainda morte celular. Alternativamente, níveis elevados de ERO podem ativar a via de apoptose, necessária para a defesa a patógenos (MITTLER *et al.*, 1998; FOYER & NOCTOR, 2005; KOTCHONI & GACHOMO, 2006).

Mecanismos de defesa antioxidante na célula vegetal

Uma vez que as ERO são tóxicas e também participam de eventos de sinalização, as células vegetais requerem mecanismos que regulem finamente a concentração intracelular destas moléculas (MITTLER, 2002; MITTLER *et al.*, 2004; NEILL *et al.*, 2002; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). A localização subcelular e as propriedades bioquímicas distintas das enzimas antioxidantes, suas induções diferenciais em níveis gênico e enzimático e a presença de mecanismos não-enzimáticos resultam em um sistema antioxidante versátil e flexível, capaz de controlar o acúmulo de ERO (VRANOVÁ *et al.*, 2002). A concentração é determinada pela diferença entre os mecanismos de produção e decomposição das ERO. Estes mecanismos podem ser alterados bruscamente, dependendo da condição fisiológica na qual a planta se encontra e da integração dos estímulos bioquímicos, do desenvolvimento e do ambiente (MITTLER, 2002).

A redução da produção de ERO pode evitar ou aliviar os efeitos do estresse. Mecanismos que podem reduzir esta produção durante situações de estresse são: (1) adaptações anatômicas, como movimento e curvatura foliar; (2) adaptações fisiológicas, como metabolismo C4 e CAM (metabolismo ácido das crassuláceas); (3) mecanismos moleculares que regulam o aparato fotossintético de acordo com a intensidade e qualidade da luz (MITTLER, 2002).

Em condições normais de crescimento, ERO são rapidamente metabolizadas por vias antioxidantes enzimáticas e por metabólitos não-enzimáticos de baixo peso molecular, como vitaminas antioxidantes, tióis protéicos e não-protéicos (Lim *et al.*, 1993; KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Elementos antioxidantes não-enzimáticos, como ascorbato (AsA) e glutathiona (GSH), são cruciais na defesa contra estresse oxidativo, exercendo papel de tampões antioxidantes (MITTLER, 2002; FOYER & NOCTOR, 2005). A concentração celular de AsA e GSH é mantida no seu estado reduzido por um conjunto de enzimas dependentes de NAD(P)H (monodehidroascorbato redutase, dehidroascorbato redutase e glutathiona redutase) (MITTLER *et al.*, 2004).

Os principais mecanismos enzimáticos de decomposição de ERO em células vegetais incluem: a superóxido dismutase (SoD), ascorbato peroxidase (APx), glutathiona peroxidase (GPx), peroxirredoxina (PrxR) e catalase (Cat). Estas enzimas antioxidantes estão presentes em praticamente todos os compartimentos subcelulares. Usualmente, uma organela apresenta mais de uma enzima capaz de decompor uma mesma ERO (MITTLER, 2002; MITTLER *et al.*, 2004). É importante destacar que o H₂O₂ apresenta a capacidade de difusão entre os diferentes compartimentos subcelulares (HENZLER & STEUDLE, 2000). Além disso, o transporte de AsA e GSH é central na determinação da concentração específica destes compostos e do potencial redox nos diferentes compartimentos celulares (PIGNOCCHI & FOYER, 2003; MITTLER *et al.*, 2004).

O balanço entre as atividades de SoD, APx e Cat é crítico para determinar o nível intracelular efetivo dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (MITTLER, 2002). Este balanço e o seqüestro de íons metálicos são importantes para prevenir a formação de radicais hidroxila via reações de Fenton (ASADA, 2006). APx e Cat utilizam como substrato H₂O₂. A diferença de afinidade da APx (em nível de µM) e da Cat (em nível de mM) pelo H₂O₂ sugere funções diferentes entre as duas enzimas: a APx parece ser responsável pela modulação fina de ERO, enquanto a Cat deve exercer papel na remoção de H₂O₂ durante estresse. Outra diferença entre APx e Cat é a localização subcelular. A Cat encontra-se preferencialmente no peroxissomo. Além disso, diferentemente da APx, a atividade da Cat não requer suprimento de moléculas doadoras de elétrons (MITTLER, 2002).

O ciclo da ascorbato-glutationa é essencial na decomposição de H_2O_2 . Os componentes deste ciclo antioxidante estão presentes em praticamente todos os compartimentos intracelulares (Figura 2). A APx utiliza ascorbato (AsA) na sua forma reduzida como doador específico de elétron para reduzir H_2O_2 em água com concomitante geração de monodehidroascorbato (MDHA). MDHA pode ser espontaneamente reduzido à dehidroascorbato (DHA). AsA ainda pode ser recuperado pela ação da MDHA redutase (MDHAR) dependente de NAD(P)H. DHA redutase, utilizando GSH como doador de elétrons, reduz DHA à AsA. A forma reduzida de GSH é, por sua vez, recuperada a partir de sua forma oxidada (GSSG) pela glutatona redutase (GR) dependente de NAD(P)H (ASADA, 1999; SHIGEOKA *et al.*, 2002).

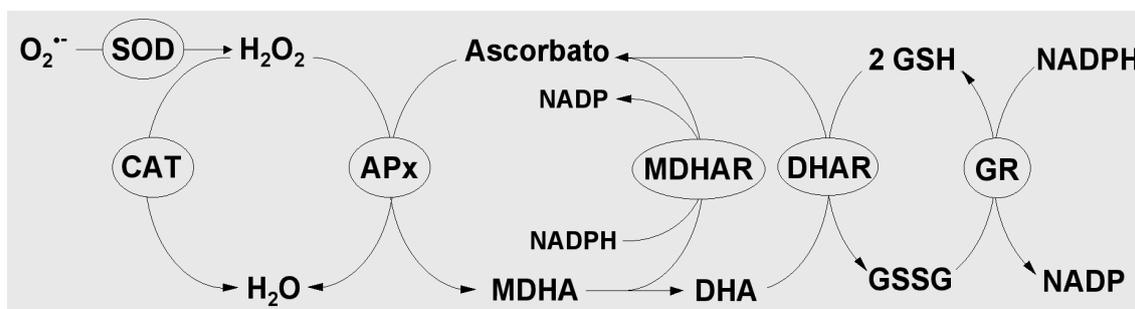


Figura 2. Ciclo ascorbato-glutationa e reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes SoD, Cat, APx, MDHAR, DHAR e GR (TEIXEIRA, 2005).

A complexa relação entre diferentes mecanismos de produção e de detoxificação de ERO pode ser determinada pela análise de plantas transgênicas com supressão dos mecanismos antioxidantes. Plantas com redução da atividade de APx induzem Cat, SoD e GR para compensar a perda de APx, enquanto plantas com supressão de Cat induzem APx. Já plantas antisense para APx e Cat não induziram genes de resposta a estresses, como *SoD* e *GR*. Inclusive, essas plantas mostraram-se mais tolerantes a estresses oxidativos que as plantas com redução de apenas *Cat* ou *APx* (RIZHSKY *et al.*, 2002). A complexidade dos mecanismos antioxidantes também pode ser confirmada pelo relato do envolvimento de ao menos 152 genes regulando o metabolismo de ERO em *A. thaliana* sob ataque de patógeno (MITTLER *et al.*, 2004).

Ascorbato peroxidase

A APx, uma heme-peroxidase de classe I, é um componente crítico na prevenção do estresse oxidativo em organismos fotossintéticos. Como já descrito anteriormente, a APx catalisa a decomposição de H_2O_2 em água e O_2 , utilizando como molécula doadora de elétron específica o AsA reduzido (ASADA, 1999). A APx é codificada por pequena família multigênica em plantas superiores (PANCHUCK *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2007). Suas diferentes isoformas são classificadas de acordo com a localização subcelular. Isoformas solúveis são encontradas no citosol, mitocôndria e no estroma cloroplástico; enquanto isoformas ligadas às membranas encontram-se em peroxissomos e no tilacóide cloroplástico. A localização subcelular das isoenzimas é determinada pela presença de peptídeos sinal organela-específicos e domínios transmembrana presentes na extremidade C- ou N-terminal da proteína (SHIGEOKA *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2004).

A comparação entre as diferentes isoformas de APx de arroz e outras espécies revelou alto grau de conservação entre essas proteínas. Todas as proteínas compartilham uma região central, o núcleo catalítico, onde estão presentes o sítio ativo e o domínio de ligação ao heme (HENRISSAT *et al.*, 1990). Em arroz, as APx são codificadas por uma família gênica composta de oito genes, denominados de *APx1* a *APx8*. A localização subcelular predita de cada isoforma, baseada na presença de peptídeos sinais adicionais, é descrita a seguir: os genes *APx1* (cromossomo 3) e *APx2* (cromossomo 7) codificam isoformas citosólicas; *APx3* (cromossomo 4) e *APx4* (cromossomo 8), isoformas peroxissomais; isoformas mitocondriais são codificadas pelos genes *APx5* (cromossomo 12) e *APx6* (cromossomo 12), os quais se encontram em tandem no genoma do arroz; *APx7* (cromossomo 4) e *APx8* (cromossomo 2) codificam isoformas cloroplásticas. É relevante relatar o alto grau de conservação na estrutura gênica entre os genes de APx que codificam isoformas de uma mesma localização subcelular (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Isoformas cloroplásticas (estromal e ligada ao tilacóide) são geradas a partir de um único gene por “splicing” alternativo em espinafre (*Spinacia oleracea*) (ISHIWAKA *et al.*, 1997), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (YOSHIMURA *et al.*, 2000), abóbora (*Curcubita* sp.) (MANO *et al.*, 1997) e em *Mesembryanthemum crystallinum*. Entretanto, as isoformas cloroplásticas são codificadas por genes individuais em *A.*

thaliana (JESPERSEN *et al.*, 1997) e em arroz, como já descrito (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Pesquisas intensas têm sido realizadas com o objetivo de entender a função das diferentes isoformas de APx, a relação entre as isoformas e entre essas e outros elementos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A expressão dos genes codificantes de APx é modulada por diversos estímulos ambientais, tais como estresse hídrico e salino, intensidade luminosa, altas e baixas temperaturas, ataque de patógenos, tratamento com H₂O₂ e ácido abscísico, como relatado por ZHANG *et al.*, 1997; MITTLER *et al.*, 1998; YOSHIMURA *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 2001; SHIGEOKA *et al.*, 2002; AGRAWAL *et al.*, 2003; FRYER *et al.*, 2003; MENEZES-BENAVENTE *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2006. A expressão transcricional dos genes APx é também dependente do tecido e da fase do desenvolvimento (AGRAWAL *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Uma revisão referente à regulação de APx em diversas plantas em condições normais e submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticos encontra-se na Tabela 1. Também é relatado na Tabela 1 o comportamento de outros componentes envolvidos no mecanismo antioxidante, uma vez que a atividade desses componentes são interligadas. O mecanismo antioxidante em plantas superiores é complexo, apresentando redundância e flexibilidade entre os diversos elementos que o compõe (MITTLER *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2007). Paralelamente, a diversidade funcional dos genes de APx em arroz sugere coordenação e complementação entre as defesas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares durante o desenvolvimento das plantas e em resposta a estresses abióticos (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Tabela 1. Revisão sobre a regulação de *APx* e outros componentes do mecanismo antioxidante de plantas em diferentes condições de crescimento, etapas de desenvolvimento e tecidos vegetais.

Organismo	Objetivos da pesquisa	Tratamentos	Resultados	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Clonagem e estudo da expressão de gene <i>APx</i> predito como peroxissomal.	NaCl, H ₂ O ₂ , luz UV, frio, AS, seca, paraquat	Os níveis de transcritos aumentaram em resposta ao frio, luz UV, H ₂ O ₂ e paraquat. A indução pelo frio ocorreu apenas após 48h.	ZHANG <i>et al.</i> , 1997
<i>Arabidopsis thaliana</i>	A atividade e a expressão de <i>APx</i> foram estudadas com o intuito de identificar evidências de ligação entre resposta ao estresse por calor e estresse oxidativo com a tolerância ao estresse.	Alta temperatura	<i>cAPx1</i> , <i>cAPx2</i> e <i>APx^s</i> foram induzidas pelo calor. <i>cAPx2</i> foi considerado novo gene de choque térmico. <i>cAPx1</i> é termolábil.	PANCHUK <i>et al.</i> , 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Avaliar a relação entre intensidade luminosa, produção de ERO, umidade atmosférica e ABA na indução da expressão de <i>AtAPx2</i> .	Variação na intensidade luminosa, mutantes de ABA, variação na pressão de vapor atmosférica	Alta intensidade luminosa, H ₂ O ₂ , ABA, aumento da transpiração induzem a expressão de <i>AtAPx2</i> . Expressão de <i>AtAPx2</i> e H ₂ O ₂ são localizados na bainha dos tecidos vasculares.	FRYER <i>et al.</i> , 2003
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Avaliar o efeito do acúmulo de H ₂ O ₂ no metabolismo vegetal em condições ideais de crescimento, utilizando planta nocaute para <i>cAPx1</i> .	Condições ideais, calor e alta intensidade luminosa	Supressão no crescimento e desenvolvimento das plantas nocaute para <i>cAPx1</i> , alteração na resposta dos estômatos e indução de proteínas de choque térmico no estresse luminoso. Indução de diversos genes codificantes de proteínas transdutoras de sinal. Transcritos de enzimas antioxidantes não alterados em condição normal, alteração de algumas enzimas sob luz intensa.	PNUELI <i>et al.</i> , 2003

Tabela 1. Continuação.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Avaliar aumento da expressão de <i>AtAPx2</i> em folhas feridas.	Ferimento, excesso de luz, inibição do PET, H ₂ O ₂ , ABA, JA, quitosan, turgor de água, mutantes	Expressão de <i>AtAPx2</i> é regulada por PET, H ₂ O ₂ e ABA em plantas sob luz excessiva. Ferimento induz fracamente <i>AtAPx2</i> . Sinergismo do efeito de intensa luminosidade e ferimento na expressão de <i>AtAPx2</i> .	CHANG <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Avaliar o efeito regulatório do ferro na expressão de <i>cAPx1</i> .	Ferro	Ferro em excesso induz especificamente a expressão transcricional de <i>cAPx1</i> nas folhas, mas não na raiz. A expressão é dependente do primeiro íntron na região 5'-UTR.	FOURCROY <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Utilizando nocautes de genes, avaliar a função das isoformas <i>cAPx</i> e <i>sAPx</i> .	Moderada intensidade luminosa	Ausência de <i>APx1</i> citosólica resultou no colapso do sistema cloroplástico de decomposição de H ₂ O ₂ , aumento de H ₂ O ₂ , redução fotossintética e oxidação de proteínas. Em KO- <i>s/mAPx</i> foram vistos poucos danos. Papel central de APx citosólica na decomposição de ERO.	DAVLETOVA <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Avaliar o envolvimento de APx na modulação de H ₂ O ₂ durante a senescência.		A expressão transcricional de <i>pAPx4</i> e <i>tAPx</i> é reprimida na senescência. Os outros genes <i>APx</i> não são alterados.	PANCHUK <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Utilizando antisense de <i>tAPx</i> , avaliar fenótipo sobre condições normais e de estresse.	Paraquat e doador de NO	Plantas transgênicas com redução de 50% da atividade de <i>tAPx</i> são indistinguíveis das plantas NT em condições normais de crescimento. Apresentam maior sensibilidade ao tratamento com paraquat (formador de O ₂ ⁻) e NO.	TARANTINO <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Função de <i>pAPx3</i> em condições normais e estresse utilizando nocaute de <i>pAPx3</i> .	Baixas e altas temperaturas, estresse salino	Ausência de <i>pAPx3</i> não afetou o crescimento e desenvolvimento em condições normais e nos estresses aplicados.	NARENDRA <i>et al.</i> , 2006

Tabela 1. Continuação.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Estudar a regulação da expressão de <i>cAPx2</i> e determinar a regulação da via de resposta à alta luminosidade e a relação desta com a resposta ao estresse hídrico. Foi utilizado mutante com aumento de expressão de <i>cAPx2</i> .	Diferentes intensidades luminosas, estresse hídrico	Alta luminosidade induz a expressão transcricional de <i>cAPx1</i> e <i>cAPx2</i> e aumenta concentração de ABA. Mutante com superexpressão de <i>cAPx2</i> apresenta maior nível de ABA. ABA exógeno induz <i>cAPx2</i> que contém elemento responsivo ao ABA na sua região promotora. O mutante é mais tolerante à alta luminosidade e seca do que NT. Apresenta melhor eficiência na utilização de água e indução de genes envolvidos com tolerância à seca. <i>cAPx2</i> está envolvido em vias dependentes e independentes de ABA como pode ser confirmado pela indução de genes das duas vias no mutante.	ROSSEL <i>et al.</i> , 2006
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Determinar a função de <i>cAPx1</i> e <i>cAPx2</i> de arroz sob estresse salino transformando <i>Arabidopsis</i> com estes genes.	Estresse salino	Plantas transgênicas apresentaram maior tolerância ao sal. Plantas com <i>OsAPx2</i> mais tolerantes do que plantas com <i>OsAPx1</i> .	LU <i>et al.</i> , 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Estudar como os sinais de ERO oriundas de diferentes compartimentos subcelulares interagem. Mutante <i>cAPx1</i> e/ou <i>tAPx</i> .	Estresse induzido com paraquat, sorbitol, sal, intensidade luminosa, frio e calor.	Ausência de <i>tAPx</i> – tolerância ao calor. Ausência de <i>cAPx1</i> – plantas com crescimento deficiente e aumento da tolerância ao paraquat. Ausência de <i>tAPx</i> e <i>cAPx</i> – florescimento tardio, diminuição da oxidação protéica durante estresse luminoso e aumento do acúmulo de antocianinas.	MILLER <i>et al.</i> , 2007

Tabela 1. Continuação.

<i>Arabidopsis thaliana</i> e cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Estudo funcional de <i>HvAPx1</i> peroxissomal, avaliando o gene em cevada e o inserindo em <i>Arabidopsis</i> .	ABA, H ₂ O ₂ , estresse com calor e salino	<i>HvAPx1</i> é induzido em resposta ao calor, sal e ABA, o mesmo não ocorre com H ₂ O ₂ exógeno. Plantas transgênicas de <i>Arabidopsis</i> expressando <i>HvAPx1</i> apresentaram maior tolerância ao calor.	SHI <i>et al.</i> , 2001
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Examinar o efeito de uma exposição prévia a altas temperaturas na suscetibilidade de plântulas a baixas temperaturas.	Baixas e altas temperaturas	Plântulas tratadas com altas temperaturas previamente a estresse com baixas temperaturas mostraram-se mais tolerantes a esse último. A atividade de APx foi aumentada e de Cat diminuída no calor, SoD não sofreu alteração. Aumentou o acúmulo de mRNA de <i>APx1</i> com o calor. Identificado HSE na região promotora de <i>APx1</i> .	SATO <i>et al.</i> , 2001
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Padrão de expressão transcricional de <i>APx1</i> e <i>APx2</i> em diferentes estágios de desenvolvimento, folhas de diferentes idades, sob estresse biótico e abiótico e tratamento com moléculas sinalizadoras.	Ferimento, AS, etileno, ABA, JA, H ₂ O ₂ , cobre, inibidores de fosfatases e ataque de <i>Magnaporthe grisea</i> .	Com exceção do JA, ocorreu indução da expressão de mRNA de <i>APx1</i> e <i>APx2</i> em todos os tratamentos. Indução de <i>APx2</i> é mais potente e rápida que a de <i>APx1</i> . Expressão dependente do ciclo circadiano; influenciada pela luz.	AGRAWAL <i>et al.</i> , 2003
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Avaliar o comportamento do metabolismo antioxidante em resposta ao estresse salino.	Estresse salino	No estresse salino, plântulas de 11 dias apresentaram indução de <i>APx</i> , <i>CatB</i> , <i>GR</i> , <i>SoDCc1</i> e <i>SoDCc2</i> , enquanto <i>CatA</i> , <i>CatC</i> e <i>GPx</i> permaneceram inalteradas. Em plantas de 6 semanas, nessa mesma condição, foi observado aumento de mRNA de <i>CatB</i> , <i>GR</i> e <i>SodCc2</i> .	MENEZES-BENAVENTE <i>et al.</i> , 2004

Tabela 1. Continuação.

Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Estudar o padrão de expressão transcricional de cada isoforma de <i>Apx</i> em diferentes estágios de desenvolvimento, tecidos e sob estresse salino.	Estresse salino	Expressão transcricional diferencial entre as diferentes isoformas de <i>APx</i> .	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2006
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Comparar os efeitos do sal sobre alguns parâmetros fisiológicos, entre eles a atividade de enzimas antioxidantes em cultivares sensíveis e tolerantes.	Estresse salino	Cultivares tolerantes ao sal exibiram menor peroxidação lipídica, mantiveram nível de AsA reduzido elevado e maior atividade de enzimas antioxidantes do que cultivar sensível durante estágios de planta jovem e reprodutivo.	MORADI & ISMAIL, 2007
Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Avaliar o efeito da transformação de plantas com <i>CuZn SoD</i> e <i>APx</i> expressas no cloroplasto por promotor estresse-induzível.	MV e alta temperatura	Plantas transgênicas superexpressando <i>CuZn SoD</i> e <i>APx</i> no cloroplasto apresentaram maior tolerância aos estresses aplicados, com redução da taxa fotossintética menor do que em plantas NT.	TANG <i>et al.</i> , 2006
Batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	Após clonagem de <i>cAPx1</i> , investigar o seu padrão de expressão frente a diversos estresses ambientais.	Ferimento, frio, altas temperaturas, MV, H ₂ O ₂ , NaCl, ABA, AS, metil jasmonato, inoculação de <i>P. chrysanthemii</i>	<i>cAPx1</i> é expressa em células de cultura e em folhas maduras, mas não no caule e raiz de batata-doce. O acúmulo de mRNA aumentou com os dias de cultura de células. Nas folhas, a expressão foi diferencial em diferentes estresses abióticos, com exceção de NaCl. O gene foi intensamente induzido após inoculação de bactérias.	PARK <i>et al.</i> , 2004

Tabela 1. Continuação.

Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>)	Isolamento e caracterização de 4 isoformas de APx responsivas à seca, comparando expressão em folhas de cultivar tolerante e sensível à seca.	Seca progressiva, rápida dessecação e ABA exógeno	Atividade de APx total 60% superior na cultivar tolerante comparada com sensível. Rápida indução da <i>cAPx</i> e <i>pAPx</i> na cultivar sensível em resposta aos diferentes tratamentos. Prévia indução da expressão de <i>sAPx</i> e <i>tAPx</i> na cultivar tolerante em seca progressiva.	D'ARCY-LAMETA <i>et al.</i> , 2006
Ervilha (<i>Pisum sativum</i> L.)	Avaliar o efeito do cádmio no mecanismo antioxidante de ervilha.	Cádmio e moduladores de cascata de transdução de sinal	Níveis de antioxidantes e enzimas antioxidantes foram alterados com cádmio. GSH e AsA foram reduzidos. Não ocorreu alteração na atividade de APx e nem no acúmulo de transcritos correspondentes aos genes <i>APx</i> .	ROMERO-PUERTAS <i>et al.</i> , 2007
Espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>)	Estudo da resposta das isoformas de APx em espinafre frente a diferentes estresses abióticos.	Alta luminosidade, metilviologênio (MV), seca e estresse salino	Os níveis de transcritos de <i>cAPx</i> elevam-se com alta luminosidade e MV, mas não são alterados em estresse hídrico e salino. Aumenta a atividade de <i>cAPx</i> em resposta a alta luminosidade. Entretanto, não ocorre alteração dos níveis protéicos de <i>cAPx</i> nesta condição. Os níveis de <i>pAPx</i> , <i>sAPx</i> e <i>tAPx</i> não são alterados por nenhum dos estresses aplicados. Em alta luminosidade, níveis de transcritos e de proteína de APx cloroplásticas não são alterados, mas a atividade das isoformas cloroplásticas é reduzida.	YOSHIMURA <i>et al.</i> , 2000
<i>Euglena gracilis</i>	Investigar o efeito do Fe na indução da <i>APx</i> em células de <i>Euglena</i> deficientes em Fe e sem atividade de APx.	Ferro	Rápido aumento da atividade de APx nas primeiras 3 horas (ativação de apo-proteínas) e lento aumento nas próximas 24h (síntese <i>de novo</i> dependente de heme). Indução de APx por Fe é pós-transcricional. Nível de transcritos permanece constante.	ISHIKAWA <i>et al.</i> , 2003

Tabela 1. Continuação.

<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	Capacidade de reduzir o estresse oxidativo pela superexpressão de <i>CuZn SoD</i> e <i>APx</i> utilizando promotor estresse-induzível e direcionamento para o cloroplasto.	Estresses induzidos por MV, H ₂ O ₂ , cobre, cádmio e arsênico.	Plantas transgênicas apresentaram maior tolerância. Plantas transgênicas com menor nível de TBARS, dissipação de íons e degradação de clorofila sob estresse.	LEE <i>et al.</i> , 2007b
<i>Lupinus luteus</i> L.	Avaliar a resposta do ciclo ascorbato-glutationa à hipóxia seguida de re-aeração em raiz de “lupine”	Hipóxia seguida de re-aeração	Aumento de AsA e redução de GSH imediatamente após hipóxia. Com a re-aeração ocorreu oxidação das 2 formas. MDAR e DHAR não sofreram alteração, atividade de APx e GR aumentou com re-aeração. <i>APx5</i> deixou de ser expressa após hipóxia.	GARNCZRSKA, 2005
Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.)	Estudar a resposta de APx e de enzimas regenerantes de AsA em folhas de pepino sob estresse com calor, MV e H ₂ O ₂ .	MV, calor e H ₂ O ₂	As atividades de <i>cAPx</i> , <i>sAPx</i> , <i>pAPx</i> aumentaram após leve declínio no início dos tratamentos. A expressão de <i>cAPx</i> apresentou efeito similar, indicando regulação transcricional deste gene. Expressão constitutiva foi observada em relação à atividade de <i>tAPx</i> . Aumento de MDAR e GR foi acompanhado pelos níveis elevados de AsA/DHA.	SONG <i>et al.</i> , 2005
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar a participação da <i>cAPx</i> na apoptose induzida por patógeno.	Infecção pelo vírus do mosaico do tabaco	Apesar de ocorrer a indução de <i>cAPx</i> em nível transcricional durante apoptose, a tradução do mRNA é inibida, não ocorrendo acúmulo da proteína <i>cAPx</i> na resposta de hipersensibilidade.	MITTLER <i>et al.</i> , 1998

Tabela 1. Continuação.

Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar a função de <i>cAPx</i> e <i>Cat</i> utilizando antisenso duplo <i>APx/Cat</i> e o comparando com plantas NT, antisenso de <i>cAPx</i> e antisenso de <i>Cat</i> .	Diferentes intensidades luminosas, paraquat, infecção por patógeno	Plantas duplo antisenso comparadas com plantas antisenso individuais apresentaram suscetibilidade reduzida ao estresse oxidativo, com supressão da atividade fotossintética, indução de genes pertencentes à via da pentose fosfato, indução transcricional de MDAR e de IMMUTANS.	RIZHSKY <i>et al.</i> , 2002
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar a importância fisiológica da <i>tAPx</i> ligada à membrana no sistema de detoxificação de ERO do cloroplasto por meio de expressão do cDNA de <i>tAPx</i> no sentido senso e antisenso.	MV e alta luminosidade; baixas temperaturas e alta luminosidade	Não foi possível obter plantas expressando o cDNA de <i>tAPx</i> no sentido antisenso. Plantas com atividade de <i>tAPx</i> 37 vezes superior a atividade de plantas NT apresentaram aumento da tolerância aos estresses oxidativos aplicados.	YABUTA <i>et al.</i> , 2002
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar se a superexpressão de <i>cAPx</i> no cloroplasto seria capaz de aumentar a tolerância da planta a estresses múltiplos.	MV, paraquat, sal, seca e PEG	Plantas transgênicas com atividade de <i>APx</i> aumentada apresentaram maior tolerância aos estresses aplicados.	BADAWI <i>et al.</i> , 2004
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar mecanismos de morte celular mediada por estresse abiótico.	Altas temperaturas	Entre outras análises, foi detectada a redução do acúmulo de mRNA e de proteínas de <i>cAPx</i> . A atividade de <i>cAPx</i> também foi reduzida.	VACCA <i>et al.</i> , 2004
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar importância da <i>cAPx</i> no equilíbrio redox utilizando mutantes com redução de 50 e 75% da atividade de <i>APx</i> .	Estresse salino e altas temperaturas.	Aumento dos níveis de ERO nas células BY-2 com redução de <i>cAPx</i> . Não ocorreu diferença na atividade de outras enzimas antioxidantes. Células mutantes apresentaram maior tolerância ao estresse salino e a altas temperaturas. Indução de genes relacionados com estresse nos mutantes.	ISHIKAWA <i>et al.</i> , 2005

Tabela 1. Continuação.

Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Avaliar o efeito do tempo e da intensidade do estresse oxidativo na indução de apoptose e necrose.	H ₂ O ₂ exógeno e indução de formação de H ₂ O ₂ endógeno	Intensidade e tempo de exposição ao estresse oxidativo é fundamental para determinar entre apoptose (indução de <i>APx</i>) ou necrose (expressão de <i>APx</i> não é alterada).	DE PINTO <i>et al.</i> , 2006
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Estudar o efeito do estresse oxidativo em plantas transgênicas expressando simultaneamente <i>CuZn SoD</i> , <i>APx</i> e <i>DHAR</i> no cloroplasto.	Estresse salino e paraquat	Plantas transgênicas com inserção de <i>CuZn SoD</i> , <i>APx</i> e <i>DHAR</i> direcionados ao cloroplasto apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo.	LEE <i>et al.</i> , 2007a
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Avaliar a expressão de <i>pAPx</i> de trigo em estresse biótico.	Inoculado <i>Erysiphe graminis</i> Dc.f.sp. <i>tritici</i>	Após inoculação, a expressão de <i>pAPx</i> aumenta na cultivar suscetível e pouco altera na cultivar resistente.	CHEN <i>et al.</i> , 2006
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Avaliar o efeito da citocinina sobre Cat e APx na senescência.	Citocinina e escuro	Citocinina aumentou a atividade de Cat e APx e reduziu os níveis de H ₂ O ₂ nos tecidos que apresentaram senescência tardia.	ZAVALETA-MANCERA <i>et al.</i> , 2007

ABA- ácido abscísico; APx- ascorbato peroxidase; AS- ácido salicílico; AsA- ascorbato reduzido; cAPx- APx citosólica; Cat- catalase; cDNA- DNA complementar; CuZn SOD- Superóxido dismutase cobre-zinco; DHA- dehidroascorbato; DHAR- dehidroascorbato redutase; ERO- espécies reativas de oxigênio; Fe- ferro; GPx- glutathione peroxidase; GR- glutathione reductase; GSH- glutathione reduzida; HSE- elemento responsivo ao choque térmico; JA- ácido jasmônico; KO- s/mAPx- nocaute no gene APx do estroma cloroplástica/ mitocondrial; MDAR- monodehidroascorbato redutase; mRNA- RNA mensageiro; MV- Metilviologênio; NO- óxido nítrico; NT- plantas não-transformadas; pAPx- APx peroxissomal; PEG- polietilenoglicol; PET- transporte de elétron fotossintético; sAPx- APx do estroma cloroplástico; SoD- Superóxido dismutase; tAPx- APx do tilacóide cloroplástico; TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; UTR- região não-transcrita.

O modelo vegetal

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à família das gramíneas, na qual estão incluídos milho, trigo, cevada e cana-de-açúcar. Estes cereais fornecem a principal base da alimentação mundial, inclusive da alimentação animal.

O arroz é caracterizado como uma planta modelo entre as monocotiledôneas. O genoma do arroz de 390 mega bases (Mb) (dado divulgado por C. ROBIN BUELL no “Plant Genome Annotation Workshop” em maio de 2007) é relativamente pequeno comparado com outros cereais. Os genomas do milho, cevada e trigo são estimados em 3000, 5000 e 16000 Mb, respectivamente. Apresentar o menor genoma entre os cereais cultivados foi decisivo para o genoma do arroz ser completamente seqüenciado. A seqüência do genoma do arroz foi publicada pela primeira vez em 2002, contendo muitas lacunas e erros (YU *et al.*, 2002; GOFF *et al.*, 2002). Dois grupos de pesquisadores independentes, um público e um privado, foram responsáveis pelo seqüenciamento do genoma do arroz das duas subespécies mais cultivadas, *indica* e *japonica*. As informações genômicas resultantes, disponíveis para a comunidade científica internacional, têm permitido o desenvolvimento do conhecimento em diversas áreas, como em genômica, proteômica, metabolômica e melhoramento de cereais.

Seqüências expressas do arroz têm sido ativamente identificadas. Mais de 1,1 milhão de fragmentos de seqüências expressas em mRNA (EST) e seqüências completas de DNA complementar (FL-cDNA) foram depositadas em bancos de dados (dado divulgado por C. ROBIN BUELL no “Plant Genome Annotation Workshop” em maio de 2007). Essas seqüências transcritas derivam de diversos tecidos, diferentes épocas de desenvolvimento e estresses bióticos e abióticos aos quais a planta é submetida. A presença destas seqüências têm conduzido à identificação e à descoberta de novos e importantes genes vegetais.

Em 2007, uma anotação acurada do genoma de *Oryza sativa* L. *ssp. japonica* foi publicada, sugerindo que o número de genes em arroz é aproximadamente 32.000. Foram identificadas linhagens de mutantes insercionais interrompendo um total de 5000 genes codificantes de proteínas, o que acelera a validação experimental das anotações e a caracterização funcional de genes responsáveis por importantes características (HIROCHIKA *et al.*, 2004; The Rice Annotation Project, 2007).

Foram desenvolvidas várias ferramentas que reforçam o papel do arroz como uma planta modelo: i) mapa genético saturado (Internacional Rice Genome Sequencing

Project, 2005; HARUSHIMA *et al.*, 1998) e, ii) técnica eficiente de transformação genética (HIEI *et al.*, 1994). Além disso, mapas genéticos comparativos entre a família de gramíneas revelou regiões extensas de conteúdo gênico conservado e ordenado, ou seja, a existência de intensa sintenia entre as gramíneas (MOORE *et al.*, 1995). Desta forma, a identificação e o estudo de genes de arroz podem fornecer informações válidas na investigação de características e regiões genômicas entre as gramíneas, o que pode resultar em melhoramento agrônomico destas espécies (BENNETZEN, 2002). Desta forma, o arroz é um organismo ímpar para o estudo da fisiologia, biologia do desenvolvimento, genética e evolução de plantas.

2. JUSTIFICATIVA

“...Nenhuma outra atividade econômica alimenta tantas pessoas, sustenta tantas famílias, e é tão crucial para o desenvolvimento de tantas nações e apresenta mais impacto sobre o nosso meio ambiente. A produção de arroz alimenta quase a metade do planeta todos os dias, fornece a maior parte da renda principal para milhões de habitações rurais pobres, pode derrubar governos e cobre 11% da terra arável do planeta.” (Ronald Cantrell – Diretor Geral do International Rice Research Institute em EMBRAPA, 2005).

Diante da dissertação de Ronald Cantrell, tem-se noção do papel estratégico do arroz tanto no aspecto econômico quanto social. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas. No Brasil, o consumo médio varia entre 74 a 76 Kg/habitante/ano, sendo o arroz o principal alimento da cesta básica dos brasileiros (EMBRAPA, 2005).

O arroz contém todos os aminoácidos essenciais, exceto lisina, sendo um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional. Pelas suas características nutricionais e pela sua capacidade de adaptação a diferentes condições de solo e clima, o arroz é considerado a espécie que apresenta maior potencial para combater a fome no mundo (EMBRAPA, 2005).

Em 2005, o Brasil produziu cerca de 13 milhões de toneladas de arroz numa área colhida de aproximadamente 4 mil hectares (Ministério da Agricultura, 2005). A produção mundial de arroz não tem acompanhado o crescimento do seu consumo. O crescimento da população exige produção maior e de melhor qualidade. Entretanto, a degradação ambiental e a redução de áreas aráveis e de água para a plantação vêm prejudicando a produção do cereal (PENG *et al.*, 2004).

As condições ambientais (frio, calor, seca, salinidade) e doenças causadas por patógenos reduzem o rendimento dos cereais. As principais limitações da produção nacional de arroz são salinidade, toxidez ao alumínio e seca, juntamente com pestes e patógenos. As plantas raramente são afetadas por apenas um fator de estresse. Infecções por patógenos em plantas no campo são geralmente acompanhadas de vários estresses ambientais adicionais, como déficit hídrico e mineral (KOTCHONI & GACHOMO, 2006).

Muitos esforços têm sido feitos visando a obtenção de plantas com maior tolerância a estresses bióticos e abióticos. Devido à interação entre os diferentes

estresses, busca-se a descoberta de genes capazes de atuar em vias múltiplas de resposta a estresses.

As adversidades bióticas e abióticas, às quais as plantas são submetidas no campo, resultam no aumento das ERO, conduzindo à situação de estresse oxidativo. O acúmulo de ERO pode acarretar diversos danos à célula, resultando em diminuição da produção dos cereais. Diversos estudos têm demonstrado que a alteração dos mecanismos antioxidantes está correlacionada com a capacidade de defesa a diferentes estresses. D'Arcy-Lameta e colaboradores (2006) demonstraram que uma cultivar de caupi (*Vigna unguiculata*) tolerante à seca apresenta atividade de APx 60% maior do que uma cultivar sensível. Uma planta de tabaco expressando um antisenso duplo para *cAPx* e *Cat* possui maior sensibilidade a estresses bióticos e abióticos (RIZHISKY *et al.*, 2002). A superexpressão de *cAPx* no cloroplasto de tabaco resultou em uma maior tolerância a diversos estresses bióticos (BADAWI *et al.*, 2004). Outros estudos envolvendo os mecanismos antioxidantes estão relatados na Tabela 1. O conjunto desses resultados revelou que os genes envolvidos no metabolismo antioxidante são alvos interessantes para o melhoramento genético de plantas para características agronômicas, tais como maior produção e menores perdas causadas por condições climáticas desfavoráveis.

A APx é uma enzima chave no metabolismo antioxidante. Controlando os níveis de ERO, a APx é capaz de evitar danos celulares indesejáveis e regular vias de transdução de sinal relacionadas à defesa da planta. Em diversas plantas já analisadas, a APx é codificada por uma família gênica, como já descrito anteriormente. O arroz apresenta oito genes codificantes de APx (TEIXEIRA *et al.*, 2006). É possível que as diferentes isoformas de APx possuam funções distintas, podendo atuar de forma complementar. Apesar do grande número de estudos relacionados com a expressão de diferentes isoformas de APx, a função de cada gene ainda não foi decifrada. Pouco é conhecido sobre as isoformas de APx em arroz.

Uma análise do padrão de expressão de cada gene APx de arroz, submetido a diferentes estresses abióticos, poderá permitir o aprimoramento do conhecimento do complexo mecanismo antioxidante. O estudo de plantas com alteração na expressão de cada gene pode complementar este conhecimento. O entendimento do mecanismo pelo qual cada compartimento celular mantém as ERO em concentrações ideais ao desenvolvimento e a interação entre os diversos compartimentos poderá permitir, no futuro, a manipulação desses genes visando aumentar a tolerância de cereais contra estresses bióticos e abióticos.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar funcionalmente as isoformas citosólicas e peroxissomais de APx no arroz, com o intuito de verificar a importância destas peroxidases no controle dos níveis intracelulares de ERO em condições normais e na resposta ao estresse ambiental.

Uma vez que o H₂O₂ é uma molécula sinalizadora de diversas vias metabólicas, hipotiza-se que as isoformas de APx sejam fundamentais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas de arroz em condições ideais de crescimento. O silenciamento pós-transcricional via RNA de interferência (RNAi), combinado com avaliação do padrão de expressão de transcritos e análises fenotípicas, foram utilizados para avaliar o papel das diferentes isoformas citosólicas e peroxissomais de APx, assim como a função exercida por cada compartimento intracelular na manutenção dos níveis de ERO.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Obter plantas silenciadas via RNAi para os genes das APx citosólicas e peroxissomais: utilizar construções RNAi visando o silenciamento individual dos genes citosólicos (*OsAPx1s* e *OsAPx2s*) e peroxissomais (*OsAPx3s* e *OsAPx4s*) e o silenciamento de ambos genes codificantes de APx de uma mesma localização subcelular (*OsAPx1/2s* e *OsAPx3/4s*);
2. Analisar a expressão relativa dos transcritos dos genes-alvo por PCR em Tempo Real em condições ideais de desenvolvimento;
3. Analisar fenotipicamente as plantas silenciadas e não-transformadas (NT) crescidas em condições normais e submetidas a estresses abióticos.
4. Avaliar por PCR em Tempo Real o padrão de expressão relativa dos transcritos da família de genes APx em plantas silenciadas e não-transformadas crescidas em condições ideais e submetidas a estresses abióticos.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

As ERO estão envolvidas em mecanismos de morte celular e de defesa da planta. Estas espécies são essenciais durante condições ideais de desenvolvimento, assim como em situações de estresse. O complexo mecanismo antioxidante desenvolvido pelos vegetais reflete a importância da regulação fina da concentração intracelular das ERO. As enzimas antioxidantes geralmente são codificadas por famílias multigênicas. Isoformas são direcionadas a diferentes compartimentos subcelulares e, algumas vezes, mais de uma isoforma encontra-se numa mesma localização dentro da célula. Além disso, as enzimas antioxidantes apresentam aparentemente funções redundantes, como é o caso da Cat e da APx, que decompõem H_2O_2 em água. A diferença de especificidade e de localização subcelular determina funções diferentes para estas enzimas. A APx parece ser responsável pela regulação fina dos níveis de H_2O_2 . O papel crucial das ERO, principalmente sua participação em mecanismos de defesa, torna os mecanismos antioxidantes alvos importantes de pesquisa.

O controle da expressão gênica é um dos mecanismos regulatórios chave usados pelas células para a execução perfeita das funções biológicas. Elucidar a expressão gênica permite desvendar a função de genes. A genética reversa tem sido amplamente utilizada visando a determinação da função gênica. A manipulação da expressão das enzimas envolvidas no sistema de detoxificação das ERO tem se mostrado ferramenta útil para o melhor entendimento do efeito destas moléculas e dos mecanismos antioxidantes.

A estratégia experimental utilizada para caracterizar funcionalmente os genes citosólicos e peroxissomais de APx e também determinar a função destes dois compartimentos celulares nos mecanismos antioxidantes foi o silenciamento pós-transcricional por RNAi (TANG *et al.*, 2003; WATERHOUSE & HELLIWELL, 2003) dos genes isolados e de ambos os genes de um mesmo compartimento subcelular.

O silenciamento pós-transcricional por RNAi ou silenciamento de genes induzidos por RNA é baseado na presença de RNA fita-dupla (dsRNA) que induz a degradação de seqüência específica de RNA, o que conseqüentemente leva ao silenciamento efetivo do gene marcado. Quando RNA viral (que produz dsRNA durante sua replicação), estrutura em grampo de RNA fita simples por complementariedade de bases ou dsRNA são introduzidos em uma planta, estas formas de RNA são reconhecidas como estranhas pela célula, mais precisamente pela proteína Dicer. A Dicer apresenta a capacidade de

degradar estas formas de RNA dupla-fita em fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídeos, conhecidos como pequenos RNAs de interferência (siRNA), mantendo-os na forma de dsRNA. Estes fragmentos siRNA são incorporados em um complexo protéico contendo endonucleases, denominado de complexo de silenciamento de RNAi (RISC). O RISC utiliza os siRNA como guias para identificar e degradar mRNAs complementares aos siRNA. Desta forma, mRNA endógenos homólogos são degradados, resultando na redução do acúmulo de transcritos do gene alvo (TANG *et al.*, 2003; WATERHOUSE & HELLIWELL, 2003).

Objetivando o silenciamento pós-transcricional por RNAi, foram selecionadas *in silico* regiões específicas dos genes *cAPx1*, *cAPx2*, *pAPx3* e *pAPx4* para o silenciamento individual de cada gene. Para o silenciamento simultâneo dos genes de uma mesma localização subcelular, foi utilizada uma seqüência conservada entre os 2 genes alvos, mas não conservadas nos outros genes da família de *APx*. As seqüências utilizadas foram incorporadas por recombinação no vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004; MIKI *et al.*, 2005), utilizando a Tecnologia GatewayTM (Invitrogen). A seqüência foi introduzida no vetor pANDA nos sentidos senso e antisenso, o que gera um estrutura em grampo desta seqüência, resultando no silenciamento do gene alvo. Plantas de arroz foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* (Upadhyaya *et al.*, 2000) contendo as construções RNAi.

Reduzindo-se a expressão dos transcritos dos genes de *APx* pretendeu-se avaliar a importância de cada uma das isoformas no desenvolvimento da planta em diversas condições de crescimento.

O nível de H₂O₂ em situações de estresse deve ser controlado finamente para resposta adequada da planta. Frente à importância do H₂O₂ em situações de estresse abiótico, as plantas silenciadas foram desafiadas a condições críticas de crescimento. As plantas foram submetidas a estresse induzido por alta intensidade de luz UV-B, luz germicida e altas concentrações de alumínio.

A toxicidade por alumínio é um dos principais fatores que limitam o crescimento e o desenvolvimento de plantas em solos ácidos, que compreendem mais de 40% do total de solos aráveis nos trópicos e subtropicais. A toxicidade por alumínio provoca aumento dos níveis de ERO e alteração das enzimas antioxidantes. A resposta de *APx* é dependente da concentração de alumínio tóxico ao qual a planta é submetida (ACHARY *et al.*, 2007; SHARMA & DUBEY, 2007). A diminuição da camada de ozônio tem causado aumento da radiação UV-B (280 – 320nm) na superfície da terra, provocando

intensificação dos danos celulares e afetando o metabolismo da planta. Além dos danos diretos ao DNA, UV-B provoca estresse oxidativo através da formação de ERO, que, por sua vez, conduzem à oxidação lipídica e protéica. A radiação UV-B afeta o ciclo da ascorbato-glutationa. A *APx* responde diferentemente dependendo do tempo de exposição à radiação UV e da etapa de desenvolvimento da planta (RAO *et al.*, 1996; ALEXIEVA *et al.*, 2001; JOVANOVIC *et al.*, 2006; GAO & ZHANG, 2007).

Analisando as plantas tanto em condições ideais como de estresse, pretendeu-se obter dados mais abrangentes sobre o papel das isoformas citosólicas e peroxissomais de *APx* e de suas relações com a rede de mecanismos antioxidantes vegetais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Construção dos vetores visando o silenciamento gênico

A estratégia utilizada para caracterizar funcionalmente os genes codificantes de APx citosólicas e peroxissomais foi o silenciamento por RNAi. O primeiro passo foi determinar a melhor seqüência para a construção do mRNA com estrutura em grampo para cada gene a ter sua expressão transcricional reduzida.

Realizando análises *in silico*, regiões específicas de aproximadamente 250 pb da região transcrita dos genes *APx1* (número de acesso NCBI D45423), *APx2* (número de acesso NCBI AB053297), *APx3* (número de acesso NCBI AY382617) e *APx4* (número de acesso NCBI AB114856.1) foram escolhidas para o silenciamento individual de cada gene (Apêndice 1). Objetivando obter a redução da expressão de ambos genes codificantes de isoenzimas de mesma localização subcelular, buscou-se regiões conservadas entre os genes *APx1* e *APx2* e entre os genes *APx3* e *APx4*. Para o silenciamento simultâneo das isoformas citosólicas, uma região de 250 pb do gene *APx2* foi utilizada. O gene *APx1* apresenta 26 nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *APx2* escolhida, o que levaria o seu silenciamento pós-transcricional. Uma região do gene *APx4* foi utilizada para o silenciamento simultâneo de ambos genes codificantes de APx peroxissomais. O gene *APx3* apresenta 19 nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *APx4*. As regiões escolhidas para o silenciamento dos genes-alvo, apresentam no máximo 14 nucleotídeos contínuos idênticos nos outros genes da família de APx, o que teoricamente evita o silenciamento pós-transcricional por RNAi destes genes. Devido à grande similaridade entre os genes *APx1* e *APx2*, a melhor seqüência para o silenciamento individual de cada gene apresenta 20 nucleotídeos contínuos idênticos no outro gene. Maiores detalhes das seqüências utilizadas encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Similaridade entre as seqüências *OsAPx* das construções RNAi e os demais genes *OsAPx*.

Construções RNAi	<i>OsAPx1</i>	<i>OsAPx2</i>	<i>OsAPx3</i>	<i>OsAPx4</i>	<i>OsAPx5</i>	<i>OsAPx6</i>	<i>OsAPx7</i>	<i>OsAPx8</i>
<i>OsAPx1s</i> (309 nt)	100%	15% (20 nt)	8% (9 nt)	9% (6 nt)	6% (7 nt)	4% (5 nt)	6% (5 nt)	7% (6 nt)
<i>OsAPx2s</i> (225 nt)	53% (20 nt)	100%	35% (6 nt)	37% (8 nt)	29% (7 nt)	18% (4 nt)	27% (7 nt)	22% (8 nt)
<i>OsAPx3s</i> (255 nt)	58% (11 nt)	58% (11 nt)	100%	70% (14 nt)	50% (12 nt)	40% (11 nt)	45% (8 nt)	47% (6 nt)
<i>OsAPx4s</i> (245 nt)	32% (6 nt)	34% (8 nt)	63% (14 nt)	100%	25% (6 nt)	21% (6 nt)	22% (5 nt)	28% (12 nt)
<i>OsAPx1/2s</i> (250 nt)	82% (26 nt)	100% (250 nt)	61% (9 nt)	60% (14 nt)	55% (9 nt)	57% (8 nt)	62% (9 nt)	58% (12 nt)
<i>OsAPx3/4s</i> (249 nt)	67% (11 nt)	67% (9 nt)	78% (19 nt)	100% (249 nt)	60% (11 nt)	57% (11 nt)	60% (9 nt)	62% (10 nt)

Entre parênteses encontram-se os números de nucleotídeos compartilhados em seqüência contígua entre cada um dos genes de *OsAPx* e a seqüência alvo do RNAi.

Iniciadores específicos às seqüências escolhidas foram utilizados para obtenção de produtos amplificados por PCR. O produto do PCR foi então clonado no vetor Gateway pDONOR ou pENTR, o qual, em seguida, foi recombinado no vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004) (Figura 3). O produto de PCR foi incorporado por recombinação no vetor no sentido senso e antisenso, cuja transcrição leva a formação de estrutura em grampo. Neste vetor, a transcrição da seqüência introduzida é regulada pelo promotor ubiquitina (UBI) de milho. Entre o promotor e as seqüências introduzidas, está presente um íntron, para aumentar a expressão do RNA. Uma seqüência do gene β -glucuronidase (*Gus*) encontra-se entre as 2 regiões inseridas. O vetor pANDA apresenta terminador NOS. Os genes de seleção presentes no vetor são o gene de resistência à higromicina (*Hpt*) e o gene de resistência à canamicina (*NptII*). O trabalho de obtenção e recombinação das construções RNAi foi desenvolvido pelo pesquisador Felipe Teixeira.

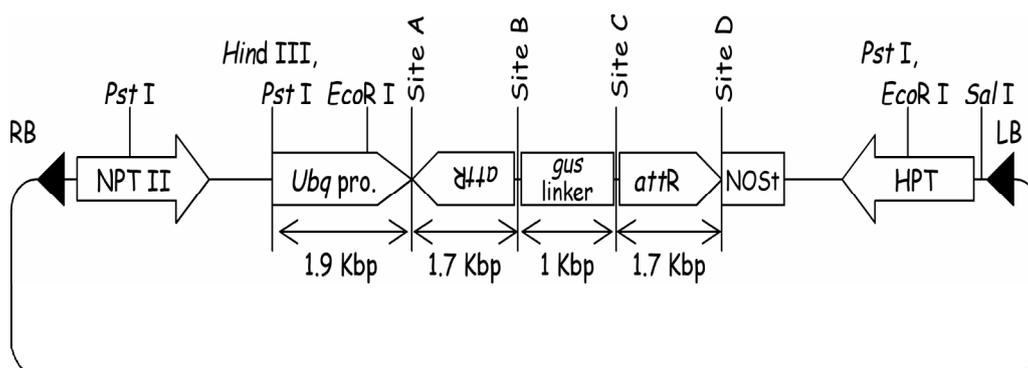


Figura 3. Vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004).

Transformação de *Escherichia coli*

Após a obtenção do vetor pANDA com as seqüências específicas para o silenciamento pós-transcricional, foi feita a clonagem do vetor em *Escherichia coli XL1 blue* competente. As bactérias competentes para eletroporação foram preparadas seguindo o protocolo descrito a seguir. Uma pré-cultura foi preparada inoculando a bactéria em 50 mL de meio de cultura Luria-Broth (LB) líquido e mantendo a mesma sob agitação constante de 225 rpm, a 37° C por 16 horas. Diluiu-se 10 mL da pré-cultura em 1 litro de

LB líquido e esta foi mantida sob agitação nas mesmas condições anteriores até a cultura atingir densidade ótica de 0,5-0,8 a 600 nm. A cultura foi resfriada no gelo por 30 minutos e, a seguir, centrifugada a 4000 g por 15 minutos, a 4° C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado contendo as células concentradas foi ressuspensionado em 1 litro de água destilada a 4° C. A centrifugação foi repetida e a lavagem das células com água destilada foi realizada com 500 mL. A mistura foi centrifugada novamente a 4000 g por 15 minutos, a 4° C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi então ressuspensionado em 3 mL de glicerol 10 % a 4° C, dividido em alíquotas de 80 µL e armazenado em nitrogênio líquido. Durante a manipulação, as amostras foram conservadas no gelo.

Para a transformação de *E. coli* por eletroporação, um volume entre 1 e 1,5 µL de DNA recombinado foi homogeneizado com 40 µL de bactéria competente e eletroporado na voltagem de 2,500 V. Após a eletroporação, 250 µL de LB líquido foram acrescentados à cubeta de eletroporação. O material foi então transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e mantido a 37° C por 1 hora. Volumes de 50 e 240 µL do meio de cultura contendo as bactérias foram plaqueados em duas placas com meio LB sólido contendo canamicina (25 µg/mL) para seleção de bactérias transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 37° C por 24 horas. As colônias de bactérias que cresceram no meio contendo canamicina foram selecionadas e realizado o protocolo de Miniprep (ver o protocolo a seguir). A transformação das colônias de bactérias selecionadas foi confirmada por PCR utilizando os iniciadores específicos da construção RNAi.

Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

As células *A. tumefaciens* foram transformadas por choque térmico. O primeiro passo da transformação foi a obtenção de células competentes. Essas células foram produzidas inoculando *A. tumefaciens* AGL1 em 4 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de rifampicina. Esta pré-cultura foi mantida a 28° C sob agitação constante de 225 rpm por 1 a 2 dias. Volume de 500 µL da pré-cultura foi inoculado em 50 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de rifampicina. A cultura foi mantida a 28° C sob agitação constante por 1 dia (densidade ótica de 0,5 à 600 nm). A mistura foi então centrifugada a 5000 g, por 5 minutos a 4° C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL

de LB líquido. Alíquotas de 200 µL foram armazenadas em Nitrogênio líquido e descongeladas somente no momento da transformação.

Para a transformação de *A. tumefaciens* por choque térmico, 1 µg de DNA plasmidial foi homogeneizado a 200 µL de células de *A. tumefaciens* competentes. Após congelamento por 5 minutos em N₂ líquido, a mistura foi incubada a 37° C por 25 minutos. A seguir, as células foram transferidas para um novo tubo contendo 1 mL de LB líquido e incubadas a 28° C por 1 hora sem agitação e por mais 2 horas sob agitação constante. As células foram concentradas centrifugando-as por 3 minutos a 13000 g. O precipitado de células foi ressuscitado em 500 µL de LB líquido. As bactérias em cultura líquida foram plaqueadas em LB sólido contendo 25 µg/mL de canamicina, 100 µg/mL de rifampicina. As placas foram mantidas a 28° C por 2 dias.

Após a obtenção de colônias isoladas, foi extraído DNA plasmidial. Assim como na transformação de *E. coli*, a transformação de *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR utilizando iniciadores específicos da seqüência introduzida no vetor pANDA.

Transformação de *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cultivar Nipponbare

A transformação de *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cultivar Nipponbare foi mediada por *A. tumefaciens* segundo protocolo descrito por UPADHYAYA *et al.*, 2000. A seguir está descrito o protocolo utilizado. Os meios de cultura estão detalhados no Apêndice 2.

A indução de calos de arroz foi feita removendo-se a casca da semente e a esterilizando com etanol 70% (1 minuto), lavagem com água esterilizada por 3 vezes e então lavagem com hipoclorito de sódio (1,25 – 2,5%) por 30 minutos. Seguiu-se nova lavagem com água em condições assépticas. As sementes foram plaqueadas em meio N6D e mantidas na luz a 28° C por 6 a 8 semanas até a produção de calos.

Os calos produzidos foram transferidos para placas contendo meio NB e mantidos no escuro a 28° C. Os calos foram repicados a cada 4 semanas. Para transformação, foram utilizados calos com no máximo 3 repicagens.

A transformação dos calos por *A. tumefaciens* seguiu os seguintes passos:

- 1) Cerca de 30 calos saudáveis foram transferidos para nova placa de NB (2 placas de NB foram utilizadas por transformação).
- 2) No terceiro dia do passo 1, duas placas de *A. tumefaciens* contendo a construção foram repicadas em placas de meio LB contendo rifampicina (100 µg/mL) e canamicina (25 µg/mL) e mantidas a 28° C.
- 3) Após o segundo dia do passo 2, as bactérias foram transferidas para 50 µL NB líquido suplementado com 100 µM de acetoseringona. Os calos do passo 1 foram adicionados ao meio contendo bactérias e acetoseringona.
- 4) Após incubação de 10 minutos, o meio líquido foi descartado e os calos foram então transferidos para placas contendo meio NB sólido com 100 µM de acetoseringona (NBA). As placas foram mantidas no escuro a 28° C por 3 dias.
- 5) Após o co-cultivo, os calos foram lavados com 50 mL de água destilada autoclavada contendo timentina (150 µg/mL). Foram realizadas 3 a 4 lavagens por 10 a 15 minutos em agitação constante.
- 6) Quando a solução contendo os calos ficou límpida, os calos, inicialmente passados para placa com papel filtro estéril, foram transferidos para placa NB-HTC, meio que contém higromicina (50 µg/mL), timentina (150 µg/mL) e cefotaxima (200 µg/mL) (visando a seleção dos calos transformados resistentes à higromicina e a eliminação de bactérias restantes). As placas foram incubadas no escuro por 30 dias a 28°C.
- 7) Novos calos resistentes foram então selecionados para nova placa de NB-HTC, tendo-se o cuidado de transferir apenas 1 calo de cada evento. A placa foi mantida a 28° C no escuro.
- 8) Após cerca de 3 semanas, os calos transformados resistentes à higromicina que cresceram no meio NB-HTC foram novamente transferidos para nova placa, eliminando-se os calos não resistentes.
- 9) Após proliferação, os calos foram transferidos para meio de pré-regeneração. Mantidos por 8 a 10 dias no escuro a 28° C. O mesmo foi feito com calos não-transformados para obtenção de plantas não-transformadas (controles).
- 10) Após a incubação no meio de pré-regeneração, os calos foram transferidos para meio de regeneração e mantidos na luz a 28° C.

- 11) A partir de 20 dias, os calos transformados regeneraram plantas. Plantas com raiz e parte aérea adequadas foram transferidas para meio MS $\frac{1}{2}$ contendo higromicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este foi um passo adicional de seleção. Os calos não-transformados foram transferidos para meio MS $\frac{1}{2}$ na ausência de higromicina. As plantas foram mantidas na luz a 28° C.
- 12) Após no mínimo 14 dias no meio MS $\frac{1}{2}$ com higromicina, as plantas resistentes foram transferidas para vermiculita contendo solução nutritiva (soluções concentradas de A-G conforme Apêndice 2.4) ou foram diretamente transferidas para o solo. As plantas na vermiculita foram transferidas para o solo após cerca de 3 semanas. Inicialmente, as plantas foram mantidas fechadas com plástico para aclimação e aos pouco este foi sendo removido.
- 13) As plantas em vasos foram mantidas a 28° C em fotoperíodo de 12 horas de luz, submergidas em água. A cada 2 semanas, era adicionado fertilizante à água de submersão.

Minipreparação de DNA plasmidial (Miniprep)

Após a construção do vetor RNAi em *E. coli* e da transformação de *A. tumefaciens*, colônias isoladas de bactérias foram selecionadas e lançadas em 4mL de meio de cultura LB líquido contendo canamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Quando se cultivava *A. tumefaciens*, rifampicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) era também adicionada ao meio. A extração de plasmídeos ou miniprep foi realizada de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989. Células de 1,5 mL da suspensão de bactérias foram concentradas por centrifugação em 13000 g por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, 200 μL da solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 25 mM) foram adicionados às células com homogeneização em vortex. Em seguida, a solução II (200 μL) contendo NaOH 0,2 N e SDS 1% foi misturada lentamente por inversão à mistura anterior. Finalizando esta etapa, 200 μL da solução III (acetato de sódio 5 M pH 5,2) foram adicionados e homogeneizados as outras por inversão. Após centrifugação por 5 minutos a 13000 g, 600 μL do sobrenadante foi transferido para novo tubo. Os plasmídeos foram então precipitados utilizando 600 μL de isopropanol e

centrifugação por 20 minutos em 13000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 350 µL de etanol 70%. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37° C. Os plasmídios extraídos foram ressuspensos em 50 µL de água ultra pura autoclavada.

Extração de DNA

A extração de DNA das folhas das plantas transgênicas e não-transformadas foi realizada conforme o protocolo PureGene desenvolvido por N.M. Upadhyaya (CSIRO Plant Industry). As folhas foram coletas em gelo e 20-40 mg do material foram pulverizados com N₂ líquido. Ao material macerado, foram adicionados 600 µL de solução de lise de células (TE – Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0 – com 1 % SDS). A mistura foi incubada a 65° C por 1 hora e centrifugada por 3 minutos a 13000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foi adicionado 200 µL de solução de precipitação de proteínas (Acetato de amônio 6 M). A seguir, a mistura foi agitada no vortex por 20 segundos. Após centrifugação a 13000 g por 5 minutos, 600 µL do sobrenadante foi transferido para novo tubo. A precipitação do DNA foi realizada adicionando 600 µL de isopropanol, seguido de 50 inversões para homogeneização e incubação em freezer por 30 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação por 20 minutos a 13000 g foi descartado e 350 µL de etanol 70% foram adicionados ao tubo de microcentrífuga para lavagem do DNA. Após centrifugação por 5 minutos em 13000 g e descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco a 37° C. O DNA extraído foi ressuspensionado em 40 µL de água ultra pura autoclavada.

Extração de RNA

A extração de RNA de pool de folhas completas de plantas transgênicas e plantas não-transformadas foi feita com o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante.

As folhas coletadas foram imediatamente congeladas em N₂ líquido, no qual foram maceradas. 50-100 mg do tecido macerado foram homogeneizados em 1 mL de Trizol (o volume de material não deve ultrapassar 10% do volume de Trizol). As amostras foram incubadas no Trizol por 5 min numa temperatura entre 15 e 30° C para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol. Após agitação vigorosa por 15 segundos, os tubos de microcentrífuga foram incubados por 5 minutos entre 15 e 30° C. As amostras foram centrifugadas em no máximo 12000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa, a qual contém o RNA, foi coletada.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa foi transferida para um tubo novo. 0,5 mL de isopropanol foi adicionado para cada 1 mL de Trizol inicial. As amostras foram incubadas por 10 minutos entre 15 e 30° C, seguindo centrifugação por 10 minutos em velocidade máxima de 12000 g. O sobrenadante foi descartado.

O “pellet” de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% para cada 1 mL de Trizol inicial. As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas a 7500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi seco em estufa a 37° C. O RNA foi ressuspendido em 30 µL de água ultra pura autoclavada.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega). A reação da transcriptase reversa foi feita para um volume final de 50 µL. Inicialmente, foi preparado o Mix I contendo 1 µL de Poli 24TV (0,5 µM), 1 µL de dNTP 10 mM e 8 µL de água ultra pura autoclavada para cada reação. Ao volume de 10 µL do Mix I foi adicionado 2 µL de RNA e homogeneizado por pipetagem. As amostras foram incubadas a 65° C por 5 minutos e incubadas imediatamente no gelo por 5 minutos. A cada amostra foram adicionados 38 µL do Mix II contendo 10 µL de tampão 5 X, 27 µL de água ultra pura autoclavada e 1 µL de enzima M-MLV RT (200 U/µL). As soluções foram homogeneizadas por pipetagem. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, a enzima foi inativada à temperatura de 70° C por 15 minutos. A solução estoque foi então preparada diluindo 10 vezes o volume final de 50 µL obtido na

síntese de cDNA. Para as reações de PCR em Tempo Real, a solução estoque foi diluída 10 vezes (diluição final 1:100).

Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

As reações de PCR foram feitas geralmente utilizando 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM); 2,5 µL de tampão (10 X); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 0,5 µL de Mix de primer “forward” e “reverse” (10 µM); 19 µL de água ultra pura autoclavada; 0,25 µL de enzima Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 1 µL de DNA. O programa utilizado para polimerização iniciava com 5 minutos a 94° C, seguido de um ciclo de 30 repetições de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C e 1 minuto a 72° C. Finalizando a polimerização, o programa apresentava 5 minutos a 72° C.

As reações de PCR foram realizadas para confirmação da transformação de *E. coli* e *A. tumefaciens*. Nessas reações foram utilizados os iniciadores específicos para cada construção RNAi: *OsAPx1s*, *OsAPx2s*, *OsAPx3s*, *OsAPx4s*, *OsAPx1/2s* e *OsAPx3/4s* (Apêndice 1).

Para a confirmação da transformação de plantas pela inserção da construção RNAi foram utilizados iniciadores específicos para o gene *Hpt* (*Hpt1*: 5' GAGCCTGACCTA TTGCATCTCC; *Hpt2*: 5' GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG) e *Gus* (*Gus1*: 5' CATGAAGATGCGGACTTACG; *Gus2*: 5' ATCCACGCCGTATTCGG), todos presentes no vetor pANDA.

Reações de PCR foram realizadas para analisar o cDNA sintetizado. Para este fim foram utilizados iniciadores específicos de *OsPip1.2* (proteína intrínseca da membrana plasmática de arroz) (*OsPip1.2F*: 5' GTTTGCGGTGTT CTTGGTTC; *OsPip1.2R*: 5' TTGAATGGAATTGCCCTGAT), gene constitutivo em folhas de plantas de *Oryza sativa* L. *japonica* cv. Nipponbare (conforme trabalho em desenvolvimento orientado pela Dra. Márcia Margis).

As amostras de PCR, assim como amostras de DNA e RNA, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1 a 2% corados com GelRedTM (Biotium, Inc.).

PCR em Tempo Real Quantitativo (qRT-PCR)

As análises da expressão dos genes da família APx foi realizada por PCR em Tempo Real (Applied Biosystem 7500 Real-time PCR System), após a síntese de cDNA a partir das folhas de plantas transformadas e não-transformadas. SYBR-green (Molecular Probes) foi utilizado para a detecção da amplificação e para estimar os valores de C_T , além da determinação da especificidade.

A expressão relativa dos genes APx foi avaliada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e o programa SDS. Para as reações de PCR em Tempo Real foram utilizados 2,5 ng/ μ L de cDNA, 0,2 μ M de iniciadores “forward” e “reverse”, 0,1 mM de dNTPs, 1 x de Tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 x de Sybr Green (Invitrogen, Molecular Probes, SYBRTM Safe DNA Gel Stain 10.000X concentrado em DMSO, Cat. Num. S33120) and 0,25 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A qRT-PCR iniciou com 300 segundos a 94° C. Este passo foi seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 94° C (desnaturação), 10 segundos a 60° C (hibridização), 15 segundos a 72° C (alongação) e 35 segundos a 60° C (leitura da fluorescência). A curva de desnaturação foi formada utilizando as seguintes etapas: 10 segundos a 94° C, 120 segundos a 50° C e variação de 0,1° C por segundo de 50° C a 99° C. Os genes que serviram de controles internos utilizados para a normalização da concentração de mRNA nas amostras foram *Formaldeído Desidrogenase (Fdh)* (Número de Acesso GenBank U77637.1), *Ubiquitina (Ubi)* (Número de Acesso GenBank AK103230) e “*elongation Factor*” (*eF*) (LOC_Os03g08010). A amplificação dos genes APx e dos controles internos foi realizada utilizando iniciadores específicos, os quais foram desenhados para obter fragmentos de DNA de tamanho entre 180 a 220 pares de bases. Os iniciadores específicos para amplificação de cada gene APx estão descritos no Apêndice 1. O par de iniciadores específicos para os normalizadores são *eF1 α* F: 5' TTTCACCTCTTGGTGTGAAGCAGAT e *eF1 α* R: 5' GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA; *Fdh* F: 5' CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC e *Fdh* R: 5' TTCCAATGCATTCAAAGCTG; *Ubi5* F: 5' ACCACTTCGACCGCCACTACT e *Ubi5* R: 5' ACGCCTAAGCCTGCTGGTT.

Estresses Abióticos

Alta intensidade de radiação UV-B em plantas jovens

Plantas não-transformadas e plantas da geração T1 das linhagens 5 e 10 de *OsAPx1/2s* com 30 dias de idade foram submetidas à radiação UV-B ($1,28 \text{ Imolm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante 4 horas por 2 dias consecutivos (fotoperíodo de 16 horas luz e temperatura de 28° C. A distância entre a lâmpada UV-B e as plantas era de aproximadamente 40 cm. As plantas expostas ao estresse encontravam-se em solução hidropônica Furlani & Furlani (48 mg/L N-NO₃⁻; 12 mg/L N-NH₄⁻; 200 mg/L Ca; 200 mg/L K; 40.6 mg/L Mg; 8.0 mg/L P; 151 mg/L S; 234 mg/L Cl; 4.85 mg/L Fe; 0.67 mg/L Mn; 0.36 mg/L B; 0.20 mg/L Zn; 0.05 mg/L Cu; 0.11 mg/L Mo) (FURLANI & FURLANI, 1998). No terceiro dia (24 horas após o último período de estresse), um pool de folhas inteiras foi coletado para análise de clorofila-A, conforme protocolo descrito por XING e colaboradores (2007). As folhas maceradas foram colocadas em etanol 95% e mantidas no escuro por 16 horas a 4° C. Prosseguiu-se a leitura do extrato alcoólico em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 649 nm e 665 nm. O conteúdo de clorofila-A foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Clorofila-A} = 13,95 A_{665} - 6,88 A_{649}$$

Estresse com alta concentração de alumínio

Plantas não-transformadas e plantas *OsAPx1/2s* das linhagens 5 e 10, germinadas em papel filtro úmido por 7 dias (28° C, escuro), foram submetidas a estresse com diferentes concentrações de Alumínio (AlCl₃) (20 ou 100 ppm). Para o tratamento com 100 ppm, a adição de alumínio na solução hidropônica Furlani & Furlani (FURLANI & FURLANI, 1998) foi gradual, iniciando com 4 dias de estresse com 50 ppm de Alumínio. A solução controle e a solução contendo alumínio foram mantidas em pH 4,0. A duração total do estresse foi de 14 dias (fotoperíodo de 12 h e 28° C).

Análises estatísticas

Os resultados de RT-PCR quantitativo foram analisados quanto a sua significância estatística utilizando ANOVA, pelo teste de Tukey HSD ($p < 0,05$), através do programa SSPS versão 10. Os dados referentes à expressão relativa dos genes *OsAPx* em plantas *OsAPx2s* foram analisados pelo teste-T de Student utilizando-se o programa Excel 2007 (Microsoft).

Outros protocolos utilizados para desenvolvimento desta dissertação de mestrado estão descritos no Material e Métodos do artigo anexado no item referente à caracterização das isoformas citosólicas de APx.

6. RESULTADOS

6.1. Obtenção das Plantas Transgênicas

As plantas transgênicas foram obtidas a partir da transformação por *A. tumefaciens* de calos de arroz (*Oryza sativa* L.) da subespécie *japonica* cultivar Nipponbare. Após a recombinação do vetor pANDA com as seqüências de interesse, o vetor obtido foi introduzido em *E. coli*. Esta etapa foi efetuada para obtenção de quantidade suficiente dos vetores pANDA recombinados (pANDA-*OsAPx1/2s*; pANDA-*OsAPx1s*; pANDA-*OsAPx2s*; pANDA-*OsAPx3/4s*; pANDA-*OsAPx3s*; pANDA-*OsAPx4s*). Após isolamento dos plasmídeos por Miniprep e quantificação dos mesmos em gel de agarose, aproximadamente 1µg de DNA plasmidial foi utilizado para a transformação de *A. tumefaciens*. As transformações de *E. coli* e de *A. tumefaciens* foram confirmadas por PCR. Os iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados na amplificação das seqüências das construções RNAi (Apêndice 1). As Figuras 3 e 4 são representativas dos resultados obtidos por PCR para confirmação da transformação de bactérias.

A transformação de calos de arroz com *A. tumefaciens* consiste de duas etapas de seleção com higromicina: a primeira ocorre na fase de calos e a segunda após a regeneração de plantas (Figura 5). O vetor pANDA contém o gene *Hpt*, que confere resistência à higromicina. Desta forma, apenas os calos e as plantas transformados são capazes de sobreviver em meio de cultura com este antibiótico. A presença do T-DNA nas plantas obtidas pela transformação foi ainda confirmada por PCR utilizando iniciadores desenhados para o gene *Hpt* ou para o gene *Gus*, ambos presentes no vetor pANDA. A Figura 6 é representativa dos géis de PCR obtidos na confirmação das plantas transgênicas.

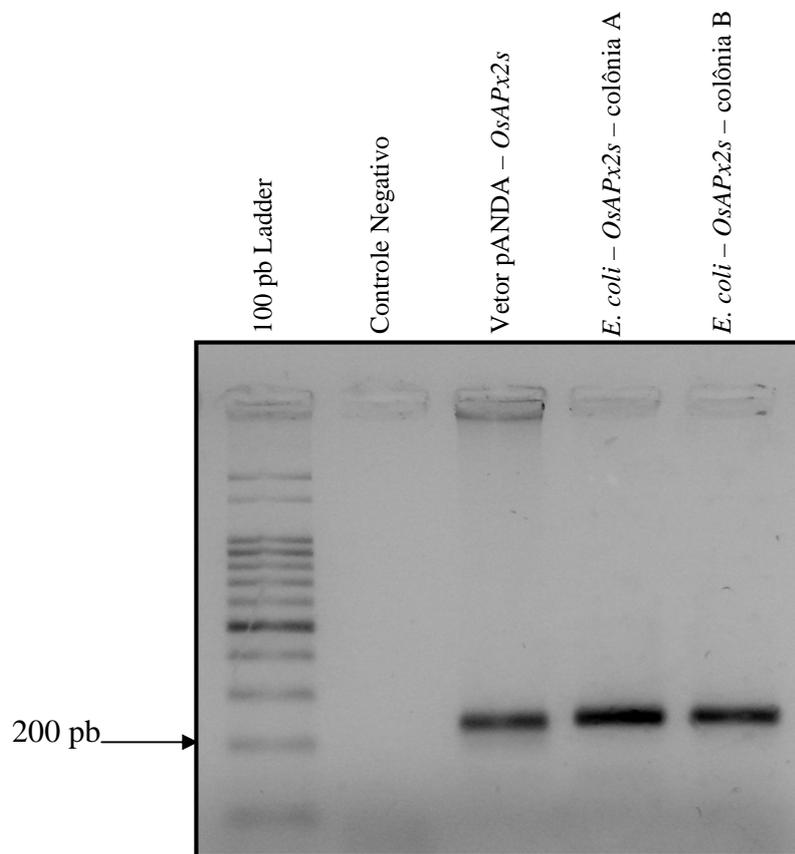


Figura 3. Confirmação da transformação de *Escherichia coli* com vetor pANDA-*OsAPx2s*. Resultado do PCR com iniciadores desenhados para construção RNAi visando o silenciamento de *OsAPx2* (225 pb). Foi utilizado como controle positivo alíquota do vetor pANDA recombinado com construção *OsAPx2s*. Como controle negativo foi utilizada água. As amostras amplificadas são derivadas de 2 colônias isoladas de *Escherichia coli* transformadas e multiplicadas em meio de cultura contendo canamicina.

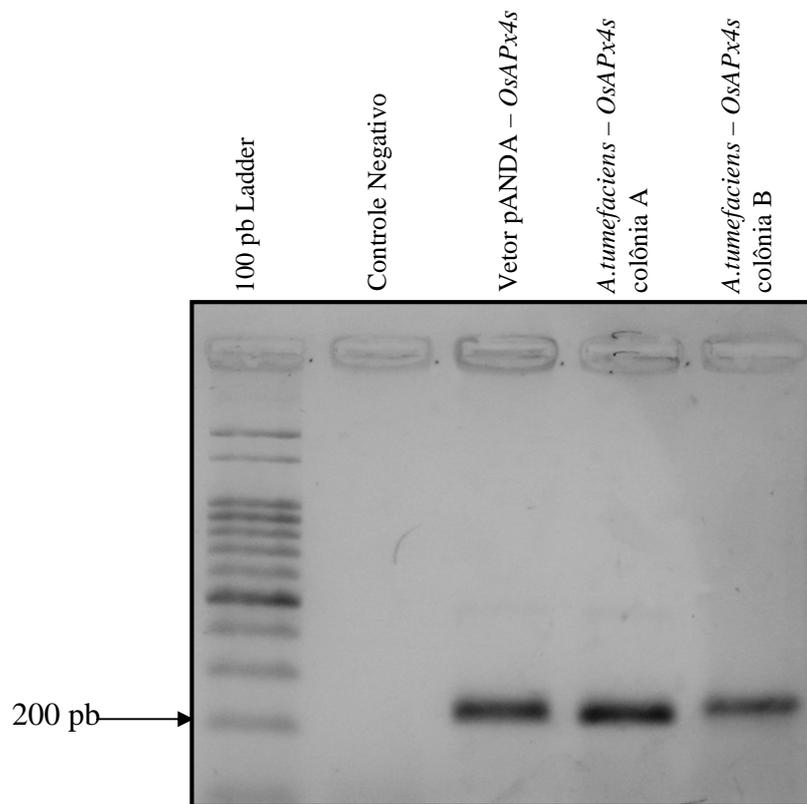


Figura 4. Confirmação da transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com vetor pANDA-*OsAPx4s*. Resultado do PCR com iniciadores desenhados para construção RNAi visando o silenciamento de *OsAPx4* (245 pb). Foi utilizado como controle positivo alíquota de vetor pANDA recombinado com construção *OsAPx4s*. Como controle negativo foi utilizada água. As amostras amplificadas são derivadas de 2 colônias isoladas de *A. tumefaciens* transformadas e crescidas em meio de cultura contendo rifampicina e canamicina.

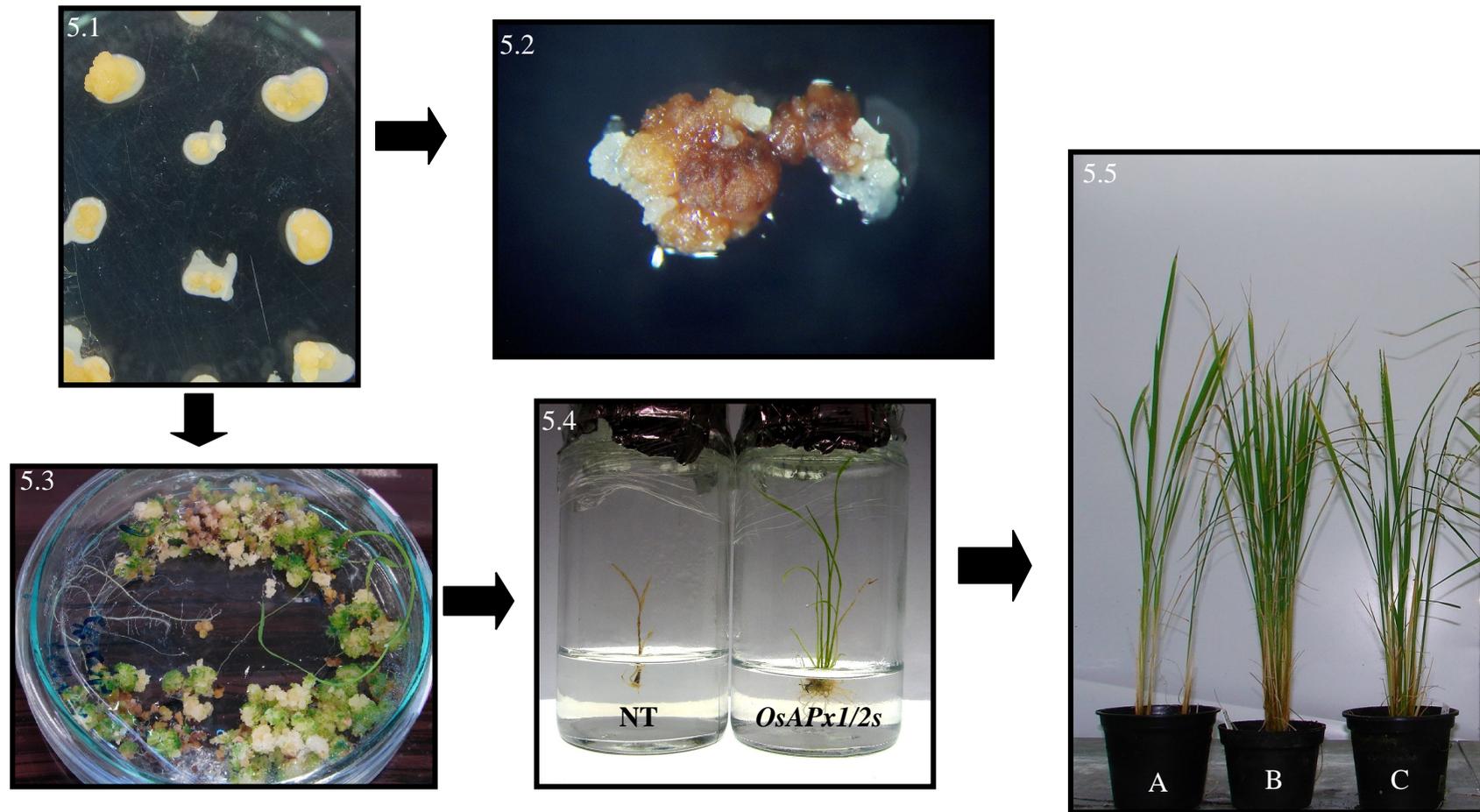


Figura 5 – Transformação de calos de arroz *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cultivar Nipponbare por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1/RNAi. 5.1) Co-cultivo de calos de arroz com *A. tumefaciens* transformada com o vetor pANDA – *OsAPx1/2s*. 5.2) Calos transformados em meio de cultura contendo higromicina (NB-HTC). Apenas as células transformadas são capazes de se multiplicar em higromicina. 5.3) Após cerca de 3 meses em meio com higromicina e 10 dias em meio de pré-regeneração, os calos de arroz são transferidos para meio de regeneração. 5.4) Plantas regeneradas são mantidas por ao menos 2 semanas em meio MS $\frac{1}{2}$ contendo higromicina. 5.5) As plantas que sobrevivem à higromicina são passadas para solo. A) Planta não-transformada (NT). B) *OsAPx1/2s*-5. C) *OsAPx1/2s*-13.

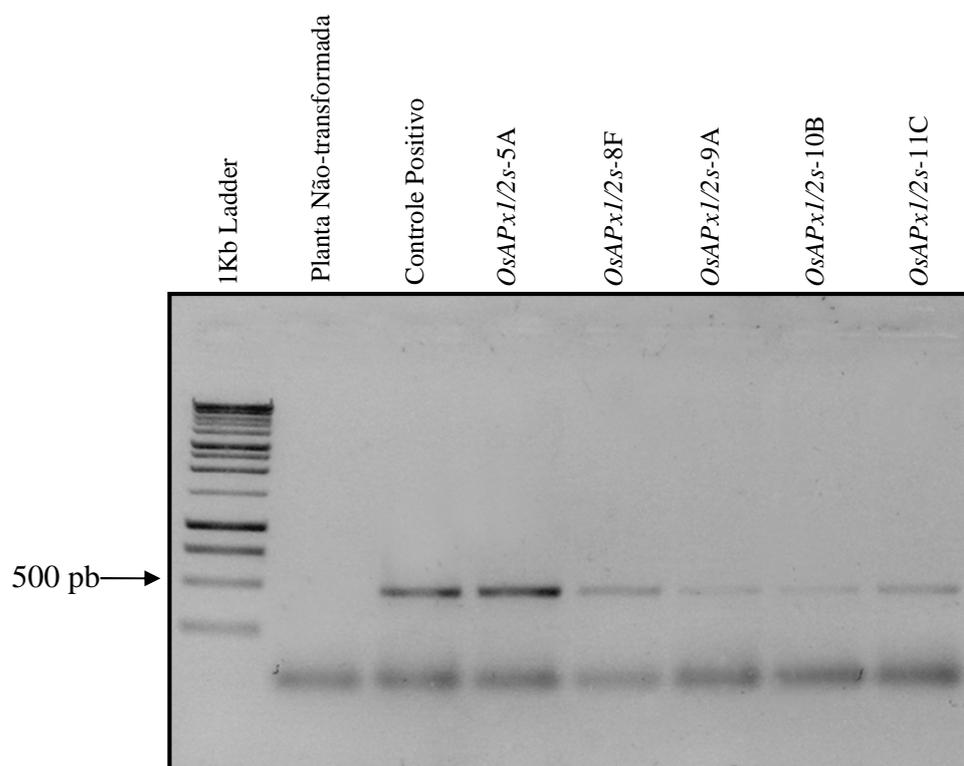


Figura 6. Confirmação da inserção da construção RNAi nas plantas transformadas. Foto do gel obtido a partir da amplificação por PCR de DNA extraído de plantas transformadas e não-transformada. Os iniciadores *Hpt* foram utilizados na amplificação (456 pb). Planta contendo o gene *Hpt* foi utilizada como controle positivo.

6.2. Caracterização funcional dos genes das ascorbato peroxidases citosólicas

Silenciamento simultâneo dos genes *OsAPx1* e *OsAPx2*

O estudo funcional dos genes codificantes das *OsAPx* citosólicas mediante a utilização de plantas silenciadas para ambos genes *OsAPx1* e *OsAPx2* simultaneamente resultou no artigo “Activation of efficient compensatory antioxidant mechanisms in response to post-transcriptional silencing of cytosolic *APx* genes in rice (*Oryza sativa*)” de autoria de Sílvia B. Rosa, Andréia Caverzan, Sérgio Ferreira-Silva, Joaquim A. Silveira, Felipe K. Teixeira, João Abreu-Neto, Mauro Rosa, Rogério Margis e Márcia Margis-Pinheiro. Este artigo, anexado a seguir, será encaminhado para publicação.

Resumo

Ascorbato peroxidases (APx, EC 1.1.11.1) catalisam a conversão de H₂O₂ em H₂O, utilizando ascorbato como doador específico de elétrons. APx são membros da classe I da família de heme-peroxidase e são reguladas por sinais redox e H₂O₂. Previamente, descrevemos a presença de 8 genes codificantes de APx no genoma nuclear de arroz e determinamos que as proteínas codificadas por esses genes são localizadas em diferentes compartimentos subcelulares. O objetivo do presente trabalho é caracterizar a função das isoformas citosólicas de APx mediante análise dos efeitos do duplo silenciamento dos genes de arroz *APx1* e *APx2* no crescimento das plantas e sua resposta a estresses. Plantas transgênicas *APx1/2* silenciadas apresentaram alteração na expressão dos outros genes *APx*, assim como na resposta oxidativa. Em relação aos estresses, as plantas transgênicas apresentaram maior tolerância à concentração tóxica de alumínio e tolerância inalterada à irradiação UVB. Estes resultados revelaram a ativação de um mecanismo antioxidante eficiente, possivelmente mediado por H₂O₂, em resposta ao silenciamento dos genes *APx* citosólicos em arroz.

Activation of compensatory antioxidant mechanisms in response to post-transcriptional silencing of cytosolic APx genes in rice (*Oryza sativa*)

Sílvia B. Rosa^{1,5}, Andréia Caverzan^{1,5}, Sérgio Ferreira-Silva², Joaquim A. G. Silveira², Felipe K. Teixeira⁺, João Abreu-Neto⁵, Mauro Rosa³, Rogério Margis^{1,4} and Márcia Margis-Pinheiro^{1,5*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Brazil

³ Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

***Corresponding author (*):**

Marcia Margis-Pinheiro, sala 207, prédio 43312, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, Brasil

Phone: 55 (51) 3308-9814; e-mail: marcia.margis@ufrgs.br

⁺Presente address: Unité de Recherche en Génomique Végétale, INRA-CNRS-UEVE, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex, France

Abstract

Ascorbate peroxidases (APx, EC 1.1.11.1) catalyse the conversion of H₂O₂ into H₂O. In this reaction, APx use ascorbate as a specific electron donor. APx are members of class I of the super family of heme-peroxidases and are regulated by redox signals and H₂O₂. We have previously described the presence of eight APx encoding genes in the nuclear genome of rice and determined that the proteins encoded by these genes are located in different subcellular compartments. The present work aims to characterize the function of cytosolic APx isoforms by analyzing the effects of the double silencing of rice *APx1* and *APx2* genes on plant growth and on plant stress responses. Transgenic double *APx1/2* silenced plants have altered expression of other APx genes and changes in the oxidative response. Besides, transgenic plants presented greater tolerance to toxic concentration of aluminum and unaltered tolerance against UV irradiation. These results reveal the activation of an efficient antioxidant mechanism, possibly mediated by the H₂O₂ level, in response to the silencing of cytosolic *OsAPx* genes in rice.

Introduction

Biotic and abiotic stress can increase the generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in the intracellular environment. Aerobic organisms developed several nonenzymatic and enzymatic systems to neutralize these compounds. The enzymatic systems include a set of genes such as: superoxide dismutases (*SoD*), catalases (*Cat*), ascorbate peroxidases (*APx*) and glutathione peroxidases (*GPx*) (Scandalios, 2002). A major hydrogen peroxide detoxifying system in plant cells is the ascorbate-glutathione cycle. In this cycle, ascorbate peroxidase (APxs, EC 1.1.11.1) is the key enzyme catalyzing the conversion of H₂O₂ into H₂O, using ascorbate as a specific electron donor. The ascorbate peroxidases are members of class I of the super family of heme-peroxidases and are regulated by redox signals and H₂O₂ (Sharma and Dubey, 2004).

APx sequences were found in green plants and in chloroplastic protists, which acquired chloroplasts by secondary endosymbiosis (Passardi et al., 2007). In higher plants, APx are encoded by a multigene family, and the different isoforms are classified according to their subcellular localization. Soluble isoforms are found in the cytosol, mitochondria and chloroplast stroma while membrane-bound isoforms are found in the

peroxisomes and chloroplast thylakoids. APx subcellular location is determined by the presence of targeting peptides and transmembrane domains in the N- and COOH-terminal regions of the proteins (Jimenez *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 2000; Shigeoka *et al.*, 2002; Mittova *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2004). In *Arabidopsis* from six described APx genes two encode cytosolic isoforms, two peroxisomal and two chloroplastic ones. In *Arabidopsis*, like in rice, chloroplastic isoforms (stromal and thylakoid bound) are encoded by separate genes (Jespersen *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2004). On the other hand, chloroplastic isoforms are generated by alternative splicing of a single gene in spinach (Ishikawa *et al.*, 1997), tobacco (*Nicotiana tabacum*) (Yoshimura *et al.*, 2002), pumpkin (*Curcubita* sp.) (Mano *et al.*, 1997) and iceplant (*Mesembryanthemum crystallinum*). In these species, alternative splicing is determined by a conserved putative splicing regulatory *cis*-element (SRE), upstream of the acceptor site in intron 12 (Yoshimura *et al.*, 2002).

The expression of APx genes is regulated in response to a number of environmental stimuli that produce reactive oxygen species, such as drought, high-intensity light, high temperature, salt stress and pathogen attacks (Yoshimura *et al.*, 2000; Menezes-Benavente *et al.*, 2004; Mittova *et al.*, 2004; Sharma and Dubey, 2004; Teixeira *et al.*, 2006). These studies indicate that APx plays an important role scavenging ROS that are produced when plants are growing under stress conditions (Asada, 1999; Mittler, 2002; Shigeoka *et al.*, 2002). Currently it is well known that ROS metabolism coordination in different sub-cellular compartment is highly complex since ROS, such H₂O₂, can diffuse between those compartments (Hernandez *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2004; Mullineaux *et al.*, 2006). As example of this complexity, in *Arabidopsis* cytosolic APx (APx1) but not a chloroplastic isoform can protect the chloroplast from the oxidative damage during light stress (Davletova *et al.*, 2005). In addition, analyses of double mutants for different antioxidant enzymes revealed that, at least in *Arabidopsis* and tobacco, different signals are produced in plants lacking different antioxidant enzymes located in different sub-cellular compartments (Rizhsky *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2007).

Cytosolic APx isoforms have been subject of many studies. Those genes can be activated by different stress (Fourcroy *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2006) suggesting that they could play a protective function against stressful conditions. In addition, elegant functional studies were carried out in order to access the

functional role of these isoenzymes in the dicotyledonous plant model *Arabidopsis thaliana* (Asai *et al.*, 2002; Rizhsky *et al.*, 2002; Pnueli *et al.*, 2003; Davletova *et al.*, 2005; Rossel *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007). However, a comprehensive functional study, combining gene expression and enzyme activity analyses attempting to understand the role played by the different APx isoforms in crops in general, and in rice in particular, are lacking. Previously, we have identified eight APx genes in the rice (*Oryza sativa* L.) genome through *in silico* analysis: 2 cytosolic isoforms, 2 putative peroxisomal isoforms and 4 putative chloroplastic. The phylogenetics and structural organization of APx genes indicate that the different APx genes arose by a complex evolutionary process involving several gene duplications and suggest a close relationship among proteins located in the same subcellular compartment (Teixeira *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006). In addition, transcript accumulation analysis showed specific expression patterns for each member of the APx family according to developmental stage and in response to salt stress (Teixeira *et al.*, 2006).

To access the functional role of the OsAPx enzymes isoforms located at different subcellular compartments we produced transgenic rice silenced on different APx encoding genes, by the RNAi strategy. Here we report the effects of the double silencing of rice *OsAPx1* and *OsAPx2* genes on plant growth and on plant stress responses. Transgenic double *OsAPx1/2* silenced plants (*OsAPx1/2s*) presented altered expression of other *OsAPx* genes and changes in the oxidative response as indicated by antioxidative enzyme activities and H₂O₂ and ascorbate levels. In addition, transgenic plants showed greater tolerance to toxic concentration of aluminum and unaltered resistance against UV irradiation. Our results point out to the activation of an efficient antioxidant mechanism, possibly mediated by the H₂O₂ level, in response to the silencing of cytosolic *OsAPx* genes in rice.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Rice plants (*Oryza sativa*) cv. Nipponbare were used in this study. Plants were grown under greenhouse conditions of 28° C temperature, 12 h photoperiod and submerged in water as described previously (Upadhyaya *et al.*, 2000) .

Transgenic plants were phenotypically analyzed in order to detect eventual phenotype change resultant from silencing of the genes under study. The different aspects of the plant physiology such as germination, vegetative growth, panicle development, and root development, were analyzed. In addition, the response of these plants to environmental stresses such as UV irradiation and aluminum excess were also evaluated.

Seeds were germinated in water at 28° C under dark conditions. Four-day-old seedlings were transferred to plastic pots containing Baier's solution (Baier et al., 1995) and grown in at 28 ± 2° C, 12h photoperiod. Nutrients composition of Baier's solution is as follow: 10 µM (NH₄)₂SO₄, 400 µM CaCl₂·2H₂O, 250 µM MgCl₂·6H₂O, 650 µM KNO₃, 40 µM NH₄NO₃. For aluminum treatment for 4-day-old seedlings were grown in nutrient solution supplemented by 20 ppm AlCl₃. The pH of the solution was adjusted to 4.0 with 0.1 N HCl or 1 N NaOH. Volume and pH of the nutrient solution were monitored daily and changed each four days. Plant materials were sampled at the times indicated, and immediately frozen at -80° C. For UV light treatment, transgenic and non-transformed plants were transferred to the growth chamber and exposed to continuous UV-B illumination (1.28 Imolm⁻² s⁻¹) for 4 h during 2 days, and then kept under light for recovery. Analyses were performed 24 h after the onset of the UV irradiation. Alternatively, in some experiments two-week-old seedlings were irradiated with UV light (254 nm) provided by a germicidal lamp.

Construct of plant vector and plant transformation

Chimeric genes producing mRNA sequences with a hairpin structure (hpRNA) were constructed based on the sequence of *OsAPx2* gene. Sequence specific primers (5' CGCCGCCAACGCCGCCTCGA e 5' CACTCAAACCCATCTGCGCA) allowed PCR amplification of products corresponding to the plus strand sequence of the gene and one of the strands of the mRNA hairpin. The PCR product was cloned into the Gateway vector, pANDA. In the construct, hairpin RNA is transcribed from a strong maize ubiquitin promoter, and an intron is placed 5' upstream of inverted repeats to enhance RNA expression (Miki and Shimamoto, 2004).

Agrobacterium mediated transformation was performed as described previously (Upadhyaya et al., 2000).

Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Real Time PCR experiments were carried out on cDNAs synthesized from Trizol (Invitrogen) purified total RNA. The synthesis of cDNAs from 0.1 to 2 mg of total RNAs were made after 2 h incubation at 40° C with 200 units of MMLV reverse transcriptase (Promega) and the 24TV primer. Subsequent PCR amplifications were performed using gene specific primers (*OsAPx1F*: 5' CTCGAGCTACAAGGAGGCCACCTCA, *OsAPx1R*: 5' GGTACCTC GAGCCGCATTTCATACCAACACA; *OsAPx2F*: 5' ACCTGAGGTCCCCTTCCA, *OsAPx2R*: 5' CTCTCCTTGTGGCATCTTCC; *OsAPx3F*: 5' GGAGTTGT TGCCGTTGAAGT, *OsAPx3R*: 5' ACCATCAAATCCTGATCTTTC, *OsAPx4F*: 5' CTCGACTGACAAGGCATTGTTGGAAG, *OsAPx4R*: 5' GGTACCTCGAGCAGCT GCAGCAACAGCTACC, *OsAPx5F*: 5' CTCGAGAGGGCAATCTTGGACATCTG, *OsAPx5R*: 5' GGTACCTCGAGGATCAAACCTTTGCCCAAGA, *OsAPx6F*: 5' CTCGAGAGGGCAATCTTGGACATCAC, *OsAPx6R*: 5' GGTACCTCGAGGA TCAAACCTTTGCTCCGAGA, *OsAPx7F*: 5' CTCGAGGAGCAATCTGGG TGCAAAT, *OsAPx7R*: 5' GGTACCTCGAGGACTCGTGGTCAGGAAAAGC, *OsAPx8F*: 5' CTCGAGGCTGCGAAATACTCCTACGG, *OsAPx8R*: 5' GGTACCTCGAGAGGAGGTCATCAGACCATCG). Primers were designed to produce DNA amplicons ranging from 180 to 220 bp. Primer pairs to amplify the *Fdh3* gene (GenBank Acc. No. U77637.1) (*Fdh* F: 5' CAAAATCAGCTGGTGCTTCTC e *Fdh* R: 5' TTCCAATGCATTCAAAGCTG), *Ubi* gene (Genebank Acc. No. AK103230) (*Ubi5* F: 5' ACCACTTCGACCGCCACTACT and *Ubi5* R: 5' ACGCCTAAGCCTGCTGGTT) and *eF1 α* gene (LOC_Os03g08010) (*eF1 α* F: 5' TTTCCTTCTTGGTGTGAAGCAGAT and *eF1 α* R: 5' GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA) were used as internal controls, to normalize the amount of mRNA present in each sample. Relative quantifications of amplified products were made by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using the Applied Biosystem 7500 Real-time PCR with the SDS software. SYBR-green (Invitrogen, Molecular Probes, SYBRTM Safe DNA Gel Stain 10.000X concentrado em DMSO, Cat. Num. S33120) was used to detect amplification and estimate C_T values and to determine specificity of amplicons by denaturing curves and melting temperatures (T_m). The reactions were done with 2.5 ng/ μ L cDNA, 0.2 μ M primers forward and reverse, 0.1 mM dNTPs, 1 x Buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 x Sybr Green and 0.25 U

Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The qRT-PCR began with 300 seconds at 94° C. This step was followed for 40 cycles of 15 seconds at 94° C, 10 s at 60° C, 15 s of 72° C and 35 s at 60° C. The desnaturation curve was done with 10 s at 94° C, 120 s at 50° C and a variation of 0,1° C for s from 50° C to 99° C.

Extraction and enzyme assay

Leaf samples (0.5 g FW) were homogenized with a mortar and pestle in 3 mL of ice-cold 100 mM K-phosphate buffer pH 6.8, containing 0.1 mM EDTA for 5 min. After filtration in cheesecloth the homogenate was centrifuged at 4°C at 15000 g for 15 min and the supernatant used as the source of enzymes. The protein content of crude enzyme extracts was estimated according to Bradford (1976), using BSA as standard. Cat (EC 1.11.1.6) activity was determined by adding 50 µL of enzymatic extract to 3 mL of a solution containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 20 mM H₂O₂ and by measuring the decrease in absorbance at 240 nm, at 30°C (Havir and McHale, 1987). The enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of $36 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and expressed as nmol H₂O₂ oxidized g⁻¹ protein min⁻¹. The activity of SoD (EC 1.15.1.1) was determined by adding 100 µL of the enzymatic extract to a solution containing 13 mM L-methionine, 75 mM p-nitro blue tetrazolium chloride (NBT), 100 mM EDTA and 2 mM riboflavin in a 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8. The reaction took place in a chamber under illumination of a 30 W fluorescent lamp at 25° C. The reaction was started turning the fluorescent lamp on and stopped 5 min later turning it off (van Rossum et al., 1997). The blue formazane produced by NBT photoreduction was measured by the increase in the absorbance at 560 nm. Control reaction mixture had no enzyme extract. The blank solution had the same complete reaction mixture but it was kept in the dark. One SoD AU was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% of the NBT photoreduction in comparison with tubes lacking the plant extract. Because the soluble protein values did not show significant alterations between the different treatments during the whole experimental period, the enzymatic activities were expressed in protein basis (AU g⁻¹ protein min⁻¹). APx activity was measured by following the decrease in absorbance at 290 nm due to ascorbate (AsA) oxidation for 5 min, according to Nakano and Asada (1981). The reaction mixture contained: 1 mL of 0.68 mM AsA and 0.1 mM EDTA in

100 mM K-phosphate buffer pH 7.0, 1 mL of 4 mM H₂O₂ and 100 µL of the enzyme extract.

Ascorbate assay

Ascorbate content was assayed according to Kampfenkel et al. (1995). The leaf samples (0.1 g FW) were homogenized in cold 6 % TCA (w/v), and the homogenate was centrifuged at 12000 g (4° C) for 20 min and the supernatant was then used. The assay is based on the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ by AsA and the spectrophotometric detection of Fe²⁺ complexed with 2,2` bipirydyl that produces a pink color with the maximum absorbance at 525 nm.

Hydrogen peroxide assay

Hydrogen peroxide content was assayed according to Gay et al. (1999). Leaf samples (0.25g FW) were ground to a fine powder in liquid nitrogen. Next, they were homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, containing 5 mM KCN for 5 min. The homogenate was filtered through two layers of cheesecloth and then centrifuged at 4° C at 12000 g for 15 min and the total amount of supernatant was analysed using the FOX method.

Lipid peroxidation (TBARS)

The level of lipid peroxidation was determined in terms of TBARS concentration as described in Cakmak and Horst (1991), with minor modifications. Samples (0.25 g) were homogenized in 3 mL of 1.0 % (w/v) TCA at 4° C. The homogenate was centrifuged at 20000 g at 4° C for 15 min and 0.5 mL of the obtained supernatant was added to 3 mL of 0.5 % (v/v) TBA in 20 % TCA. The mixture was incubated at 95° C in a shaking water bath for 50 min, and the reaction stopped by cooling the tubes in ice water bath. Then, the samples were centrifuged at 9000 g, 10 min, and the absorbance of the supernatant read at 532 nm. The value for non-specific absorption at 660 nm was subtracted. The concentration of TBARS was calculated using the absorption coefficient of 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Cakmak and Horst, 1991).

Histochemical staining of H₂O₂ and chlorophyll content

The diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) staining was used to localize H₂O₂ accumulation. Rice leaves were incubated with 0.1% (w/v) DAB (Sigma) in 10 mM MES (Sigma), pH 5.8, for 12 h. Leaves were cleared by boiling in 96% ethanol for 10 minutes before photography (Schraudner et al., 1998). Chlorophylls content was determined according to Xing et al. (2007).

Results

Generation, phenotype and molecular/biochemical analyses of double silenced OsAPx1/OsAPx2 transgenic rice

The coding regions of *OsAPx* genes are well conserved (nucleotide and amino acid sequence identities among the members are 72% to 82% and 78% to 95%, respectively), and there exist contiguous stretches of nucleotides in which 21 to 49 bases are identical between *OsAPx* genes encoding proteins located at same subcellular compartment. We designed an inverse repeat (IR) construct transcribing a dsRNA harboring 250 bp from a specific region of *OsAPx2* gene that also has 82% of identity with a region of *OsAPx1* gene. The selected region shares with *OsAPx1* sequence a stretch of 26 bases with perfect match (Table 1). This region does not have more than 62% identity or 14 perfect match sequences with other member of the *OsAPx* family, which permitted us to target specifically cytosolic *APx* genes with the hairpin constructs. We transformed the RNAi*APx1/2* construct on rice and produced 23 independent transgenic lines. All *APx1/2s* transgenic plants obtained did not present any visible altered phenotype when growing in control conditions (Figure 1A). Quantitative PCR analyses of *OsAPx1* and *OsAPx2* mRNAs in transgenic rice plants showed that the expression of both cytosolic *OsAPx* genes were strongly reduced in all *OsAPx1/2s* transgenic regenerated lines. We analyzed a total of 9 independent transgenic plants and observed efficient suppression of *OsAPx1* and *OsAPx2* mRNAs in all of them (Figure 1B).

Biochemical analyses showed that APx activity was reduced by 20 to 40 % on *OsAPx1/2s* lines (Figure 2A). On the other hand, catalase, ascorbate oxidase and SoD activities were significantly enhanced in these transgenic plants (Figures 2B, 2C and

2D). We also quantified ascorbate, H₂O₂ and TBARS in leaf extracts from non-transformed and double *APx1/2* silenced plants. *OsAPx1/2s* plants had higher levels of H₂O₂ (Figure 2F) and reduced form of AsA (Figure 2G) contents. However, the level of TBARS (Figure 2E) decreased in transgenic plants compared to non-transformed plants.

Effect of reducing the cytosolic H₂O₂ scavenging capacity on peroxisomal and chloroplastic/mitochondrial APx mRNA accumulation

To investigate the expression of different *OsAPx* genes in response to the silencing of cytosolic *OsAPx* genes we analyzed the transcript accumulation of all members of *OsAPx* gene family (*OsAPx1-OsAPx8*) by qRT-PCR in mature regenerated plants. The results expressed as mean of three independent measures (Figure 3) reveal that the expression of the majority of these genes is altered in response to the simultaneous silencing of *OsAPx1* and *OsAPx2* genes. Only the mitochondrial *OsAPx6* was not affected by the silencing of cytosolic *OsAPx*. The other APx isoform were approximately reduced by 50%.

Similar results were obtained when transgenic plants from T1 generation were used in the analysis. However, the level of *OsAPx2* silencing was not so reduced on this generation when compared to the parental (To) plants. On the other hand, when the same analysis was performed using young plants (5-days old), the reduction of expression of the ensemble of *OsAPx* genes, which were not targeted by the RNAi construct, was not observed (See non-stressed plants on Figure 6).

Response of double silenced OsAPx1/OsAPx2 transgenic rice to abiotic stress

Plants double silenced on *OsAPx1* and *OsAPx2* were submitted to abiotic stress and the responses to these treatments were analyzed. The *in situ* localization of H₂O₂ by DAB staining reveals that in RNAi plants the content of H₂O₂ was maintained high after 30 minutes of the end of the germicidal UV irradiation treatment, while the H₂O₂ content was reduced to the control levels in non-transformed plants (Figure 4A). In spite of this result, non-transformed and silenced plants were visually equally affected by the UV stress and the content of chlorophyll was similar in both non-transformed and silenced plants (data not shown).

The mRNA expression of all *OsAPx* gene family members was analysed in response to UV irradiation in both non-transformed plants and in double silenced rice

(Figure 4B). The UV-B irradiation increased the expression of *OsAPx1* and *OsAPx7*; and reduced the transcript level of *OsAPx5* and *OsAPx8* in non-transformed plants. *OsAPx2*, *OsAPx3*, *OsAPx4*, *OsAPx6* genes were not significantly altered by this treatment. In silenced plants the induction of *OsAPx1* promoted by UV-B irradiation was not able to overpass the post-transcriptional silencing produced by the RNAi construct. However, the treatment was able to reduce at lower level the expression of *OsAPx5* in comparison to the already reduced level of the transcript of this gene in non-stressed double silenced plants. In addition, the *OsAPx4* expression was reduced in stressed transgenic plants. This result contrast to the response of the non-transgenic plant submitted to UV-B irradiation.

The result presented on Figure 4B shows the quantification of transcript accumulation normalized by the transcript level of *OsAPx1* in non-transformed plants. This analysis permitted us to compare the amount of transcript among the different *OsAPx* genes. Results revealed that the most expressed *OsAPx* gene corresponded to the *OsAPx2* and the less expressed was *OsAPx3* in this condition.

To analyze the effect of silencing of cytosolic *OsAPx* genes in response to aluminum stress, we grew rice seedlings in the presence of 20 ppm aluminum. Figure 5A shows the result of a representative experiment using three independent transgenic lines. One can observe that the transgenic silenced plants are healthier than non-transformed plants growing in the presence of 20 ppm aluminum (Figure 5A). To investigate if the level of H₂O₂ changes during this treatment and if transgenic plants responses differed to the non transformed plants, we performed an experiment in which four weeks old seedlings were submitted to 20 ppm aluminum during 24 hours. *In situ* localization of H₂O₂ by DAB staining revealed that, in response to Al, the levels of hydrogen peroxide increased one hour after the onset of treatment in transgenic and non-transgenic plants. However, the levels of H₂O₂ at this point of the time course are higher in silenced plants than in non-transformed plants (Figure 5B). The transcript levels of different *OsAPx* genes were quantified in shoots of 5-days old plants after 8h of this treatment (Figure 6). *OsAPx1* and *OsAPx3* transcript levels were significantly increased in response to the aluminum treatment in non-transformed plants. Silenced plants were not able to induce transcription of these genes in the same levels. However, differently to the control non-transformed plants, double *OsAPx1/OsAPx2* silenced

plants have increased levels of mRNA corresponding to the peroxisomal *OsAPx4* and chloroplastic *OsAPx8*.

We also submitted mature plants to 40 ppm aluminum treatment for 2 weeks and analyzed biochemical parameters (Figure 7). The results showed that total APx activity increased in non-transformed plants in response to the treatment (Figure 7A). Silenced plants presented lower level of APx activity but are still able to induce its activity in response to aluminum. However, the induced level in silenced plants is still about 50% lower than the APx activity of control non-transformed plants. SoD activity was induced in both non-transgenic and silenced plants (Figure 7B). Catalase activities did not vary in response to the treatment (Figure 7C). TBARS increased in both plants submitted to aluminum, but the level was lower in transgenic plants in comparison to the non-transgenic plants (Figure 7E). The concentration of the reduced form of ascorbate was also determined. The AsA content was higher in silenced plants in both control and stressed growth conditions (Figure 7D). In both plants the content of AsA increased in response to aluminum, however in silenced plants this value was significantly higher. The concentration of hydrogen peroxide was also determined in these plants. The results showed that Al-treatment induced, in both non-transformed and silenced plants, an increase in the H₂O₂ concentration in parallel to the lipid peroxidation levels (Figure 7F).

Effects of exogenous H₂O₂ treatments on the expression of rice APx gene family.

All transgenic *OsAPx1/2s* presented higher content of H₂O₂. In order to investigate how H₂O₂ can modulate the *OsAPx* gene family expression we treated non-transformed plants with exogenous 10 μM H₂O₂. qRT-PCR indicated that both cytosolic *OsAPx* genes are modulated by H₂O₂; in addition, *OsAPx5*, *OsAPx6* and *OsAPx7* expression were also significantly increased by this treatment (Figure 8). It is remarkable that only genes encoding soluble enzymes were induced by H₂O₂, in contrast all genes encoding membrane-bound isoforms (peroxisomal *OsAPx3* and *OsAPx4*, and thylakoid *OsAPx8*) were not affected by exogenous H₂O₂.

Discussion

A number of recent studies with *A. thaliana* APx knockout mutants revealed an incontestable link between ROS and different physiological processes related to plant development and response to biotic and abiotic stress (Rizhsky *et al.*, 2002; Pnueli *et al.*, 2003; Davletova *et al.*, 2005; Rossel *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007). In contrast to these studies, analyses of mutants carrying APx knockout using rice, the monocot plant model, were not yet addressed. In addition, these works did not examine the effect of blocking the expression of all APx genes that encode APx isoforms present in a specific subcellular compartment. In earlier works, we described the presence of eight *OsAPx* encoding genes in the nuclear genome of rice (Teixeira *et al.*, 2004) and determined that the proteins encoded by these genes are located in different subcellular compartments (Teixeira *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006). The understanding of how antioxidant metabolism is regulated in plant cells seems to be highly complex, since these enzymes have substrates that also function as signal molecules and are represented by several isoforms targeted to different intracellular compartments. The eight members of the rice *OsAPx* gene family appear to play different roles during plant development and in response to abiotic stress. Two of them, *OsAPx1* and *OsAPx2*, encode cytosolic isoforms. In order to understand the role of the isoforms located at this subcellular compartment in the antioxidant metabolism in rice, we produced transgenic lines double silenced in both *OsAPx1* and *OsAPx2* genes. The effects of this genetic manipulation on plant growth and stress response were determined. The double silencing of *OsAPx1* and *OsAPx2* did not produce any visible phenotype suggesting that a compensatory H₂O₂ scavenging mechanism was activated. Enzymatic activity measurements indicate that total APx activity on double silenced plants was reduced by 20-40 % (Figure 2A) suggesting that the post-transcriptional silencing of these genes had significant impact on the APx mRNA translation. On the other hand, catalase and SoD activities were significantly enhanced in these transgenic plants (Figures 2B and C). The enhanced activity of different antioxidant enzymes indicates that these activities could compensate the lack of cytosolic APx in the scavenging of ROS. The increased activity of SoD may indicate that an excess of electrons are flowing in the photosystem I. Tobacco plants with suppressed *APx1*

expression also contained elevated levels of transcripts corresponding to *CuZnSoD*, *Catalase* and *Glutathione Reductase* suggesting the existence of a compensatory mechanism (Rizhsky *et al.*, 2002). On the other side, the response of *Arabidopsis* plants to *APx1* deficiency did not affect the transcript level of *Catalase*, *CuZnSoD* or *Glutathione Reductase* (Pnueli *et al.*, 2003). The contrast of responses to the reduced expression of cytosolic *APx* genes in different plants reveals specificities on antioxidant systems related to specific plant lineages.

We quantified ascorbate, H₂O₂ and TBARS in leaf extracts of non-transformed and double *OsAPx1/2* silenced plants. The levels of these compounds represent good markers of the oxidative stress suffered by plants. The higher levels of H₂O₂ (Figure 2F) and of the reduced form of ascorbate (Figure 2G) on *OsAPx1/2s* plants correlated with the reduced level of APx activity in these plants. The reduced level of TBARS (Figure 2E) in transgenic plants compared to non-transformed plants indicates that, in the control conditions, silenced plants can support the elevated level of H₂O₂ without plant penalty, certainly due to the efficient compensatory mechanism represented by other enzymes such as catalase. The transgenic plants also present higher level of ascorbate oxidase (AO) activity (Figure 2D). Ascorbate oxidase is widely distributed and is only present in plants. However, its biological role is still not clear. The enzyme may be involved in plant defense by modifying the ascorbate level and thus redox state in the apoplast. The pool of reduced ascorbate in the apoplast results from the balance between inputs from newly synthesized AsA transported from the cytosol and losses associated with enzymatic metabolism and oxidation by cell wall localized AO (Smirnoff, 2000). The increasing of AO activity could be understood as a response to the elevation of H₂O₂ levels as result of the lack of cytosolic APx activity. The cells could perceive this as the plant was submitted to an environmental stress, and in this way activate the AO to equilibrate the apoplastic redox status. Sanmartin *et al.* (2007) demonstrated that modulation of AO activity occurs by sudden changes in apoplastic redox state in response to abiotic or biotic cues. Heat stress and wounding trigger induction of melon *CmA04* mRNA accumulation. Moreover, jasmonic acid (JA), a well-known wound-related hormone, induces an up-regulation of *CmA04* transcript abundance, while salicylic acid, a known JA antagonist hormone, causes the opposite effect.

The analysis of the expression of the all members of the *OsAPx* gene family in double silenced plants showed that the expression of the majority of these genes is

altered in response to the simultaneous silencing of *OsAPx1* and *OsAPx2* in mature plants, but not in 5 days-old seedlings. In addition, the level of the repression of the transcript accumulation of *OsAPx3* and *OsAPx4*, two highly close related *OsAPx* genes, differ largely. These results suggest that the reduction of the expression of other members of the *APx* gene family was not an unspecific RNAi out targeting effect, but could represent a response to the altered levels of signal molecules, such as H₂O₂ and ascorbate (or other unknown), which effect apparently was dependent on the plant developmental stage.

When *OsAPx1/OsAPx2* silenced plants were submitted to abiotic stress, such as UV irradiation and aluminum treatment, their H₂O₂ contents were significantly higher when compared to the H₂O₂ levels accumulated in non-transformed plants. In spite of this, non-transformed and silenced plants were equally affected by the UV stress. Besides, silenced plants seem to be more tolerant to the treatment with aluminum than non-transformed plants. This result was not expected since cytosolic *APx* genes are induced in response to different kinds of stress such as UV (Figure 4), salt (Menezes-Benavente *et al.*, 2004) and aluminum treatment (Sharma and Dubey, 2007) (Figure 6), suggesting that its activity could be fundamental for scavenging the excess of H₂O₂ produced in response to these stresses. Our results point out that a compensatory antioxidant mechanism was activated in response to the post-transcriptional silencing of cytosolic *OsAPx* genes. To corroborate this assumption, other antioxidant enzymes presented higher specific activity in silenced plants when compared to non-transformed control plants. The compensatory effects could be triggered by the increasing content of signal molecules such H₂O₂ and ascorbate, or other not yet characterized signal compounds. Hydrogen peroxide may be actively produced by cell metabolism under normal growth conditions, playing physiological roles such as biosynthesis and developmental related modifications of the structural components of cell walls (Ros Barceló, 2005). In addition, recent data suggests that ROS also behave as second messengers. In bacteria, yeasts and animals, ROS production can modify redox-sensitive transcription factors, which are involved in ROS-scavenging (Moradas-Ferreira and Costa, 2000; Catani *et al.*, 2001; Georgiou, 2002). In plants, redox-sensitive regulation of gene expression was also described (Mou *et al.*, 2003).

The response to the silencing of cytosolic *APx* genes in rice contrasted with the effect of the mutation of *APx1* gene in *Arabidopsis thaliana*, which absence was

responsible for the collapse of entire chloroplastic H₂O₂-scavenging system. In *Arabidopsis*, cytosolic *APx1* corresponds to a central component of the reactive oxygen gene network, protecting the chloroplast during light stress (Davletova *et al.*, 2005). Our results point out an important role of cytosolic APx in the control of the content of hydrogen peroxide, which could function as a signal (or activate a signal) that could maintain the cell in an alert state allowing the plant to cope with environmental stresses such as high level of aluminum. However, in rice, high expression of the cytosolic APx genes was not fundamental for plant survival or development under control or stressed conditions. Our results revealed that rice responds differently from *Arabidopsis* to the lack of cytosolic APx genes, suggesting that the plant anti-oxidant system is very complex and exhibit specificities depending on the plant analyzed. Contrasting with the results described by Davletova *et al.* (2005), Asai and co-works (2004) demonstrated that the lack of the *Arabidopsis APx1* activate a multiple antioxidative system that permitted mutant plants to develop similar to the wild-type plants. The reason of the contrasting results are not clear but could be explained by the differences on the growth conditions in the two works carried out by the different groups (Asai *et al.*, 2004). These results indicate that the different mutants obtained must be systematically submitted to different situations in order to give us the complete picture of the interactions of the antioxidant metabolism in plants.

We have attempted to relate the content of H₂O₂ with the modulation of *OsAPx* gene family in transgenic double silenced plants submitted to stress conditions. Our strategy was to determine the modulation of the expression of the entire family in response to exogenous treatment of H₂O₂. In this analysis all soluble APx encoding genes (*OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx5*, *OsAPx6* and *OsAPx7*) were induced by H₂O₂. However, in spite of the increasing of the content of H₂O₂ in transgenic plants submitted to the stress, their responses differed in relation to the responses obtained by the treatment of non-transformed plants with H₂O₂. These results suggest that the treatment with exogenous H₂O₂ did not affect the plant physiology in the same way when the H₂O₂ scavenging enzyme was lacking in a specific sub-cellular compartment.

The ensemble of our results revealed that cytosolic APx and other antioxidant systems work in an apparently redundant but integrated way in rice. In addition, in this plant the reduction of the expression of both cytosolic *OsAPx* genes may activate a stress response system that can be useful under stressful conditions, permitting plants to

be more tolerant to the stress. Further analyses must be carried out in order to identify the stress-related genes that are activated in the transgenic plants *OsAPx1/2s* in response to the reduced activity of cytosolic APx, and also the signal responsible for that activation. As already demonstrated for dicotyledonous plants, there is a complex regulation mode within ROS network in plants. In this network, H₂O₂ could be responsible for the communication between different subcellular compartments. The functional analysis of genes belonging to this network in a monocot plant like rice can reveal specificities of this group of plants and/or help us to understand the highly complex processes involving the responses of plants to abiotic stress.

Acknowledgments: This work was supported by UNESCO, ICGEB, Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Legends of Table and Figures

Table 1. Similarity between the sequence of the RNAi construction and the *OsAPx* genes.

On parenthesis is the number of contiguous stretches nucleotides shared between each *OsAPx* gene and the target sequence of the RNAi.

Figure 1: Characterization of *OsAPx1/2s* plants silenced on cytosolic *OsAPx* genes. A) Photograph of non-transformed (NT) and two independent lines of *OsAPx1/2s* plants (*OsAPx1/2s-5* and *OsAPx1/2s-13*) grown under controlled conditions. No visible phenotype associated with the reduction of cytosolic *APx* gene expression is shown under these conditions. B) Determination by qRT-PCR of cytosolic *APx* mRNA accumulation on leaves of non-transformed (NT) and silenced plants (*OsAPx1/2s* lines 1, 5, 9, 10, 11, 13, 15, 18, and 23) submitted to controlled conditions of growth. *Fdh* expression was used as internal control. Transcript level of *OsAPx1* and *OsAPx2* present in non-transformed plants was used to normalize transcript accumulation in silenced plants. Values represent the means +/- SD (N=3).

Figure 2: Effect of silencing of cytosolic *OsAPx* genes on the activity of Ascorbate Peroxidase-APx (A), Superoxide dismutase-SoD (B), Catalase-Cat (C), Ascorbate oxidase-AO (D), and the content of TBARS (E), H₂O₂ (F) and AsA (G). Determinations were performed in leaves of 4-week-old transgenic rice *OsAPx1/2s* (black bars) and non-transformed (NT) plants (white bars) grown under control conditions. Values represent the means +/- SD (N=3). Different letters (a-c) at the top of the error bars indicate statistical different means ($P<0.05$).

Figure 3: Expression analyses of *OsAPx* genes in *OsAPx1/2s* plants (black bars) in comparison to the expression observed in non-transformed plants - NT (white bars). The *OsAPx* mRNA accumulation was determined by qRT-PCR using three different constitutive genes to normalize the gene expression. The 10-log graph shows the mean of the three lines of *OsAPx1/2s* plants normalized by the *OsAPx1* transcript accumulation found in NT. Values represent the means +/- SD (N=3).

Figure 4: Response of *OsAPx1/2s* and NT plants to germicidal UV and intense UV-B light stress. A) *In situ* localization of H₂O₂ in leaves of silenced and NT plants (20 days old) submitted to the UV irradiation (two exposures of 15 min to UVC with 15 min of interval). Determinations were performed immediately (t_0) and 30 min (t_{30}) after the end of the stress period. The photograph was taken after DAB reaction. Leaves of *OsAPx1/2s* plants accumulated higher content of H₂O₂ than leaves of non-transformed plants (NT) under germicidal UV stress. B) Effect of UV irradiation (exposure of 4 hours to UVB during two days) on the expression of *OsAPx* genes in NT plants (NT+UV) and silenced plants (*APx1/2s*+UV) (6 months old). Plants maintained under control conditions of growth (NT and *APx1/2s*) were used as control. The *OsAPx* mRNA accumulation was determined by qRT-PCR using three different constitutive genes (elongation factor, *Fdh* and ubiquitine) to normalize the gene expression. Values represent the means +/- SD (N=3). The normalization of all genes was made using the transcript level of *OsAPx1* in NT plants.

Figure 5: Enhanced tolerance to aluminum of *OsAPx1/2s* plants in relation to the non-transformed plants (NT). A) Seedlings were grown on hydroponics medium

supplemented with 20 ppm of aluminum. Experiments were performed with T1 progeny of three *OsAPx1/2s* independent lines (*APx1/2s-5*, *APx1/2s-10* and *APx1/2s-11*). B) *In situ* localization of H₂O₂ determined by DAB staining in leaves of silenced and NT plants submitted to the aluminum stress. Determinations were performed with 20 days old seedlings immediately (+Al 0 min), 30 min (+Al 30 min), 1 hour (+Al 1h), and 1 day (+Al 1day) after the onset of the stress. After 1 hour under 20 ppm aluminum stress transgenic plants *OsAPx1/2s* accumulated higher content of H₂O₂ than NT plants, but it returned to normal level in both plants after 24 hours under stress.

Figure 6: Effect of the exposure to 20 ppm aluminum on the expression of *OsAPx* genes in non-transformed plants (NT+Al) and silenced plants (*APx1/2s*+Al) (5 days old). Plants maintained under control conditions of growth (NT and *APx1/2s*) were used as control. The *OsAPx* mRNA accumulation was determined by qRT-PCR using three different constitutive genes (elongation factor, *FDh* and ubiquitine) to normalize the gene expression. The normalization of all genes was made using the transcript level of *OsAPx1* in NT plants. Values represent the means +/- SD (N=3).

Figure 7: Biochemical characterization of *OsAPX1/2s* plants under aluminum stress. Effect of the silencing of cytosolic *OsAPx* genes on the plants response to aluminum treatment in relation to their activities of APx (A), SoD (B), Cat (C), and to their contents of AsA (D), TBARS (E), and H₂O₂ (F). Determinations were performed in transgenic rice *OsAPx1/2s* (black and dark gray bars) and non-transformed (NT) plants (white and light gray bars) of 8-months-old plants grown under 40 ppm aluminum. Values represent the means +/- SD (N=3). Different letters (a-c) at the top of the error bars indicate statistical different means ($P<0.05$) by the Tukey HSD Test.

Figure 8: Expression analysis of the *OsAPx* genes in response to exogenous H₂O₂ treatment (Seedlings were incubated during 2 h, 4 h or 8 h in MS medium supplemented with 10 μ M H₂O₂). The *OsAPx* mRNA accumulation was determined by qRT-PCR using three different constitutive genes (elongation factor, *Fdh* and ubiquitine) to normalize the gene expression. Values represent the means +/- SD (N=3). * Indicates statistical different means ($P<0.05$) by the Tukey HSD Test.

References

- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639
- Asai N, Matsuyama T, Tamaoki M, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Kato T, Tabata S, Shirano Y, Shibata D, Hayashi H, Mullineaux PM, Saji H** (2002) Characterization of an Arabidopsis mutant deficient in a cytosolic ascorbate peroxidase APX1. *Plant and Cell Physiology* **43**: S196-S196
- Asai N, Matsuyama T, Tamaoki M, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Kato T, Tabata S, Shirano Y, Shibata D, Hayashi H, Mullineaux PM, Saji H** (2004) Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an Arabidopsis mutant by activation of multiple antioxidative systems. *Plant Science* **166**: 1547-1554
- Baier AC, Sommers DJ, Gustafson JP** (1995). Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breeding*, **114**: 291-296.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Cakmak I, Horst WJ** (1991) Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide-dismutase, catalase and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* **83**: 463-468
- Catani MV, Rossi A, Costanzo A, Sabatini S, Levrero M, Melino G, Avigliano L** (2001) Induction of gene expression via activator protein-1 in the ascorbate protection against UV-induced damage. *Biochemical Journal* **356**: 77-85
- Davletova S, Rizhsky L, Liang HJ, Zhong SQ, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R** (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 268-281
- Fourcroy P, Vansuyt G, Kushnir S, Inze D, Briat JF** (2004) Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology* **134**: 605-613

- Furlani AMC, Furlani PR** (1998) Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e de seleção de plantas em condições nutricionais adversas. Technical bulletin Instituto Agronomico de Campinas **121**: 1-34
- Gay C, Collins J, Gebicki JM** (1999) Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. Analytical Biochemistry **273**: 149-155
- Georgiou G** (2002) How to flip the (redox) switch. Cell **111**: 607-610
- Havir EA, McHale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiology **84**: 450-455
- Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant Cell and Environment **23**: 853-862
- Ishikawa T, Yoshimura K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S** (1997) Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. Biochemical Journal **328**: 795-800
- Jespersen HM, Kjaersgard IVH, Ostergaard L, Welinder KG** (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochemical Journal **326**: 305-310
- Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F** (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. Plant Physiology **118**: 1327-1335
- Kampfenkel K, Vanmontagu M, Inze D** (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Analytical Biochemistry **225**: 165-167
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. Methods **25**: 402-408
- Lu ZQ, Liu DL, Liu SK** (2007) Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Plant Cell Reports **26**: 1909-1917
- Mano S, Yamaguchi K, Hayashi M, Nishimura M** (1997) Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. Febs Letters **413**: 21-26

- Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CLA, Margis-Pinheiro M** (2004) Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* **166**: 323-331
- Miki D, Shimamoto K** (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology* **45**: 490-495
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegie A, Koussevitzky S, Mittler R** (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses(1[W][OA]). *Plant Physiology* **144**: 1777-1785
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M** (2004) Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L-pennellii* - a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant Cell and Environment* **27**: 237-250
- Moradas-Ferreira P, Costa V** (2000) Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report* **5**: 277-285
- Mou Z, Fan WH, Dong XN** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944
- Mullineaux PM, Karpinski S, Baker NR** (2006) Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiology* **141**: 346-350
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**: 867-880
- Passardi F, Bakalovic N, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M, Penel C, Dunand C** (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* **89**: 567-579

- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R** (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *Plant Journal* **34**: 185-201
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D, Mittler R** (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal* **32**: 329-342
- Ros Barceló A** (2005) Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* **220**: 747-756
- Rossel JB, Walter PB, Hendrickson L, Chow WS, Poole A, Mullineaux PM, Pogson BJ** (2006) A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant Cell and Environment* **29**: 269-281
- Sanmartin M, Pateraki I, Chatzopoulou F, Kanellis A** (2007) Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress. *Planta* **225**: 873-885
- Scandalios JG** (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* **27**: 483-486
- Schraudner M, Moeder W, Wiese C, Van Camp W, Inze D, Langebartels C, Sandermann H** (1998) Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant Journal* **16**: 235-245
- Sharma P, Dubey RS** (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science* **167**: 541-550
- Sharma P, Dubey RS** (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports* **26**: 2027-2038
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1305-1319
- Smirnoff N** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229-235

- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* **224**: 300-314
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2004) Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: Inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution* **59**: 761-770
- Upadhyaya NM, Surin B, Ramm K, Gaudron J, Schunmann PHD, Taylor W, Waterhouse PM, Wang MB** (2000) Agrobacterium-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 201-210
- van Rossum M, Alberda M, van der Plas LHW** (1997) Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science* **130**: 207-216
- Xing W, Huang WM, Li DH, Liu YD** (2007) Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency, and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Current Microbiology* **55**: 94-98
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* **123**: 223-233
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2002) Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 40623-40632

Table 1.

	<i>OsAPx1</i>	<i>OsAPx2</i>	<i>OsAPx3</i>	<i>OsAPx4</i>	<i>OsAPx5</i>	<i>OsAPx6</i>	<i>OsAPx7</i>	<i>OsAPx8</i>
RNAi <i>OsAPx1/2</i> (250 nt)	82% (26 nt)	100% (250 nt)	61% (9 nt)	60% (14 nt)	55% (9 nt)	57% (8 nt)	62% (9 nt)	58% (12 nt)

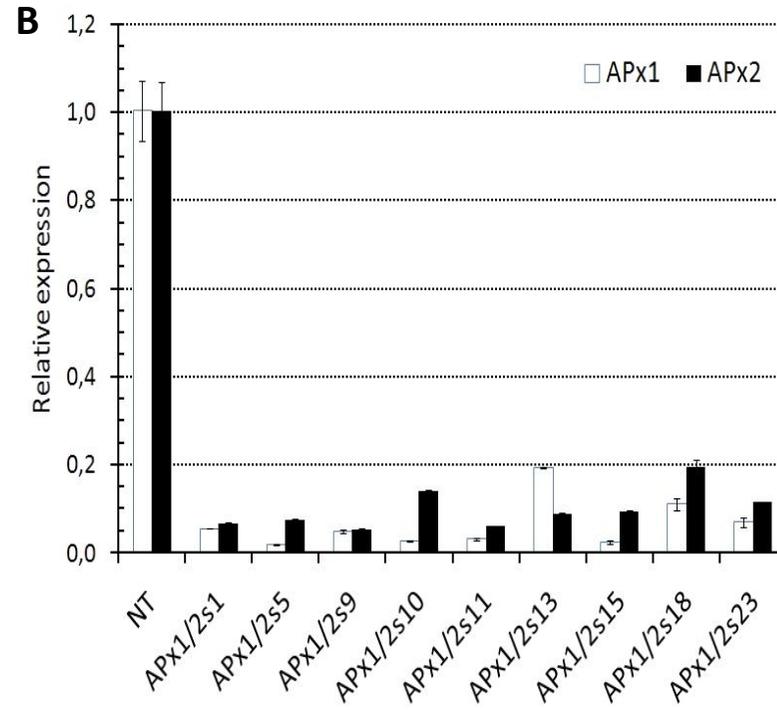


Figure 1.

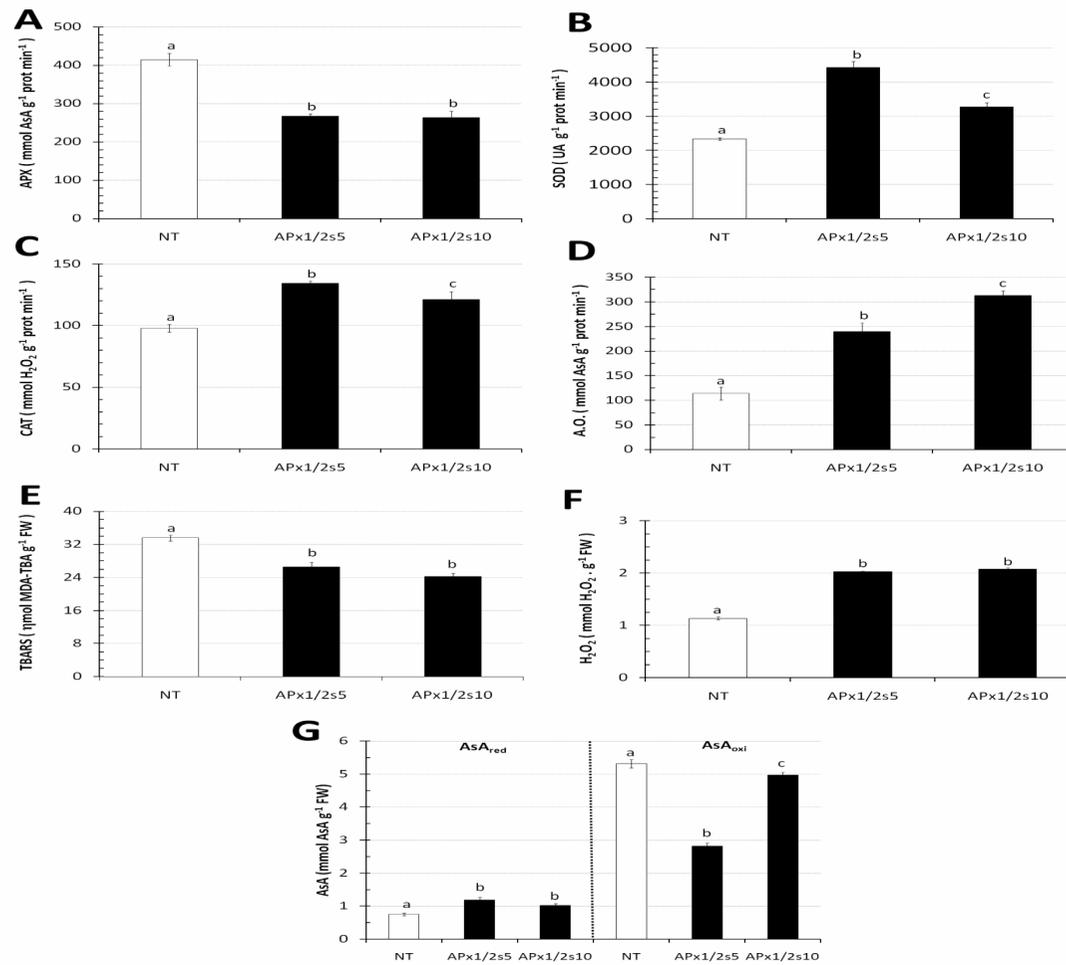


Figure 2.

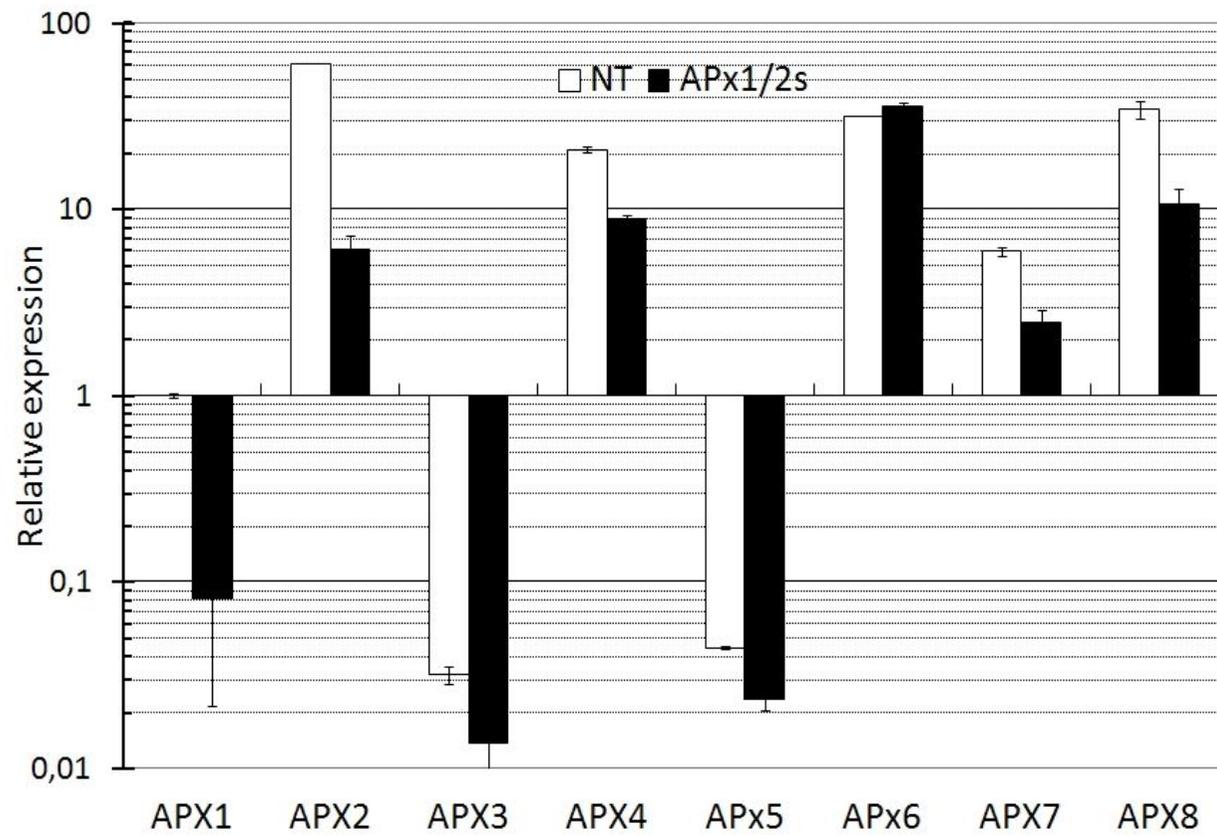
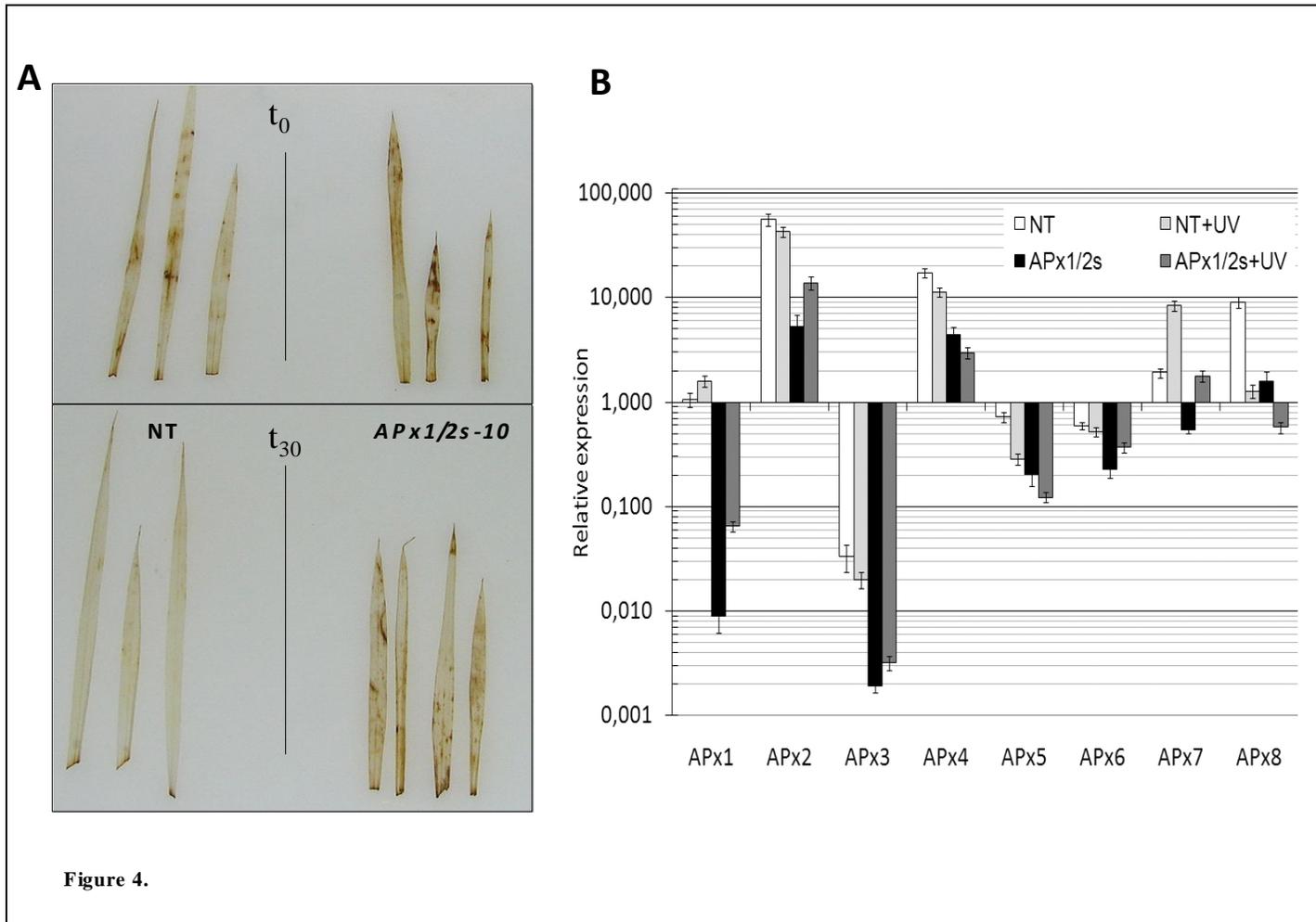
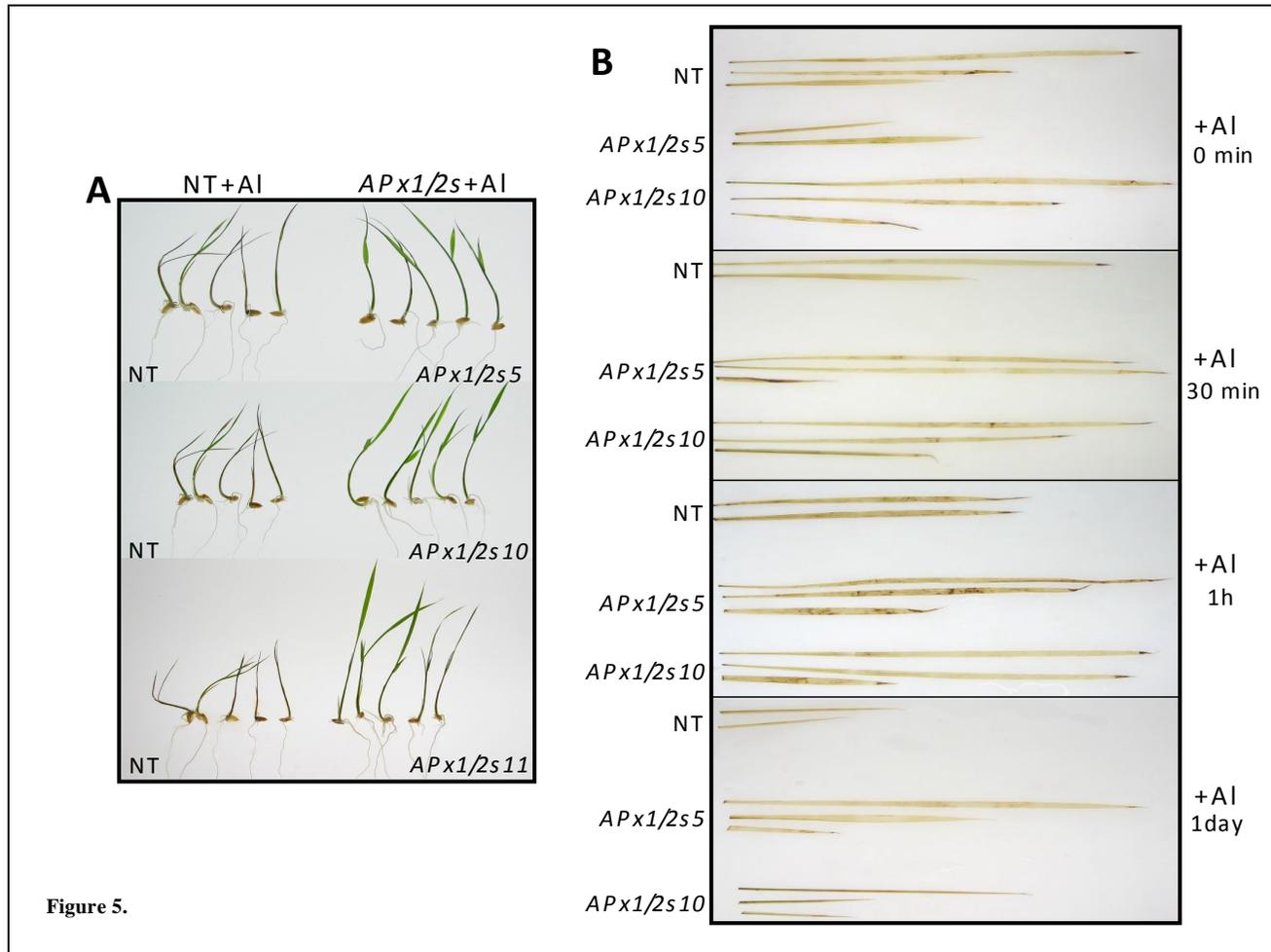


Figure 3.





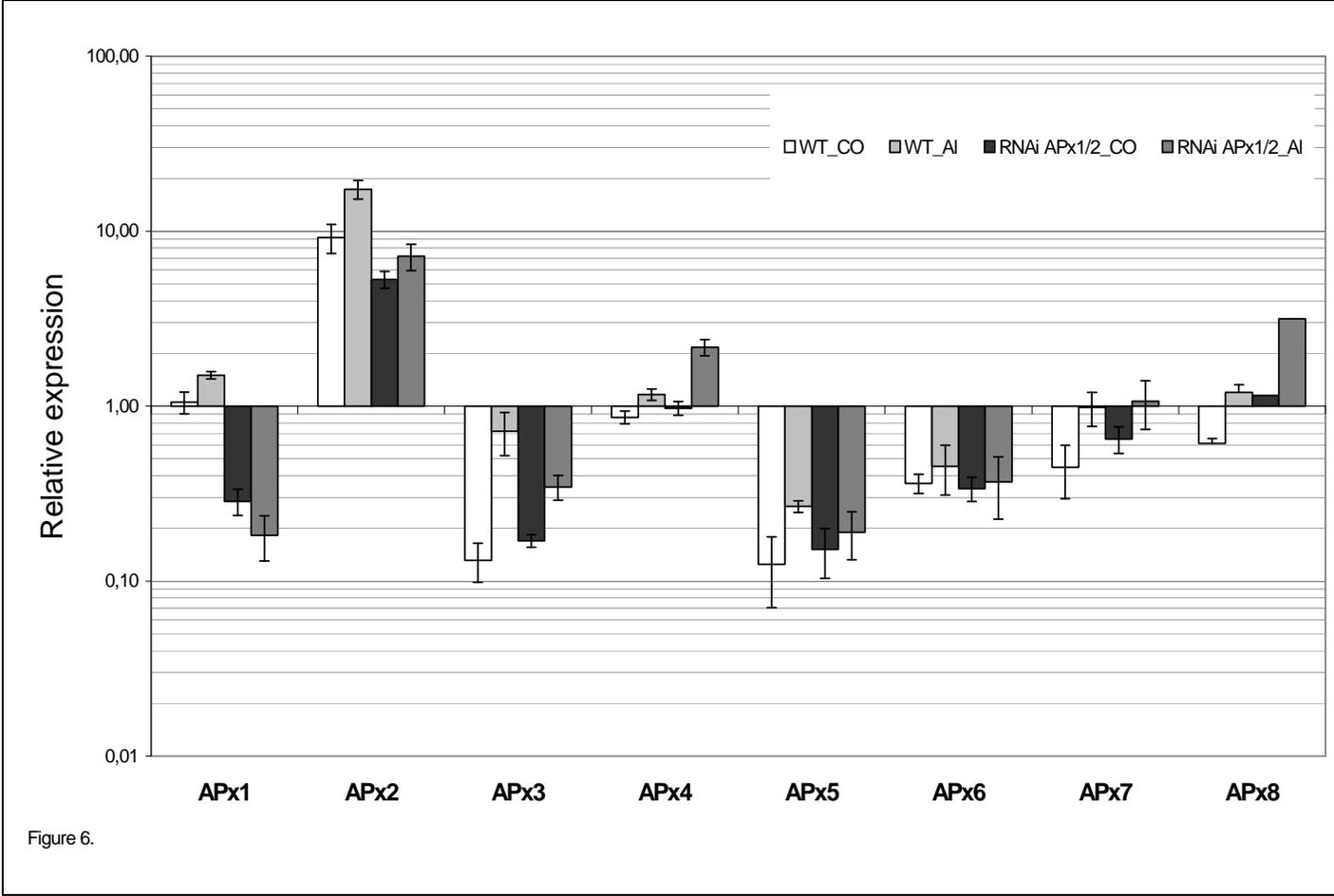


Figure 6.

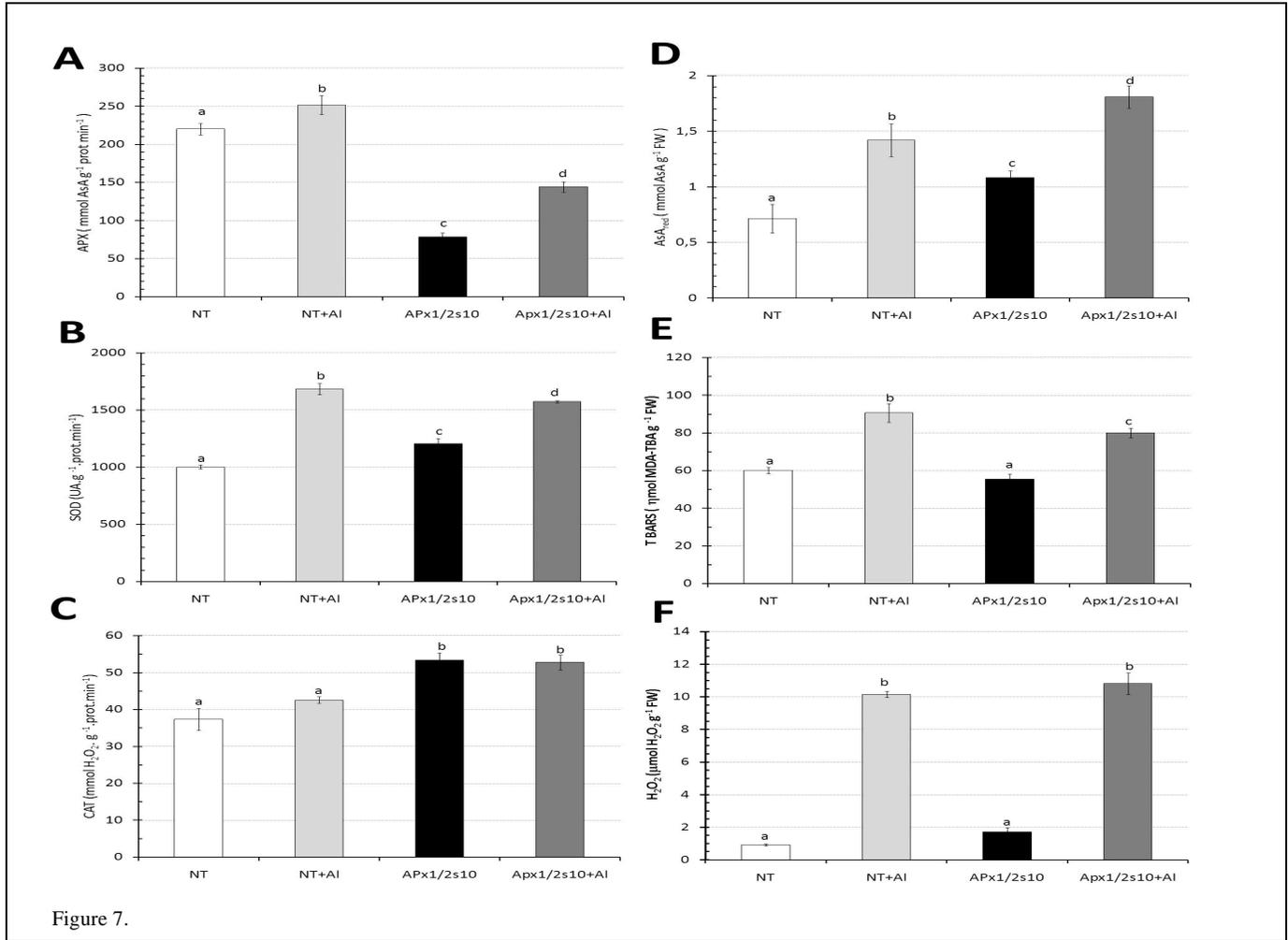


Figure 7.

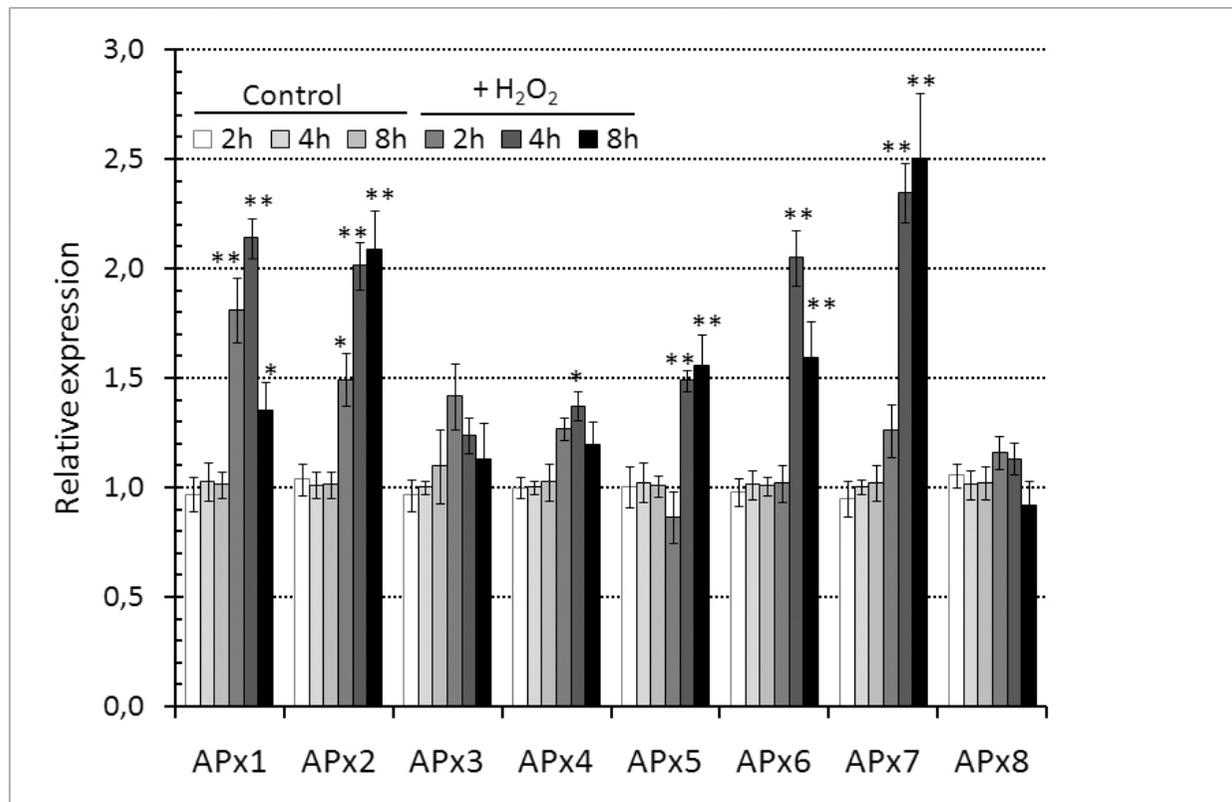


Figure 8.

Alguns resultados obtidos referentes à caracterização das plantas *OsAPx1/2s* não foram incluídos no artigo previamente apresentado e serão detalhados a seguir.

O estresse com alumínio 100 ppm foi conduzido em hidroponia por 14 dias. O pH da solução controle foi mantido em 4,0 para reduzir interferentes do estresse. A Figura 7 mostra 3 plantas NT e 3 plantas das linhagens 5 e 10 de *OsAPx1/2s* submetidas ao estresse com alumínio e crescidas na solução hidropônica com pH 4,0. As plântulas com redução da expressão de *OsAPx* citosólicas mostraram maior sensibilidade ao estresse com alumínio 100 ppm. As partes aéreas das plantas RNAi apresentaram-se necrosadas na quase totalidade de seu volume foliar. As plantas NT, após 14 dias de estresse, diferentemente das plantas RNAi, apresentavam folhas expandidas. As plantas na condição controle não diferiram entre si.

Plântulas de 1 mês de idade foram submetidas ao estresse com alta intensidade de radiação UV-B. O efeito da luz UV-B nas plântulas RNAi não foi visualmente diferente do efeito sobre as plântulas não-transformadas. Da mesma forma, os conteúdos de clorofila-A não variaram significativamente entre as plântulas tratadas (dados não apresentados).

Os experimentos de estresse com alumínio e alta intensidade de luz UV-B em plantas jovens foram realizados com plântulas transformadas da primeira geração (T1). A utilização de T1 nestes experimentos foi possível, pois quase a totalidade das plântulas T1 apresentaram reação de PCR positiva para o T-DNA contendo a construção RNAi. A Tabela 3 mostra a proporção de plantas T1 transgênicas.



Figura 7. Plantas *OsAPx1/2s* linhagens 5 e 10 e plantas não-transformadas (NT) submetidas à solução hidropônica pH 4,0 com alumínio 100 ppm (7.1) e na ausência de alumínio (7.2). As plantas foram mantidas em solução hidropônica por 14 dias.

Tabela 3. Análise quanto a presença do T-DNA contendo a construção RNAi nas plantas T1 *OsAPx1/2s* por PCR utilizando iniciadores específicos para os genes *Hpt* ou *Gus*.

Linhagem	Plantas Analisadas	Plantas Transgênicas
<i>OsAPx1/2s-5</i>	11	9
<i>OsAPx1/2s-9</i>	18	14
<i>OsAPx1/2s-10</i>	41	39
<i>OsAPx1/2s-11</i>	18	15

Plantas *OsAPx1s* silenciadas no gene *OsAPx1*

A transformação de plantas contendo a construção RNAi para o silenciamento do gene *OsAPx1* resultou na produção de 4 linhagens independentes de plantas *OsAPx1s*, confirmadas por reações de PCR. As 4 linhagens *OsAPx1s* apresentaram o mesmo fenótipo nas condições ideais de crescimento. As plantas *OsAPx1s* apresentam retardo no desenvolvimento, com redução do crescimento e parte aérea visualmente débil. No estágio de florescimento, comparando-as com plantas não-transformadas, as plantas *OsAPx1s* mostraram-se estéreis (Figura 8). As plantas *OsAPx1s* apresentaram morte precoce.

Após a confirmação por PCR da inserção da construção RNAi nas plantas regeneradas, foi feita análise por RT-PCR quantitativo da expressão transcricional dos genes da família *OsAPx* nas plantas RNAi. Inicialmente, foi extraído RNA total utilizando Trizol (Figura 9.1) e sintetizado cDNA. A qualidade do cDNA foi analisada por reação de PCR utilizando iniciadores desenhados para amplificar o gene *OsPip1.2* (Figura 9.2). Estas análises foram conduzidas para as plantas transgênicas contendo as diferentes construções RNAi.

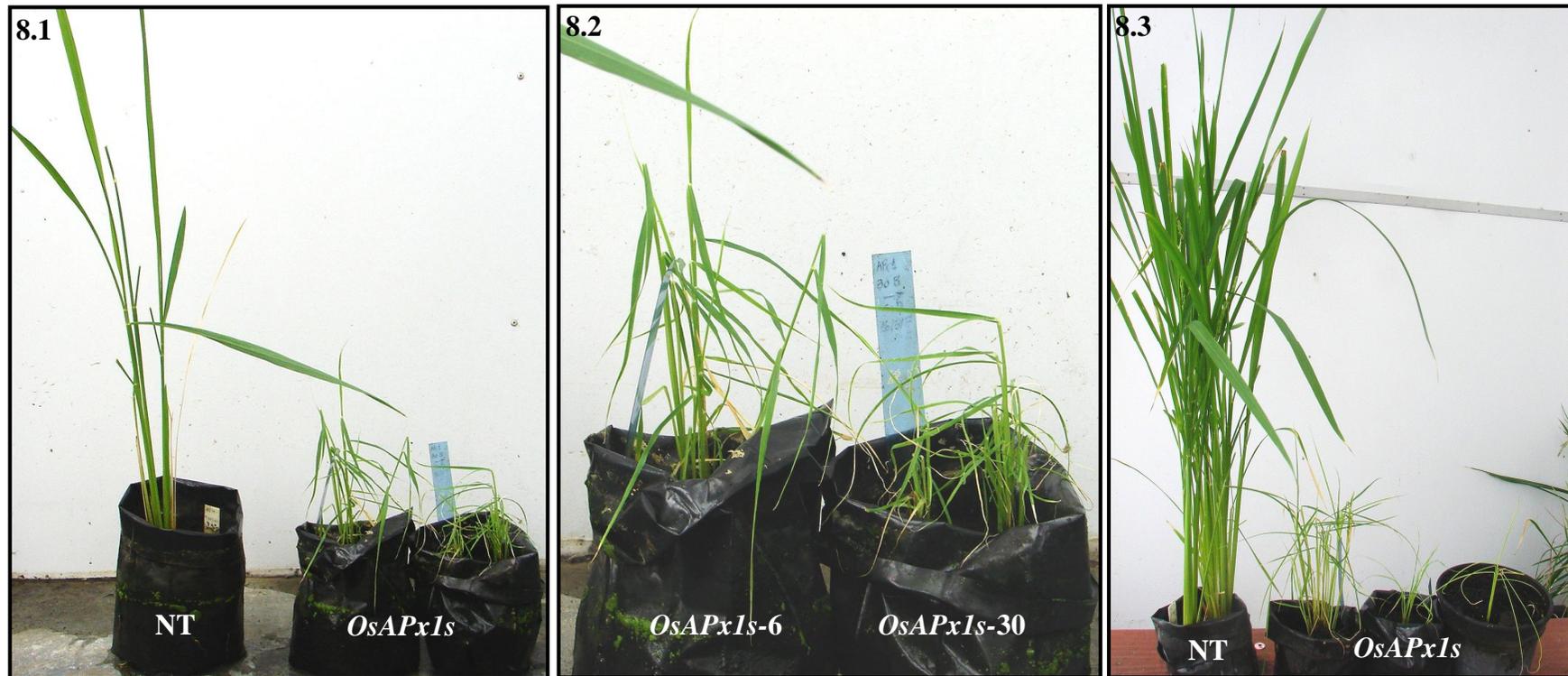


Figura 8. Plantas de arroz contendo a construção para silenciamento de *OsAPx1* e plantas não-transformadas. As plantas nas fotos 8.1 e 8.2 estão no solo há dois meses (fotoperíodo de 12h, 28° C). Na foto 8.3, são apresentadas planta não-transformada (NT) e 3 diferentes linhagens de *OsAPx1s* (linhagens 6, 30 e 40). A planta NT, com mesma idade das plantas RNAi (3 meses no solo), está em estágio de florescimento.

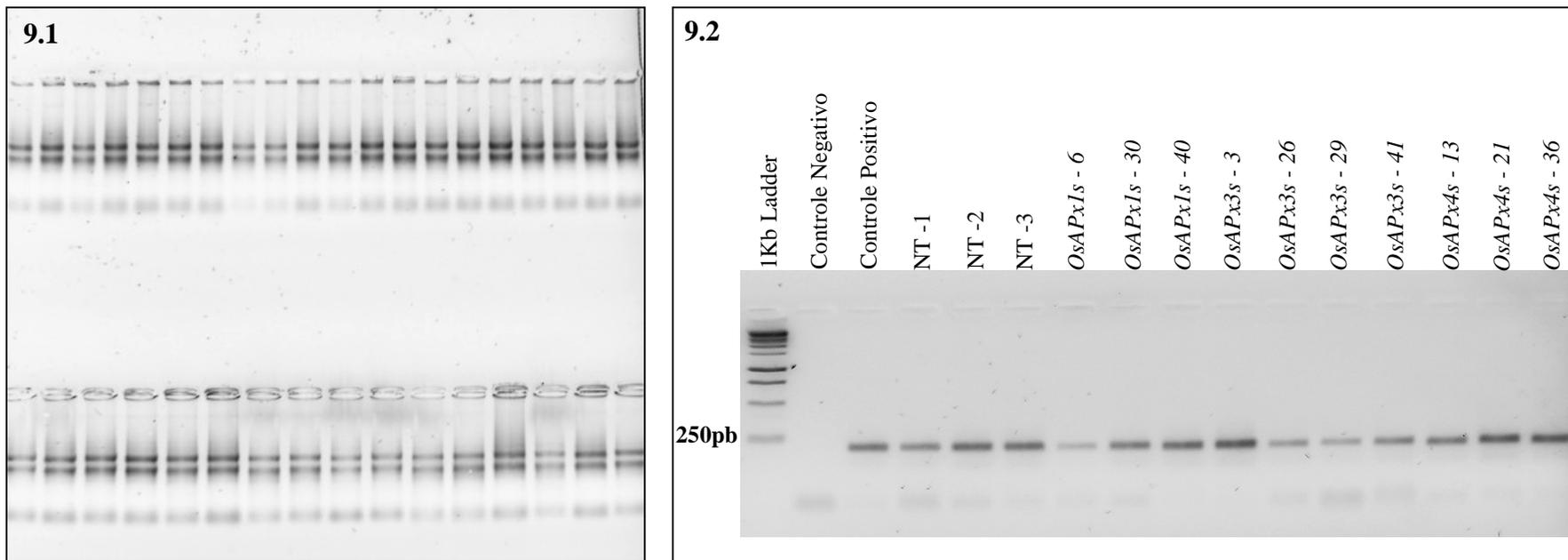


Figura 9. Avaliação da qualidade do RNA total extraído e do cDNA sintetizado. 9.1) Gel de agarose ilustrativo do RNA total extraído. 9.2) Resultado do PCR do cDNA de folhas de plantas RNAi. A reação de PCR foi realizada com iniciadores *OsPip1.2*

Os resultados obtidos por RT-PCR quantitativo confirmaram a redução da expressão transcricional do gene *OsAPx1* nas plantas *OsAPx1s* com 2 meses em solo (Figura 10). O nível do silenciamento pós-transcricional por RNAi foi diferente em cada linhagem. As linhagens 6 e 40 apresentaram redução de cerca de 75% na expressão de *OsAPx1*, enquanto este gene foi reduzido 96% nas folhas de *OsAPx1s-30*.

A expressão transcricional dos genes *OsAPx2*, *OsAPx3*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8* não foi alterada nas plantas *OsAPx1s*. O silenciamento do gene *OsAPx1* resultou na redução do acúmulo do RNA mensageiro dos genes *OsAPx4* peroxissomal e *OsAPx5* mitocondrial (diferença significativa pelo Teste Tukey HSD, $p < 0.01$).

A análise da expressão transcricional dos genes da família *OsAPx* mostrou que *OsAPx2* e *OsAPx4* são os genes com maior expressão na folha de plantas jovens *OsAPx1s*, assim como em plantas NT de mesma idade. O gene *OsAPx3*, seguido do gene *OsAPx5*, apresenta menor expressão dentro da família *OsAPx* nas condições analisadas (Figura 10).

Plantas *OsAPx2s* silenciadas no gene *OsAPx2*

A transformação de calos com a construção RNAi visando o silenciamento pós-transcricional de *OsAPx2* resultou em apenas 1 linhagem independente: *OsAPx2s-13*. As plantas deste evento possuem redução de tamanho da parte aérea quando comparadas com plantas não-transformadas (Figura 11). As plantas *OsAPx2s* ainda não alcançaram o estágio de florescimento.

Apesar da inserção do vetor ter sido confirmada por PCR, os resultados de RT-PCR quantitativo mostraram que não ocorreu redução do acúmulo de mRNA do gene *OsAPx2* em 3 diferentes plantas da linhagem *OsAPx2s-13* (Figura 12), assim como não ocorreu alteração na expressão dos transcritos dos outros genes *OsAPx* em condição ideal de crescimento (variação não significativa pelo teste-T).

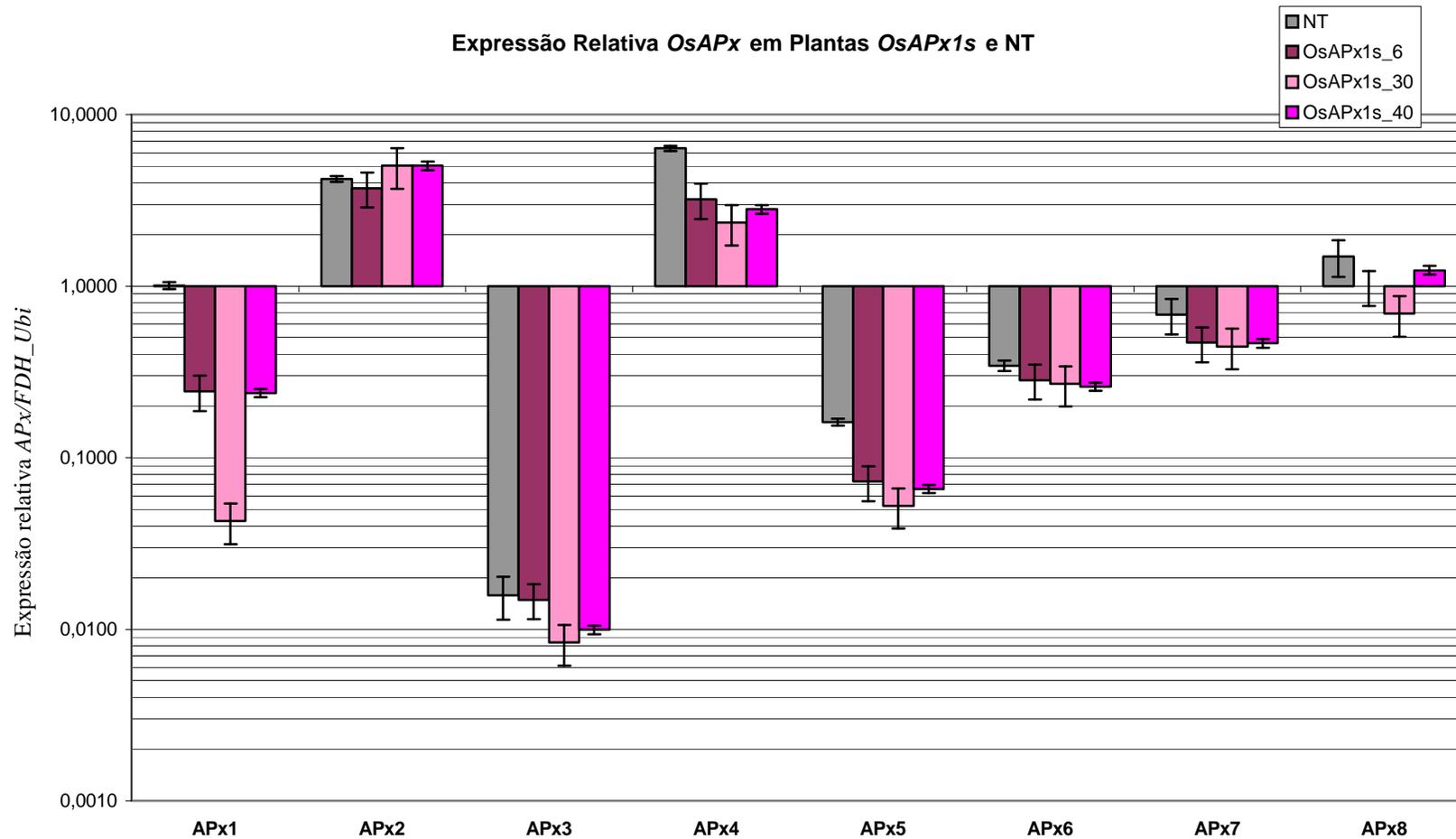


Figura 10. Expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx1s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *Fdh* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e em 3 linhagens *OsAPx1s* (2 meses no solo). A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas NT.

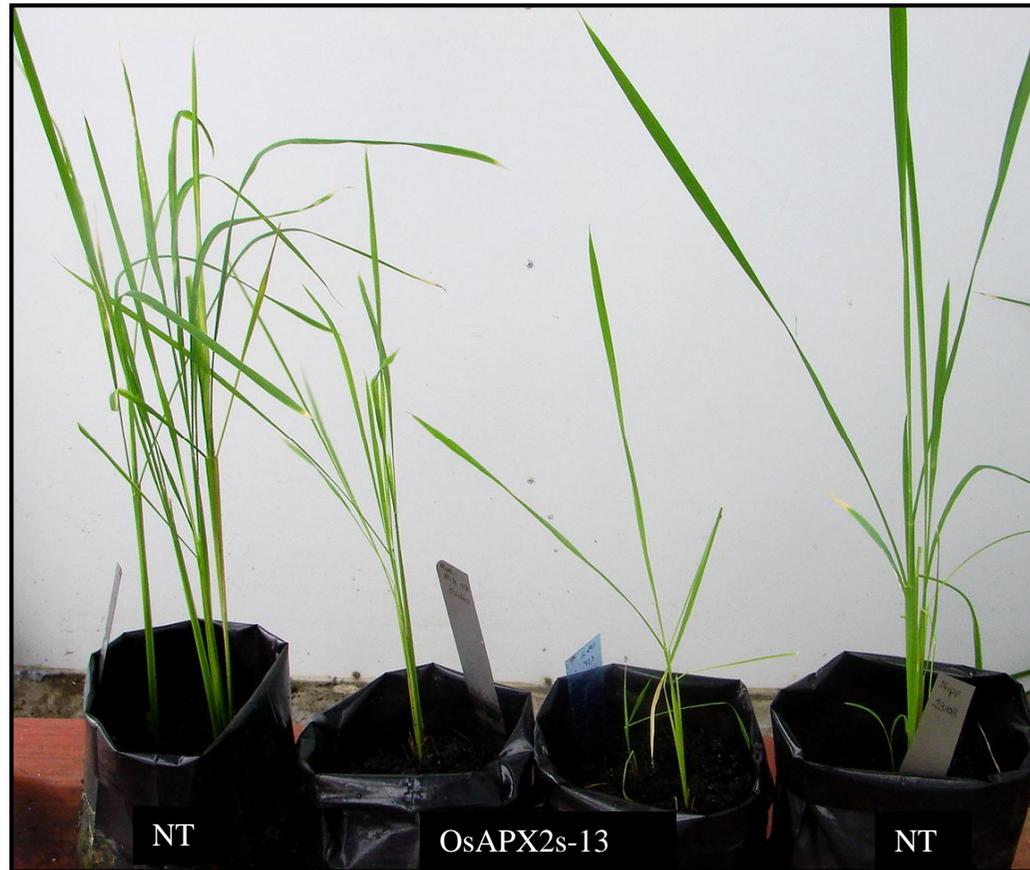


Figura 11. Plantas de arroz contendo a construção para silenciamento de *OsAPx2* e plantas não-transformadas (NT). Na foto são apresentadas plantas NT e 2 plantas da linhagem *OsAPx2s-13* com 2 meses no solo (fotoperíodo de 12h, 28° C).

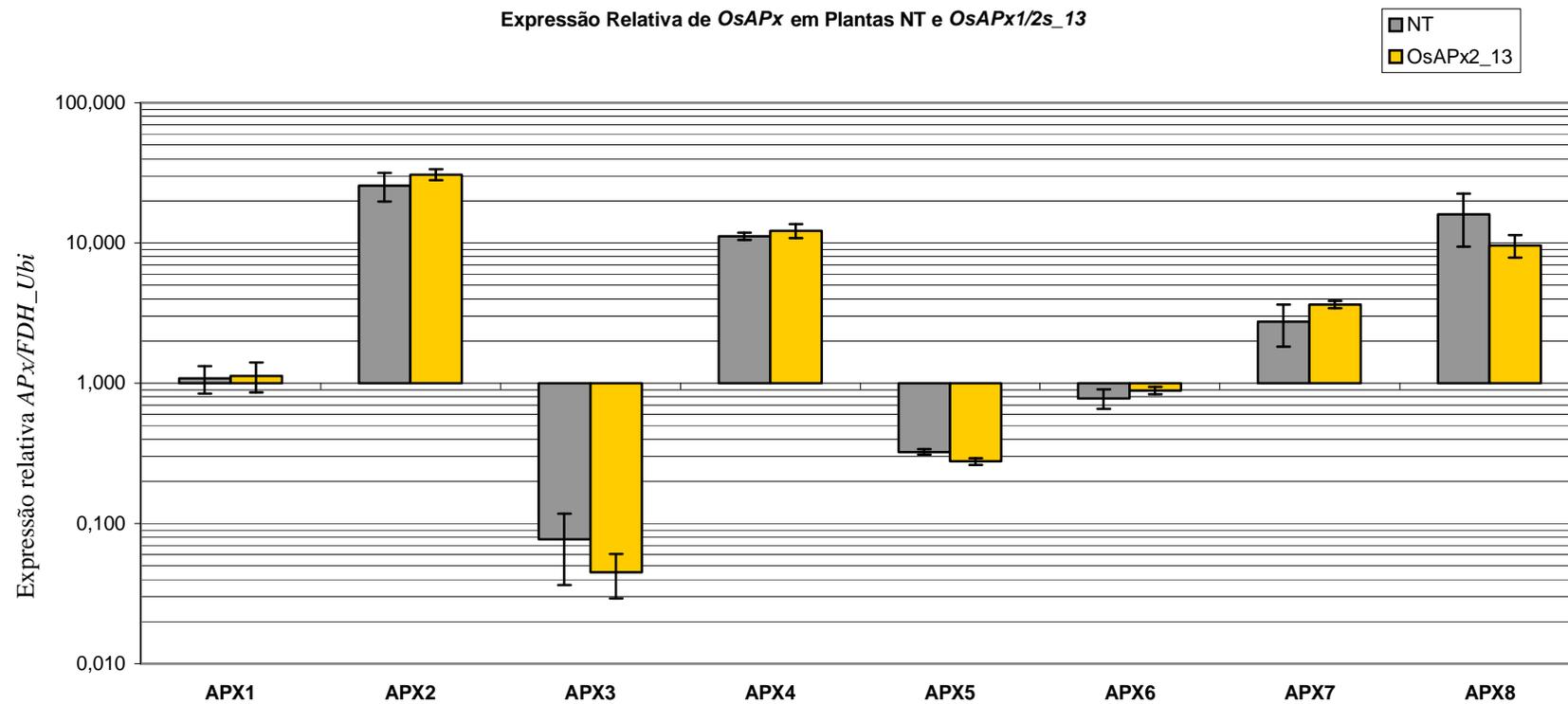


Figura 12. Expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx2s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *Fdh* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e média de 3 plantas da linhagem *OsAPx2s-13* (2 meses no solo). A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas NT.

6.3. Caracterização funcional das ascorbato peroxidases peroxissomais

Silenciamento simultâneo dos genes *OsAPx3* e *OsAPx4*

Seis diferentes linhagens *OsAPx3/4s* foram regeneradas contendo a construção RNAi para o silenciamento de ambos os genes peroxissomais. O tamanho das plantas *OsAPx3/4s* é levemente inferior ao das plantas não-transformadas crescidas em condições ideais de cultivo (Figura 13). Apesar do florescimento das plantas *OsAPx3/4s*, poucas panículas forneceram sementes. A maioria das panículas continha cariopsis vazias. As plantas *OsAPx3/4s* e as correspondentes não-transformadas de mesma idade são ainda mantidas na casa de vegetação. Após 1 ano em solo, as plantas *OsAPx3/4s* perderam a capacidade de florescer, diferentemente das plantas controle que ainda fornecem sementes. As plantas com redução de ambas *OsAPx* peroxissomais parecem mais sensíveis à senescência do que as plantas não-transformadas (dado não apresentado).

A expressão relativa dos genes *OsAPx* de quatro diferentes linhagens de *OsAPx3/4s* foi avaliada por RT-PCR quantitativo (Figura 14). As quatro linhagens avaliadas apresentaram redução da expressão de ambos genes peroxissomais. O silenciamento pós-transcricional mostrou-se mais efetivo para o gene *OsAPx3*. As plantas *OsAPx3/4s* da linhagem 14 mantiveram apenas 1,5% da expressão do gene *OsAPx3*. Nas outras linhagens, a expressão deste gene foi reduzida de 84 a 94% quando comparada com a expressão em planta não-transformada. A expressão do gene *OsAPx4* foi reduzido cerca de 90% nas 4 linhagens avaliadas. O silenciamento por RNAi dos genes *OsAPx* peroxissomais não afetou significativamente a expressão transcricional dos outros genes da família *OsAPx* (diferença não significativa pelo Teste Tukey HSD, $p < 0.01$).



Figura 13. Plantas de arroz contendo a construção para silenciamento de *OsAPx3* e *OsAPx4* (*OsAPx3/4s*) e plantas não-transformadas (NT) (fotoperíodo de 12h, 28° C).

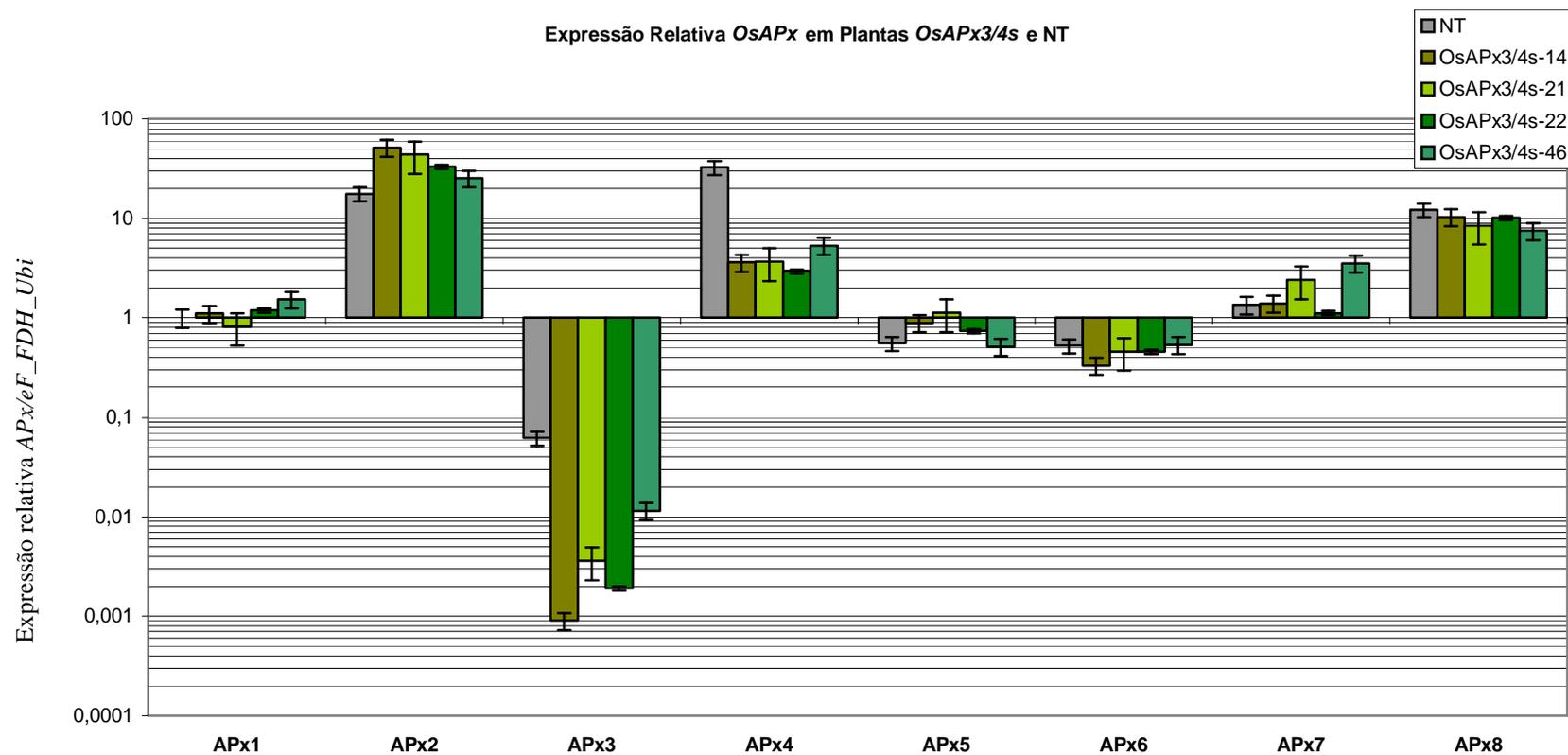


Figura 14. Expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx3/4s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *Fdh*, *eF α 1* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e em 4 linhagens *OsAPx3/4s* (3 meses no solo). A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas NT.

Plantas *OsAPx3s* silenciadas do gene *OsAPx3*

Foram obtidas 4 linhagens independentes de plantas contendo o inserto visando o silenciamento do gene *OsAPx3* peroxissomal. O resultado da PCR utilizando os iniciadores para os genes *Hpt* ou *Gus* foi positivo para todas as plantas *OsAPx3s* obtidas.

O tamanho das plantas *OsAPx3s* é levemente reduzido quando comparado com plantas não-transformadas de mesma idade e crescidas em igual condição de desenvolvimento (Figura 15). Poucas sementes foram obtidas das plantas *OsAPx3s*, apesar do desenvolvimento inicial normal da panícula. Na senescência, praticamente todas as folhas das plantas *OsAPx3s* estão mortas, diferentemente das plantas não-transformadas de mesma idade (dados não apresentados).

A análise da expressão transcricional de *OsAPx3* por RT-PCR quantitativo confirmou a redução da expressão em 2 linhagens analisadas (Figura 16). Comparando com plantas não-transformadas, a linhagem *OsAPx3s-3* manteve apenas 3% da expressão transcricional de *OsAPx3*. A linhagem *OsAPx3s-26* apresentou redução de aproximadamente 65% da expressão do gene alvo em plantas não-transformadas. A linhagem *OsAPx3s-29* foi analisada 3 vezes, inclusive RNA de diferentes plantas da linhagem foi utilizado para síntese de cDNA desta linhagem. Entretanto, a expressão de *OsAPx3* não foi detectada nas concentrações usuais de cDNA utilizado para as reações de PCR em tempo real. Com o mesmo cDNA foi possível analisar outros genes da família de *OsAPx*. Diante deste resultado, postulamos que a expressão do gene *OsAPx3* na linhagem 29 é inferior à sensibilidade do aparelho. Por outro lado, a linhagem *OsAPx3-41* apresentou elevação da expressão de *OsAPx3* (dados não apresentados), que pode ter sido causado pela inserção do T-DNA em um gene ou região envolvidos na regulação da expressão do próprio gene *OsAPx3*. Como descrito por diversos pesquisadores, os genes *APx* são regulados por diversos fatores ambientais e moléculas sinalizadoras endógenas (ZHANG *et al.*, 1997; YOSHIMURA *et al.*, 2000; ROSSEL *et al.*, 2006; ZAVALETA-MANCERA *et al.*, 2007).

A expressão transcricional de *OsAPx4* foi afetada pelo silenciamento pós-transcricional de *OsAPx3* (diferença significativa pelo Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$). A redução da expressão de *OsAPx4* foi mais intensa quanto maior o nível de silenciamento de *OsAPx3*. A expressão transcricional dos outros genes da família *OsAPx* não foi alterada.



Figura 15. Plantas de arroz contendo a construção para silenciamento de *OsAPx3* (*OsAPx3s*) e plantas não-transformadas (NT) (fotoperíodo de 12h, 28° C).

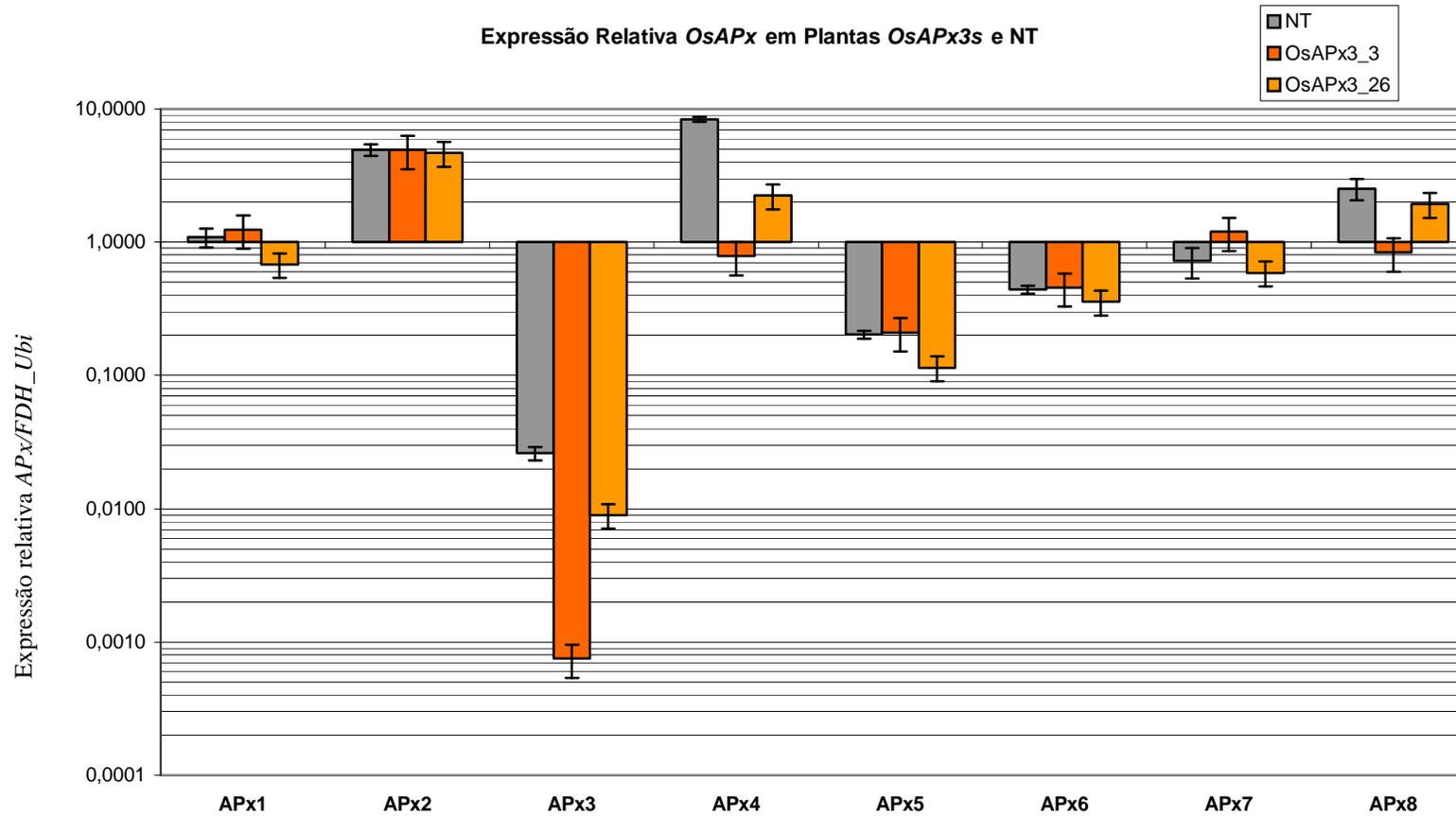


Figura 16. Expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx3s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *Fdh* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e em 2 linhagens independentes *OsAPx3s* (4 meses no solo). A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas NT.

Plantas *OsAPx4s* silenciadas do gene *OsAPx4*

A transformação de calos de arroz com a construção *OsAPx4s* resultou na produção de 3 linhagens, confirmadas por reações de PCR com os iniciadores para os genes *Gus* e *Hpt*. As plantas *OsAPx4s* não apresentaram nenhuma variação no seu desenvolvimento até a etapa de florescimento (Figura 17). Assim como nas outras linhagens de silenciamento de *OsAPx* peroxissomal, poucas sementes foram obtidas. As plantas transgênicas na senescência estão mais deterioradas que plantas não-transformadas (dado não apresentado).

As 3 linhagens *OsAPx4s* apresentam redução da expressão transcricional de *OsAPx4* (Figura 18). A redução da expressão do gene alvo entre as linhagens variou entre 83% e 96% da expressão observada nas plantas não-transformadas. Pelo teste de Tukey HSD, considerando a média das 3 linhagens, o silenciamento pós-transcricional de *OsAPx4* não afetou a expressão dos outros genes da família *OsAPx* ($p < 0,05$).



Figura 17. Plantas de arroz contendo a construção para silenciamento de *OsAPx4* (*OsAPx4s*) e plantas não-transformadas (NT)(fotoperíodo de 12h, 28° C).

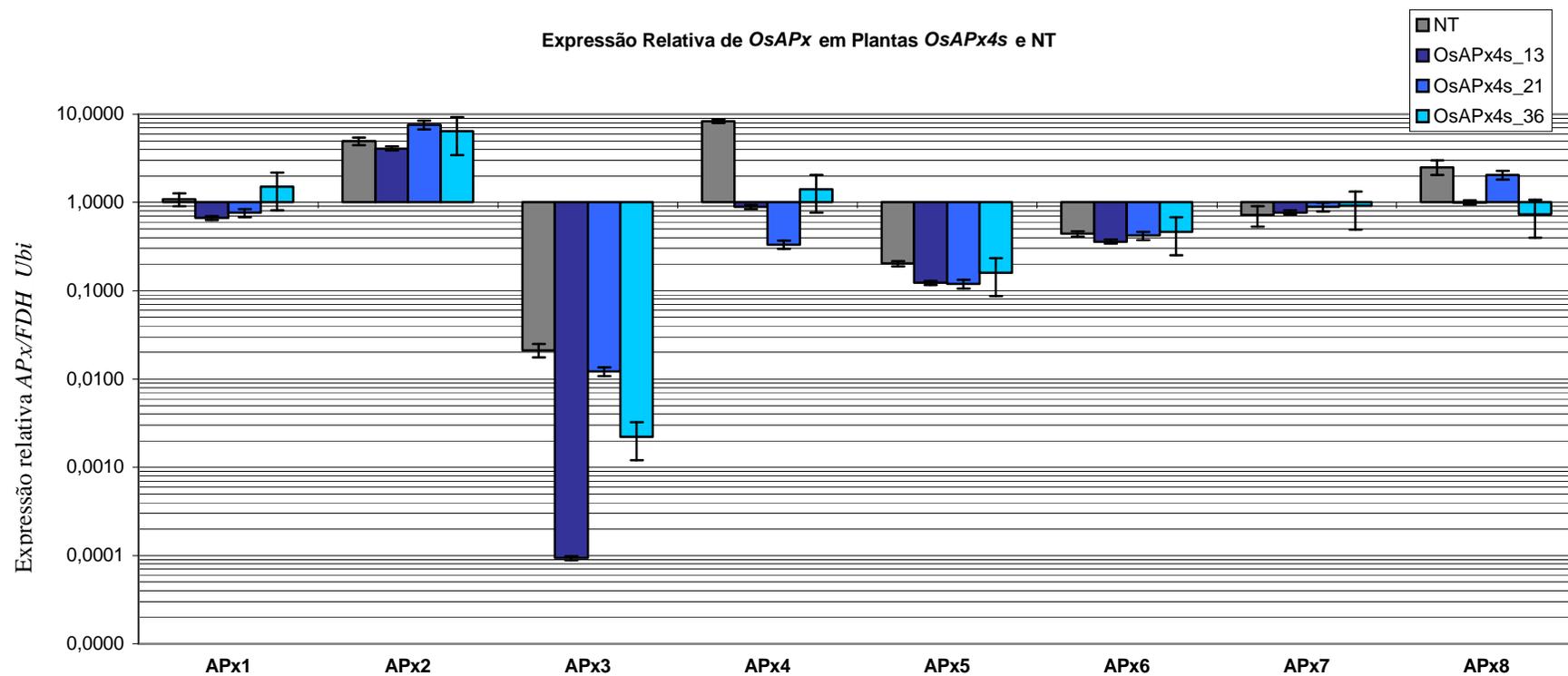


Figura 18. Expressão relativa dos genes da família *OsAPx* em plantas *OsAPx4s* por RT-PCR quantitativo. O gráfico representa o logaritmo da expressão dos genes *OsAPx* relativo à expressão dos genes *Fdh* e *Ubiquitina* em plantas não-transformadas (NT) e em 3 linhagens *OsAPx4s* (4 meses no solo). A normalização dos resultados foi feita em relação à expressão relativa do gene *OsAPx1* em plantas NT.

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os organismos aeróbicos produzem continuamente ERO resultantes do metabolismo do oxigênio atmosférico. As ERO são produzidas principalmente nos cloroplastos e peroxissomos, nos quais ocorrem os processos de fotossíntese e fotorrespiração. Esses processos são considerados as principais fontes de ERO em condições normais de crescimento. Condições ideais dificilmente são possíveis no cultivo de plantas. Geralmente, as culturas são desafiadas por múltiplos estresses, sendo esses tanto bióticos quanto abióticos. A necessidade de plantas resistentes a diversos estresses torna a enzima APx alvo interessante para estudo, uma vez que está envolvida com vias múltiplas de resposta a estresses. O ataque por patógeno, seca, salinidade, geada são desafios para o aumento da produção de sementes. Os diferentes estresses bióticos e abióticos envolvem aumento da produção de ERO. Como consequência, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes adequados para a decomposição destas moléculas tóxicas e para evitar o estresse oxidativo. O conhecimento dos mecanismos antioxidantes pode conduzir a descoberta de gene, conjunto de genes ou vias metabólicas capazes de proporcionar resistência múltipla aos diferentes estresses, o que resultaria em plantas com melhor qualidade, maior produção e com menor degradação ambiental.

A APx é uma enzima fundamental no desenvolvimento adequado das plantas. Davletova e colaboradores (2005) mostraram que o nocaute da *cAPx* resulta na redução da capacidade fotossintética. Plantas com redução da atividade de *tAPx* apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo (TARANTINO *et al.*, 2005). Comparando cultivares tolerantes à seca com cultivares sensíveis, observou-se que as plantas tolerantes analisadas apresentavam maior atividade total de APx. As pesquisas envolvendo mecanismos antioxidantes mostram a importância da APx tanto em condições ideais de crescimento, como durante períodos de estresses. A presença de famílias multigênicas codificantes de APx em diversas plantas confirma a importância desta enzima para os vegetais (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Apesar de muitos estudos terem sido realizados visando a caracterização funcional da APx, pouco foi elucidado em arroz, planta modelo entre as monocotiledôneas. Além disso, o papel de cada isoenzima de APx ainda não foi compreendido. Cada isoforma de APx atua aparentemente de maneira diferente dentro do âmbito celular, uma vez que a

expressão e a atividade de cada APx é variável em resposta a diferentes estresses e nas fases do desenvolvimento, como descrito por YOSHIMURA *et al.*, 2000; AGRAWAL *et al.*, 2003; MENEZES-BENAVENTE *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004 e TEIXEIRA *et al.*, 2006, entre outros. Inclusive, em cada planta a função das isoformas de APx pode ser distinta (RIZHSKY *et al.*, 2002; PNUELI *et al.*, 2003).

Visando a caracterização funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais, desenvolvemos plantas de arroz com redução da expressão dos genes *OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx3* e *OsAPx4*. A estratégia utilizada foi o silenciamento pós-transcricional via RNAi, utilizando construções para formação de estrutura em grampo de mRNA para o silenciamento específico de cada gene e para o silenciamento simultâneo dos genes codificantes de APx de mesma localização subcelular.

Foram obtidas plantas transgênicas contendo inserto de T-DNA para cada uma das construções RNAi desenvolvidas. O efeito do RNAi no acúmulo de mRNA do gene alvo foi distinto em cada linhagem obtida, chegando a uma redução de cerca de 97% da expressão do gene alvo em *OsAPX3s*. O promotor de ubiquitina de milho foi utilizado para dirigir a expressão de todas as seqüências RNAi inseridas na cultivar Nipponbare de *Oryza sativa* L. subespécie *japonica*. A variação na redução da expressão do gene alvo pode ter sido consequência do número de cópias inseridas e/ou do local da inserção do T-DNA contendo a construção RNAi. Efeitos epigenéticos podem estar regulando a expressão das construções RNAi.

A linhagem obtida de *OsAPx2s* não apresentou redução da expressão do gene *OsAPx2*, apesar do T-DNA contendo a construção *OsAPx2s* ter sido inserido no seu genoma, resultado confirmado por PCR. Possivelmente, o T-DNA nesta linhagem foi inserido em região pouco expressa, resultando na pequena expressão transcricional do transgene. Além disso, entre os genes da família *OsAPx*, o *OsAPx2* é um dos genes mais expressos em folhas. A pequena expressão da construção RNAi *OsAPx2s* combinada com a alta expressão endógena do gene alvo também podem ter contribuído ou ter sido uma outra causa do não silenciamento do gene *OsAPx2* nestas plantas transgênicas.

As plantas RNAi obtidas foram avaliadas fenotipicamente em condições ideais de crescimento. Como descrito no artigo que faz parte da presente dissertação, as plantas *OsAPx1/2s* não apresentam variação morfológica visível ao serem comparadas com plantas não-transformadas em condições normais. Entretanto, as plantas *OsAPx1s* com redução da

expressão apenas do gene citosólico *OsAPx1* desenvolveram-se deficientemente, como plantas anãs. Outros trabalhos envolvendo mutantes *APx* citosólicas mostraram que a redução da expressão deste gene resultou em plantas com crescimento reduzido (DAVLETOVA *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2007). Além da importância da *APx* no desenvolvimento normal de plantas, o citosol é uma região considerada tamponante dos efeitos oxidativos e modula as moléculas sinais transmitidas dos compartimentos celulares para o núcleo (SHIGEOKA *et al.*, 2002; ISHIKAWA *et al.*, 2005). A redução da *APx* citosólica pode ter resultado em desequilíbrio homeostático e sinalização de estresse para o núcleo. O acúmulo de H_2O_2 pela redução de *OsAPx1s* pode ter conduzido à indução ou à repressão de genes específicos que afetam tanto o crescimento, como o florescimento das plantas *OsAPx1s*. O H_2O_2 é conhecido como molécula sinalizadora de defesa, além da sua atividade tóxica. O silenciamento de *OsAPx1s* pode ter produzido um nível de H_2O_2 semelhante ao nível de acúmulo desta ERO em plantas em situação de estresse. Desta forma, as plantas reconhecendo uma situação que requer a ativação das defesas, reprimiram genes envolvidos com o metabolismo normal, por exemplo, genes de crescimento, e reservaram energia para genes envolvidos com a defesa da planta. O H_2O_2 também pode ter afetado a síntese de hormônios importantes para o adequado desenvolvimento (AGRAWAL *et al.*, 2003). Outro fato relevante que pode ter afetado o crescimento destas plantas é o efeito exercido pelas ERO na biossíntese de lignina (KOTCHONI & GACHOMO, 2006). Miller e colaboradores (2007), utilizando mutantes *cAPx1*, *tAPx* e mutantes para ambos genes detectaram diferentes sinais desenvolvidos pelas plantas de cada mutante. Mutantes para ambos os genes apresentaram florescimento tardio e baixa oxidação protéica durante estresse luminoso o que não foi visualizado pelo mutante *tAPx*, nem pelo mutante *cAPx1*, o qual apresentou redução do crescimento. Diferentemente dos resultados encontrados pelo nosso grupo o duplo mutante manteve a redução de crescimento. O crescimento deficitário apenas pelas plantas *OsAPx1s* e não pelas plantas transgênicas com redução dos dois genes citosólicos pode ser explicada pelo desenvolvimento de diferentes sinais nesses dois tipos de plantas RNAi.

O silenciamento das *OsAPx* peroxissomais, tanto de genes isolados, como o de ambos os genes afetou a fase reprodutiva da planta relacionada com a formação das sementes. As panículas foram formadas, mas poucos grãos foram obtidos. A manutenção da inserção do T-DNA nas plantas da geração T1 ainda não foi analisada. Outro efeito

geral da redução dos genes *OsAPx* peroxissomais foi a sua suscetibilidade à senescência. As plantas *OsAPx4s*, *OsAPx3/4s* e principalmente *OsAPx3s* apresentam menos folhas verdes do que plantas não-transformadas de mesma idade. A transformação com a construção RNAi *OsAPx3s* também foi a que mais afetou o tamanho da parte aérea, que é reduzido em relação às plantas não-transformadas. Estas análises confrontam o resultado obtido por Narendra e colaboradores (2006), os quais relataram que a APx peroxissomal não seria importante para o desenvolvimento de *A. thaliana*, ao menos na condição aplicada por eles.

As plantas *OsAPx1s*, diferentemente das plantas *OsAPx1/2s*, apresentaram redução da expressão transcricional dos genes *OsAPx4* peroxissomal e *OsAPx5* mitocondrial. O silenciamento de ambos genes citosólicos resultou na redução do acúmulo de mRNA de todos os outros genes *OsAPx*, com exceção do gene mitocondrial *OsAPx6*. Por outro lado, o silenciamento pós-transcricional dos genes peroxissomais afetou menos a expressão dos outros genes da família. A transformação com as construções de RNAi *OsAPx3/4s* e *OsAPx4s* não alterou a expressão dos outros genes. As plantas *OsAPx3s*, além da redução do gene *OsAPx3*, apresentaram repressão do outro gene peroxissomal *OsAPx4*.

Expressão relativa dos transcritos dos genes <i>OsAPx</i> em plantas RNAi em relação a expressão destes genes em plantas não-transformadas em mesma condição de crescimento.								
Plantas RNAi	<i>OsAPx1</i>	<i>OsAPx2</i>	<i>OsAPx3</i>	<i>OsAPx4</i>	<i>OsAPx5</i>	<i>OsAPx6</i>	<i>OsAPx7</i>	<i>OsAPx8</i>
<i>OsAPx1/2s</i>	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓
<i>OsAPx1s</i>	↓	=	=	↓	↓	=	=	=
<i>OsAPx3/4s</i>	=	=	↓	↓	=	=	=	=
<i>OsAPx3s</i>	=	=	↓	↓	=	=	=	=
<i>OsAPx4s</i>	=	=	=	↓	=	=	=	=

Tabela 4. Expressão relativa dos transcritos dos genes *OsAPx* em plantas RNAi em relação a expressão em plantas não-transformadas em mesma condição de crescimento. ↓ : Redução do acúmulo de transcritos em plantas RNAi. = : Similar acúmulo de transcritos entre as plantas RNAi e WT.

A redução da expressão de outros genes, que não os genes alvos, pode ter sido causada por ação da RNA polimerase dependente de RNA (RDRP). Esta enzima tem a capacidade de utilizar pequenas seqüências de RNA como iniciadores da polimerização do RNA. Desta forma, a RDRP poderia ter ampliado a seqüência de dupla fita de RNA resultante da construção RNAi, formando assim novos siRNA. Uma vez que estes novos siRNA fossem formados de seqüências conservadas entre o gene alvo da construção RNAi e os outros genes da família, o alinhamento dos novos siRNA poderia causar a degradação dos transcritos endógenos dos outros genes, levando a redução do acúmulo destes. As RDRP podem atuar dependente ou independentemente da presença de seqüências iniciadoras (BAULCOMBE, 2004; GAZZANI *et al.*, 2004; MIKI *et al.*, 2005; SCHWACH *et al.*, 2005). Entretanto, a redução da expressão dos genes *OsAPx* não alvos das construções RNAi não deve ter sido causada por efeito das enzimas RDRP. Caso as RDRPs estivessem atuando, ocorreria redução generalizada dos genes *OsAPx*, o que não foi visualizado nas plantas RNAi. Além disso, era esperado que o silenciamento pós-transcricional para o qual foi utilizada a construção RNAi para o gene *OsAPx1* levasse ao silenciamento simultâneo do gene *OsAPx2*. Isto porque os 20 nucleotídeos da seqüência da construção *OsAPx1s* estão presentes idênticos e contínuos no gene *OsAPx2*. Entretanto, essa redução não foi observada. Este resultado indica a grande especificidade das construções utilizadas. A redução da expressão dos genes *OsAPx* nas plantas RNAi, principalmente nas plantas com silenciamento de ambos genes citosólicos, pode ser explicada por regulação transcricional induzida pelo aumento de H₂O₂ e desequilíbrio homeostático da célula.

Uma vez que o substrato da APx é uma molécula sinalizadora, a dificuldade de compreender os resultados obtidos é maior. Avaliando o padrão de expressão transcricional das plantas *OsAPx1/2s* quando submetidas aos estresses com alumínio e radiação UV-B podemos afirmar que existe uma regulação dos genes *OsAPx* por efeito do estresse. O padrão de expressão dos genes *OsAPx* variou conforme o estresse que as plantas foram submetidas e a idade das plantas. Desta forma, a redução da expressão dos genes não alvos do silenciamento por RNAi pode ter sido causada por efeito do aumento dos níveis de H₂O₂ e sinalização por parte desta ERO ou de outras moléculas sinalizadoras. O que corrobora esta hipótese é que a variação da expressão dos genes não alvos ocorreu com maior intensidade em plantas silenciadas nos genes citosólicos. Como já descrito

anteriormente, o citosol é capaz de modular os sinais para o núcleo. Pouco se conhece a respeito das propriedades detoxificantes do núcleo, que deve apresentar fatores de transcrição sensíveis ao equilíbrio redox (MITTLER, 2002). Vale ressaltar que, segundo resultado obtido previamente pelo nosso grupo, análises confocais da localização de *OsAPx1-GFP* em células BY-2 de tabaco revelaram a possibilidade desta enzima estar também localizada no núcleo (TEIXEIRA, 2005). Uma vez que o H_2O_2 pode ultrapassar membranas (HENZLER & STEUDLE, 2000), o efeito do acúmulo desta ERO nos peroxissomos nas plantas silenciadas para os genes *OsAPx3* e *OsAPx4* pode ter sido reduzido pela ação das APx citosólicas, caso a atividade das próprias enzimas peroxissomais fossem ineficientes. Sendo assim, seria mais difícil o aumento de H_2O_2 nos peroxissomos ocasionar sinalização para modificar a expressão gênica.

O complexo mecanismo antioxidante é capaz de superar a falta de uma enzima pelo aumento da atividade de outra enzima. Frente à importância dos mecanismos antioxidantes para o adequado desenvolvimento das plantas, os organismos desenvolveram enzimas com atividades sobrepostas e complementares, como é o caso da Cat e APx. As análises bioquímicas das plantas *OsAPx1/2s* mostraram indução da atividade de outras enzimas antioxidantes provavelmente para compensar a falta da atividade de APx.

As ERO devem ter sua concentração finamente regulada para evitar danos oxidativos e induzir a defesa da planta mediante sinalização. A análise das plantas *OsAPx1/2s* em situações de estresse revelou que a sensibilidade das plantas é dependente da intensidade do estresse. As plantas RNAi não resistiram ao estresse com 100 ppm de alumínio, entretanto em menor concentração as plantas foram levemente afetadas, não sendo distinguidas das plantas não-transformadas. Em algumas situações, como visto em estresses em concentrações de 20 ppm de alumínio ou 25 mM de cloreto de sódio (dado não apresentado), as plantas RNAi mostraram-se mais resistentes que as plantas controle. Como descrito por Ishikawa e colaboradores (2005), pequenas doses de ERO podem mimetizar uma situação de estresse e conduzir as plantas à aclimação. Nas situações analisadas, é possível que a concentração de H_2O_2 nas células das plantas *OsAPx1/2s* encontrava-se em nível adequado de indução prévia das respostas ao estresse, conduzindo as plantas a tolerarem as situações desfavoráveis leves. Frente a estresses intensos, o nível reduzido de APx não foi capaz de ser compensado por outros componentes antioxidantes, resultando em maior sensibilidade nessas situações do que em plantas controle.

Estudos mostraram que a superexpressão de enzimas antioxidantes combinadas é capaz de aumentar a tolerância a diversos estresses (YABUTA *et al.*, 2002; BADAWI *et al.*, 2004; ROSSEL *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 2007b; LU *et al.*, 2007). Frente aos resultados obtidos sobre as APx citosólicas e peroxissomais foi observado que a alteração da atividade de cada enzima APx é capaz de provocar diferentes efeitos nas plantas. Acredita-se que a obtenção de plantas resistentes a múltiplos estresses somente será possível ao serem combinados diversos genes com funções complementares. Entretanto, primeiramente, muitos estudos em biologia básica necessitam ser realizados para aprimorar o entendimento do complexo mecanismo antioxidante.

A redução da expressão transcricional de APx pelas diferentes plantas RNAi obtidas e especialmente a análise mais detalhada das linhagens silenciadas para os genes *OsAPx1* e *OsAPx2* demonstraram que essa estratégia é eficiente para o estudo funcional de cada isoforma de *OsAPx* e para a determinação da função específica dessas isoformas nos diferentes compartimentos na célula.

O silenciamento pós-transcricional resultou em diferentes sinais na planta para cada gene que teve sua expressão reduzida. Inclusive, os efeitos na expressão gênica e na morfologia e desenvolvimento das plantas foram diferentes quando apenas um gene foi silenciado ou ambos genes da mesma localização subcelular. Com os resultados obtidos, foi possível observar que alterações diretas no nível redox no citosol são capazes de influenciar a expressão gênica dos outros membros dessa família gênica mais intensamente do que quando é feita redução dos genes APx localizados nos peroxissomos. A compartimentalização subcelular parece importante para a determinação da sinalização adequada para a defesa das células aos fatores ambientais que a planta está submetida.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento de ferramentas para a determinação da função das isoformas citosólicas e peroxissomais das APx. As análises moleculares e fisiológicas iniciais aqui desenvolvidas revelaram que as plantas silenciadas têm grande potencial para o estudo funcional desses genes. Como perspectivas imediatas deste trabalho estão: i) serão realizadas análises do transcriptoma e do proteoma das plantas transgênicas em comparação com plantas não silenciadas, tendo em vista o aumento dos níveis do H₂O₂; ii) análise das respostas dessas plantas ao ataque de agentes patogênicos como fungos e bactérias; iii) análise do potencial fotossintético das plantas silenciadas; iv) análise das plantas silenciadas frente a outros estresses abióticos, tais como

salino e alta intensidade luminosa; v) desenvolvimento de novas linhagens *OsAPx2s*; vi) comparação dos efeitos das plantas RNAi com plantas mutantes por inserção.

O conjunto de resultados descritos nesse trabalho revelaram que, para o equilíbrio homeostático e sobrevivência em condições extremamente variáveis, as plantas desenvolveram um mecanismo antioxidante altamente complexo e eficiente. A elucidação completa desse mecanismo vai requerer estratégias envolvendo estudos que abrangem as diferentes áreas da biologia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARY, V.M.M.; JENA, S.; PANDA, K.K. & PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2007), doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.10.022.

AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; IWAHASHI, H. & RAKWAL, R. Importance of ascorbate peroxidases *OsAPx1* and *OsAPx2* in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene*, 322: 93-103, 2003.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S. & KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24: 1337-1344, 2001.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639, 1999.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391-396, 2006.

ASAI, N.; MATSUYAMA, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KUBO, A.; AONO, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HAYASHI, H.; MULLINEAUX, P.M. & SAJI, H. Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in a cytosolic ascorbate peroxidase APX1. *Plant and Cell Physiology*, 43: S196-S196, 2002.

ASAI, N.; MATSUYAMA, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KUBO, A.; AONO, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HAYASHI, H.; MULLINEAUX, P.M. & SAJI, H. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an *Arabidopsis* mutant by activation of multiple antioxidative systems. *Plant Science*, 166: 1547-1554, 2004.

BADAWI, G.H.; KAWANO, N.; YAMAUCHI, Y.; SHIMADA, E.; SASAKI, R.; KUBO, A. & TANAKA, K. Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum*, 121: 231-238, 2004.

BAIER, A. C.; SOMMERS, D. J.; GUSTAFSON, J. P. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breeding*, 114: 291-296, 1995.

BALCOUMBE, D. RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363, 2004.

BENNETZEN, J. Opening the door to comparative plant biology. *Science*, 296(5565): 60(3), 2002.

BOLWELL, G.P. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 287-294, 1999.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

CAKMAK, I; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide-dismutase, catalase and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468, 1991.

CATANI, M.V.; ROSSI, A.; COSTANZO, A.; SABATINI, S.; LEVRERO, M.; MELINO, G.; AVIGLIANO, L. Induction of gene expression via activator protein-1 in the ascorbate protection against UV-induced damage. *Biochemical Journal*, 356: 77-85, 2001.

CHANG, C.C.; BALL, L.; FRYER, MJ.; BAKER, N.R.; KARPINSKI, S. & MULLINEAUX, P.M. Induction of Ascorbate Peroxidase 2 expression in wounded

Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *The Plant Journal*, 38: 499-511, 2004.

CHEN, Y.; WANG, H.; WANG, X.; CAO, A. & CHEN, P. Cloning and expression of peroxisomal Ascorbate Peroxidase gene from wheat. *Molecular Biology Reports*, 33: 207-213, 2006.

D'ARCY-LAMETA, A.; FERRARI-ILIOU, R.; CONTOUR-ANSEL, D.; PHAM-THI, A.T. & ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany*, 97: 133-140, 2006.

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D.J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K. & MUTTLER, R. Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17: 268-281, 2005.

DE PINTO, M.C.; PARADISO, A.; LEONETTI, P. & DE GARA, L. Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal*, 48: 784-795, 2006.

EMBRAPA, 2005. Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil - Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz. Disponível online em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>>. Acessado em 21 de janeiro de 2008.

FOURCROY, P.; VANSUYT, G.; KUSHNIR, S.; INZÉ D. & BRIAT, J.F. Iron-regulated expression of cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the *APx1* gene in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 134: 605-613, 2004.

FOYER, C.H. & NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17: 1866-1875, 2005.

FRYER, M.J.; BALL, L.; OXBOROUGH, K.; KARPINSKI, S.; MULLINEAUX, P.M. & BAKER, N.R. Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 33: 691-705, 2003.

FURLANI A.M.C. & FURLANI, P.R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e de seleção de plantas em condições nutricionais adversas. *Technical bulletin Instituto Agronomico de Campinas*, 121: 1-34, 1998.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158, 1968.

GAO, Q. & ZHANG, L. Ultraviolet-B induced oxidative stress and antioxidant defence system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 165(2): 138-148, 2007.

GARNCZRSKA, M. Response of the ascorbate-glutathione cycle to re-aeration following hypoxia in lupine roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 583-590, 2005.

GAY, C.; COLLINS, J. & GEBICKI, J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. *Analytical Biochemistry*, 273: 149-155, 1999.

GAZZANI, S.; LAWRENSEN, T.; WOODWARD, C.; HEADON, D. & SABLONSKI, R. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science*, 306:1046-1048, 2004.

GEORGIU, G. How to flip the (redox) switch. *Cell*, 111: 607-610, 2002.

GOFF, S.A.; RICKE, D. & LAN, T.H. *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, 296(5565): 92-100, 2002.

HARUSHIMA, Y.; YANO, M.; SHOMURA, A.; SATO, M.; SHIMANO, T.; KUBOKI, Y.; YAMAMOTO, T.; LIN, S.Y.; ANTONIO, B.A.; PARCO, A.; KAJIYA, H.; HUANG, N.; YAMAMOTO, K.; NAGAMURA, Y.; KURATA, N.; KHUSH, G.S. & SASAKI, T. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics*, 148: 479-494, 1998.

HAVIR, E.A. & MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84: 450-455, 1987.

HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; LAVAITTE, S. & KNOWLES, J.K. Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis. *Proteins*, 8: 215-217, 1990.

HENZLER, T. & STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channel. *Journal of Experimental Botany*, 51: 2053-2066, 2000.

HERNANDEZ, J.A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P. & SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell and Environment*, 23: 853-862, 2000.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T. & KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2): 271-282, 1994.

HIROCHIKA, H.; GUIDERDONI, E.; AN, G.; HSING, Y.I.; EUN, M.Y.; HAN, C.D.; UPADHYAYA, N.; RAMACHANDRAN, S.; ZHANG, Q.; PEREIRA, A.; SUNDARESAN, V. & LEUNG, H. Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Molecular Biology*, 54: 325-334, 2004.

Internacional Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436 (11): 793-800, 2005.

ISHIKAWA, T.; YOSHIMURA, K.; TAMOI, M.; TAKEDA, T. & SHIGEOKA, S. Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochemical Journal*, 328: 795-800, 1997.

ISHIKAWA, T.; MADHUSUDHAN, R. & SHIGEOKA, S. Effect of iron on the expression of ascorbate peroxidase in *Euglena gracilis*. *Plant Science*, 165: 1363-1367, 2003.

ISHIKAWA, T.; MORIMOTO, Y.; MADHUSUDHAN, R.; SAWA, Y.; SHIBATA, H.; YABUTA, Y.; NISHIZAWA, A & SHIGEOKA, S. Acclimation to diverse environmental stresses caused by a suppression of cytosolic ascorbate peroxidase in Tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology*, 46(8): 1264-1271, 2005.

JESPERSEN, H.M.; KJAERSGARD, I.V.; OSTERGAARD, L. & ELINDER, K.G. From sequence analysis of three novel ascorbate preoxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochemical Journal*, 326: 305-310, 1997.

JIMENEZ, A.; HERNANDEZ, J.A.; PASTORI, G.; DEL RIO, L.A. & SEVILLA, F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology*, 118: 1327-1335, 1998.

JOVANOVIC, Z.S.; MILOSEVIC, J.D. & RADOVIC, S.R. Antioxidative enzymes in the response of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) to ultraviolet B radiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9472-9478, 2006.

KAMPFENKEL, K.; VANMONTAGU, M. & INZE, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 225: 165-167, 1995.

KOTCHONI, S.O. & GACHOMO, E.W. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquire disease resistance in plants. *Journal of Bioscience*, 31(3): 389-404, 2006.

KOVTUN, Y.; CHIU, W.L.; TENA, G. & SHEEN, J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6): 2940-2945, 2000.

KUMAR, D.; GUSTAFSSON, C. & KLESSIG, D.F. Validation of RNAi silencing specificity using synthetic genes: salicylic acid-binding protein 2 is required for innate immunity in plants. *The Plant Journal*, 45: 863-868, 2006.

KWAK, J.M.; NGUYEN, V. & SCHROEDER, J.I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology*, 141: 323-329, 2006.

LALOI, C.; STACHOWIAK, M.; PERS-KAMCZYC, E.; WARZYCH, E.; MURGIA, I. & APEL, K. Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2): 672-677, 2007.

LEE, Y.; KIM, S.H.; BANG, J.W.; LEE, H.S.; KWAK, S.S. & KWON, S.Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 26: 591-598, 2007a.

LEE, S.H.; AHSAN, N.; LEE, K.W.; KIM, D.H.; LEE, D.G.; KWAK, S.S.; KWON, S.Y.; KIM, T.H. & LEE, B.H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stress. *Journal of Plant Physiology*, 164 (12): 1626-1638, 2007b.

LIM, Y.S.; CHA, M.K.; KIM, H.K.; UHM, T.B.; PARK, J.W.; KIM, K. & KIM, I.H. Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192(1): 273-280, 1993.

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* 25: 402-408, 2001.

LU, Z.; LIU, D.; LIU, S. Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 26(10): 1909-1917, 2007.

MANO, S.; YAMAGUCHI, K.; HAYASHI, M. & NISHIMURA, M. Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Letters*, 413: 21-26, 1997.

MCGINNIS, K.; MURPHY, N.; CARLSON, A. R.; AKULA, A.; AKULA, C.; BASINGER, H.; CARLSON, M.; HERMANSON, P.; KOVACEVIC, N.; MCGILL, M.A.; SESHADRI, V.; YOYOKIE, J.; CONE, K.; KAEPLER, H.F.; KAEPLER, S.M. & SPRINGER, N.M. Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. *Plant Physiology*, 143 (4): 1441-1451, 2007.

MENEZES-BENAVENTE, L.; TEIXEIRA, F.K.; KAMEI, C.L.A.; MARGIS-PINHEIRO, M. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 166: 323-331, 2004.

MIKI, D. & SHIMAMOTO, K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiology*, 45 (4): 490-495, 2004.

MIKI, D.; ITOH, R. & SHIMAMOTO, K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiology*, 138: 1903-1913, 2005.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; RIZHSKY, L.; HEGIE, A.; KOUSSEVITZKY, S. & MITTLER, R. Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stress. *Plant Physiology*, 144: 1777-1785, 2007.

Ministério da Agricultura. Agricultura em números: 2005. Arroz – produção, área colhida e rendimento médio – 1990 a 2005. Disponível online em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2005/03.02.05_1.XLS>. Acesso em 21 de janeiro de 2008.

MITTLER, R.; FENG, X. & COHEN, M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *The Plant Cell*, 10: 461-473, 1998.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. & VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498, 2004.

MITTOVA, V.; THEODOULOU, F.L.; KIDDLE, G.; VOLOKITA, M.; TAL, M.; FOYER, C.H. & GUY, M. Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L-pennellii* - a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant Cell and Environment*, 27: 237-250, 2004.

MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z. & GALE, M.D. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology*, 5(7): 737-739, 1995.

MORADAS-FERREIRA, P. & COSTA, V. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5: 277-285, 2000.

MORADI, F. & ISMAIL, A.M. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany*, 99: 1161-1173, 2007.

MOU, Z.; FAN, W.H. & DONG, X.N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113: 935-944, 2003.

MULLINEAUX, P.M.; KARPINSKI, S. & BAKER, N.R. Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiology*, 141: 346-350, 2006.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497. 1962.

NARENDRA, S.; VENKATARMANI, S.; SHEN, G.; WANG, J.; PASAPULA, V.; LIN, Y.; KORNIEYEV, D; HOLADAY, A.S. & ZHANG, H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 57(12): 3033-3042, 2006.

NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22: 867-880, 1981.

NEILL, S.; DESIKAN, R. & HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 388-395, 2002.

PANCHUK, I.I.; VOLKOV, R.A. & SCHÖFFL, F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129: 838-853, 2002.

PANCHUCK, I.I.; ZENTGRAF, U. & VOLKOV, R.A. Expression of the *APx* gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 222: 926-932, 2005.

PARK, S.Y.; RYU, S.H.; JANG, I.C.; KWON, S.Y.; KIM, J.G. & KWAK, S.S. Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress. *Molecular genetics and genomics*, 271: 339-346, 2004.

PASSARDI, F.; BAKALOVIC, N.; TEIXEIRA, F.K.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PENEL, C. & DUNAND, C. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics*, 89: 567-579, 2007.

PENG, S.; HUANG, J.; SHEEHY, J.E.; LAZA, R.C.; VISPERAS, R.M.; ZHONG, X.; CENTENO, G.S.; KHUSH, G.S. & CASSMAN, K.G. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (27): 9971-9975, 2004.

PIGNOCCHI, C. & FOYER, C.H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 379-389, 2003.

PNUELI, L.; LIANG, H.; ROZENBERG, M. & MITLLER, R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal*, 34: 187-203, 2003.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 126: 445-462, 2001.

QUEVAL, G.; ISSAKIDIS-BOURGHET, E.; HOEBERICHTS, F.A.; VANDORPE, M.; GAKIÈRE, B.; VANACKER, H.; MIGINIAC-MASLOW, M.; VAN BREUSEGEN, F. & NOCTOR, G. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *The Plant Journal*, 52: 640-657, 2007.

RAO, M.V.; PALIYATH, G. & ORMROD, D.P. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110: 125-136, 1996.

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; BREUSEGEM, F.V.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J.E.; RODERMEL, S.; INZÉ, D. & MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal*, 32: 329-342, 2002.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; CORPAS, F.J.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A. & SANDALIO, L.M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1346-1357, 2007.

ROS BARCELÓ, A. Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta*, 220: 747-756, 2005.

ROSSEL, J.B.; WALTER, P.B.; HENDRICKSON, L.; CHOW, W.S.; POOLE, A.; MULLINEAUX, P.M & POGSON, B.J. A mutation affecting ascorbate peroxidase 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 29: 269-281, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2a ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

SANMARTIN, M.; PATERAKI, I.; CHATZOPOULOU, F. & KANELIS, A. Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress. *Planta*, 225: 873-885, 2007.

SATO, Y.; MURAKAMI, T.; FUNATSUKI, H.; MATSUBA, S.; SARUYAMA, H. & TANIDA, M. Heat shock-mediated APx gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 52(354): 145-151, 2001.

SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 483-486, 2002.

SCHRAUDNER, M.; MOEDER, W.; WIESE, C.; VAN CAMP, W.; INZE, D.; LANGEBARTELS, C. & SANDERMANN, H. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant Journal*, 16: 235-245, 1998.

SCHWACH, F.; VAISTIJ, F.E.; JONES, L. & BAULCOMBE, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology*, 138: 1842-1852, 2005.

SHARMA, P. & DUBEY, R.S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science*, 167: 541-550, 2004.

SHARMA, P. & DUBEY, R.S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26: 2027-2038, 2007.

SHI, W.M.; MURAMOTO, Y.; UEDA, A. & TAKABE, T. Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 273: 23-27, 2001.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y. & YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1305-1319, 2002.

SLESIAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S. & MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 54(1): 39-50, 2007.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 229-235, 2000.

SONG, X.S.; HU, H.H.; MAO, W.H.; OGWENO, J.O.; ZHOU, Y.H. & YU, J.Q. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1082-1088, 2005.

TANG, G.; REINHART, B.J.; BARTEL, D.P. & ZAMORE, P.D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, 17: 49-63, 2003.

TANG, L. KWON, S.Y.; KIM, S.H.; KIM, J.S.; CHOI, J.S.; CHO, K.Y.; SUNG, C.K.; KWAK, S.S. & LEE, H.S. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports*, 25: 1380-1386, 2006.

TARANTINO, D.; VANNINI, C.; BRACALE, M.; CAMPA, M.; SOAVE, C. & MURGIA, I. Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* enhances Paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death. *Planta*, 221: 757-765, 2005.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. Analysis of the Molecular Evolutionary History of the Ascorbate Peroxidase Gene Family: Inferences from the Rice Genome. *Journal of Molecular Evolution*, 59: 761-770, 2004.

TEIXEIRA, F.K. Identificação e caracterização dos genes que codificam as isoformas de APx em arroz. (Tese de Mestrado). Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V.C.; MARGIS, R. & MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally

diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224 (2): 300-314, 2006.

The Rice Annotation Project. Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 17: 175-183, 2007.

TORRES, M.A.; JONES, J.D.G. & DANGL, J.L. Reactive oxygen species signaling In response to pathogens. *Plant Physiology*, 141: 373-378, 2006.

UPADHYAYA, N.M.; SURIN, B.; RAMM, K.; GAUDRON, J.; SCHUNMANN, P.H.D.; TAYLOR, W.; WATERHOUSE, P.M. & WANG, M.B. *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 201-210, 2000.

VACCA, R.A.; DE PINTO, M.C.; VALENTI, D.; PASARELLA, S.; MARRA, E. & DE GARA, L. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology*, 134: 1100-1112, 2004.

VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M. & INÉS, D. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 3(9): 330-334, 1998.

VAN ROSSUM, M.; ALBERDA, M. & VAN DER PLAS, L.H.W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science*, 130: 207-216, 1997.

VANDENABEELE S.; VAN DER KELEN, K.; DAT, J.; GADJEV, I.; BOONEFAES, T.; MORSA, S.; ROTTIERS, P.; SLOOTEN, L.; MONTAGU, M.V.; ZABEAU, M.; INZÉ, D. & VAN BREUSEGEM, F. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (26): 16113-16118, 2003.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D. & BREUSEGEM, F.V. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1227-1236, 2002.

WATERHOUSE, P.M. & HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 4(1): 29-38, 2003.

XING, W.; Huang, W.M.; Li, D.H. & Liu, Y.D. Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency, and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Current Microbiology*, 55: 94-98, 2007.

YABUTA, Y.; MOTOKI, T.; YOSHIMURA, K.; TAKEDA, T.; ISHIKAWA, T. & SHIGEOKA, S. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *The Plant Journal*, 32: 915-925, 2002.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T. & SHIGEOKA, S. Expression of Spinach Ascorbate Peroxidase Isoenzymes in Response to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 123: 223-233, 2000.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T. & SHIGEOKA, S. Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 40623-40632, 2002.

YU, J.; HU, S.; WANG, J. *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *ssp.* indica). *Science*, 296: 79-92, 2002.

ZAVALETA-MANCERA, H.A.; LÓPEZ-DELGADO, H.; LOZA-TAVERA, H.; MORAHERRERA, M.; TREVILLA-GARCÍA, C.; VARGAS-SUÁREZ, M. & OUGHAN, H. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164(12): 1572-1582, 2007.

ZHANG, H.; WANG, J.; NICKEL, U.; ALLEN, R.D. & GOODMAN, H.M. Cloning and expression of an Arabidopsis gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology*, 34: 967-971, 1997.

APÊNDICE 1:

Seqüências genômicas e cDNA dos genes *OsAPx* e alinhamento dos iniciadores utilizados nas construções RNAi e para análise da expressão transcricional por RT-PCR quantitativo.

Seqüências de iniciadores: (A seqüência realçada é a região que se alinha ao gene *OsAPx*, a outra região do iniciador corresponde a parte do sítio de recombinação ao vetor.)

Seqüência de iniciadores utilizados para a construção RNAi	
<i>OsAPx1/2s</i>	5' CGCCGCCAACGCCGCCTCGA 5' CACTCAAACCCATCTGCGCA
<i>OsAPx1s</i>	5' AAAAAGCAGGCTCC CTACAAGGAGGCCACCTCA 5' AGAAAGCTGGGT CCCGCATTTTCATACCAACACA
<i>OsAPx2s</i>	5' AAAAAGCAGGCTCCC CAAGTGACAAAGCCCTCAT 5' AGAAAGCTGGGTC AAGGCGAAAATACAAATCG
<i>OsAPx3/4s</i>	5' CACC TCCTGATGCTAAGAAAG 5' GGATCTTCCAACAATGCCT
<i>OsAPx3s</i>	5' AAAAAGCAGGCTCCCGAAAGATCAGGATTTGATGGT 5' AGAAAGCTGGGTC CCCAGCTCAGATCGTTCTTGT
<i>OsAPx4s</i>	5' AAAAAGCAGGCTCC TGACAAGGCATTGTTGGAAG 5' AGAAAGCTGGGTC CAGCTGCAGCAACAGCTACC

Seqüência de iniciadores específicos para amplificação dos genes <i>OsAPx</i> utilizados para análise do acúmulo de transcritos por qRT-PCR	
<i>OsAPx1</i>	5' CTCGAG CTACAAGGAGGCCACCTCA 5' GGTACCTCGAG CCGCATTTTCATACCAACACA
<i>OsAPx2</i>	5' ACCTGAGGTCCCCTTCCA 5' CTCTCCTTGTGGCATCTTCC
<i>OsAPx3</i>	5' GGAGTTGTTGCCGTTGAAGT 5' ACCATCAAATCCTGATCTTTC
<i>OsAPx4</i>	5' CTCGAC TGACAAGGCATTGTTGGAAG 5' GGTACCTCGAG CAGCTGCAGCAACAGCTACC
<i>OsAPx5</i>	5' CTCGAG GAGGGCAATCTTGGACATCTG 5' GGTACCTC GAGGATCAAACCTTGCCCCAAGA
<i>OsAPx6</i>	5' CTCGAG GAGGGCAATCTTGGACATCAC 5' GGTACCTC GAGGATCAAACCTTGCTCCGAGA
<i>OsAPx7</i>	5' CTCGAG GAGCAATCTGGGTGCAAAT 5' GGTACCTCGAG ACTCGTGGTCAGGAAAAGC
<i>OsAPx8</i>	5' CTCGAG GCTGCGAAATACTCCTACGG 5' GGTACCTCG AGAGGAGGTCATCAGACCATCG

*Seqüências sublinhadas referem-se às regiões transcritas do gene.

****TAA**: refere-se ao códon de terminação de tradução

OsAPx1

Seqüência Genômica TIGR: LOC_Os03g17690

ATGGCTAAGAACTACCCCGTCGTGAGCGCCGAGTACCAGGAGGCCGTCGAGAAGGCCAGGC
AGAAGCTGCGCGCCCTCATCGCCGAGAAGAGCTGCGCCCTCTCATGCTCCGCCTCGCGTA
AGCCGTCGCCCTCGCACTCGCTCGCTTAGGTTTTGTGTAGAGGCGGATTTCCGTAGACT
GATCCGGTTTTTGTGGAGACGGATCGCGCAGGTGGCACTCGGCGGGGACGTTTCGACGTGTC
GTCGAAGACCGGGGGCCCGTTCGGGACGATGAAGACCCCGGCGGAGCTGTGCACGCCGCC
AACGCGGGGCTGGACATCGCGGTGCGGATGCTCGAGCCCATCAAGGAGGAGATACCCACCA
TCTCCTACGCCGATTTCTACCAGGTTCCGCCGCGAGCCCCGGATAGATCTGGATGGACGGCC
CCGATCTGGTCAAACGGACGTGGTTCTGATGTTTTTTCCCGTTGTTTTTGCGCAGCTTGC
CGGAGTTGTGGCCGTCGAGGTGTCCGGTGGACCTGCCGTCCCTTCCACCCAGGAAGGGAG
GTGAGATTTCTATTACCTTTCAACTCTTGGGGTTTTTCTCAGGGTTCTAGTTAGGCCTTG
ATATGGCAGTGGTAAACTGGATGGCGTGTGGATTTGTTTGTGATGCCACGAGATTAGTCGT
AATTTGTTAGTGCTCCATTGATGTGTGTGCTTTTCATTTGTGGGACTGGGGGTTGGTGGT
TCCTAGAGAGTAGACAAAGTGATCACCCTAATCTAAGGCCAGCAGTATAATAATATTTTA
ACAGTACGGACTTTTTCTATATTATATACCCGGATAATACCGTCAAATTGGGTTTGTTCGTA
TTCTTGTGGTGGGTCGGCGTTACTTGACATCCTCTAGATCTAGAGGTGGTTAAATATCCG
TGACCTCATTTACATTTCCGTAAGACCTTGTTTATTTACCATAAACATGCTAATTGTTATT
TTTTAGTTATTGTTGGCTCATGTGTTGTGTGTCAGTTGAGTCACATAGGATTCATTTTCATG
CATGCTGTATGGTGTGAAGTTTGTATCCATTGATGCACAAGGATATTATTTTTTAAGGATG
TCGCCTTATCCTTTTTCTTTGTAGTCTGGCTATTCTCAAAGTAGTCACTGATTTACCATGG
TTGTTTGCGGCATTTCCTGTTCCAGGGTTTTGATAGTTACTGATCTTTCATTTTATCATT
TTATTTTTTACTCAGGATAGTAGTTCTCATCCTAATCGATGTCATACTCTAAACCATGACA
AATAACAATTATTTTTCTGAATTAATGGAAGAAGCCTTGGGGACCTGGAAGAAGCCTTGGG
GACCGGGGTTGTTTTCCGTTCTCTATGCATGATATAGTTTGATCTGTTGGATTGTGCCATGT
AGGATATTTGTTGTGCTTTGTGAATATAAACTTAAGAAAGCATCCATTATTTACAAGTCTA
GTTGGTTCAGATAAAGTATAATTAGGGCCTCCCAACTTATTGCATTGACATAAAATGATAAT
TAGGGGTTCAATCTGAAGGCAGTTGGAAGCTTAATGAAAAACAGTGGGCCGATATATAT
CTATATGTTATGTTTTAGGAACTTTAGAAAGGTGACTTGGTGCTTGTTTTAGGATATAAT
AACTGTTATGGATATATCTTTTTTTATAAATACATAATGTTTCAGTAATTATTATGCACCTT
CAACAATATCACCGATGATAGTAATATATATCATATATGTAACATTATACAGTGCTTAAAA
TTTGCTTGTGCATATCTGGCTCATCTTTATATTTATTTCTAAAATGGAGAGATGATTAAGT
GTTTTTTTATGTTCCATTTTATATTCATTGTGTTGTTAATTGAGATTGTTTTCATCCTTCC
TTGACCTTTTGCAGGACAAACCTGCACCCCCACCTGAGGGCCGTCCTTCTGATGCTACCAA
GGGTATGTTGCCAGTTTACACTACTAGTCTCTTCCAGGAACTATAGAAACATTCACCCTA
TTGCCATAAAAGAAACCCTTGCAAATAAGTCATCCTTTAAAATGTTTTTGTCTGCAATA
GTTGAGGTGTTATTTCTGTGTAGCACATCTAAAATGCTTAGTTATGGTAGAAGTTTTTCCC
ACTGCACACTTGACAAATGATTCCTGTGTTGTTGTAGGCATGTTGTATTTTTCTGCATGCT
TCATTTCTGATATGATCCTGCTTTGACCTTGTCTAGTAAACCTCATGTAAAGCACCATTG
CTTACACTTTGAGCTTGATTGCTTTACCAGGTTCTGACCACCTAAGGCAGGTCTTCGGTGC
GCAGATGGGCTTGAGTGATCAGGACATTGTTGCCCTCTCTGGCGGTCACACCCTGGTTAGT
TTGGCTATTAACCATTGTATGCCTCTGCAGTATGTAGGAGTACATGTTCTAATGTCCGATT
TCTGTGCTTTGTTCTGCAGGGAAGGTGCCACAAGGAAAGATCTGGTTTTGAGGGACCTTGG
ACAAGAAACCCTCTGCAGTTTGACAACCTTACTTTCACGTAAGCGATGTTACGAGTGGTTG
AATTTTGTCTTATGCTGAACAAAGTTGGTAACAAAAATGTTGAACTCATCTCTCCGCGAC
GATTTTAAATAGGGAGCTTCTGAGTGGTGACAAGGAGGGCCTTCTTTCAGCTTCTTAGTGACA
AAGCCCTGCTGAGTGACCCTGCCTTCCGCCCACTCGTCGAGAAATATGCTGCAGTATGTCT
CCTATCAATCATCATCTTGTGTTCCACGTTTTGCATCTTGTGTTCCCTCGTTTTTGCAGAGAT

ATGCCAGAACATGATACTGATTGTGTTTTTTTTTCCCAATTCTGCTAGGATGAGAAGGCTT
TCTTTGAAGA **CTACAAGGAGGCCACCTCA**AGCTCTCCGAAGTGGGGTGAGTAATGGTTTG
TCAATCCATTTATCGTGTTATCTTTCATGACAACAAGGTCATGGTAGCTAATTGTACTCTT
GTGATTTCAAGTTCGCTGATGCTTAA

Seqüência cDNA completo (Número de Acesso NCBI: D45423 e ES351505)

TCTCCTCCTCCTCCTCGATTTCGGAGCTCCACCCGCAGCCATGGCTAAGAACTACCCCGTCG
TGAGCGCCGAGTACCAGGAGGCCGTGAGAAGGCCAGGCAGAAGCTGCGCGCCCTCATCGC
CGAGAAGAGCTGCGCCCCTCTCATGCTCCGCCTCGCGTGGCACTCGGCGGGGACGTTTCGAC
GTGTGCTCGAAGACCGGGGGCCCGTTTCGGGACGATGAAGACCCCGGCGGAGCTGTGCGACG
CCGCCAACGCGGGGCTGGACATCGCGGTGCGGATGCTCGAGCCCATCAAGGAGGAGATAACC
CACCATCTCCTACGCCGATTTCTACCAGCTTGCCGGAGTTGTGGCCGTCGAGGTGTCCGGT
GGACCTGCCGTCCCTTCCACCCAGGAAGGGAGGACAAACCTGCACCCACCTGAGGGCC
GTCTTCCTGATGCTACCAAGGGTTCTGACCACCTAAGGCAGGTCTTCGGTGCAGATGGG
CTTGAGTGATCAGGACATTGTTGCCCTCTCTGGCGGTACACCCTGGGAAGGTGCCACAAG
GAAAGATCTGGTTTTGAGGGACCTTGACAAGAAACCCTCTGCAGTTTGACAACTCTTACT
TCACGGAGCTTCTGAGTGGTGACAAGGAGGGCCTTCTTCAGCTTCTAGTGACAAAGCCCT
GCTGAGTGACCCTGCCCTCCGCCCACTCGTCGAGAAATATGCTGCAGATGAGAAGGCTTTC
TTTGAAGA **CTACAAGGAGGCCACCTCA**AGCTCTCCGAAGTGGGGTTCGCTGATGCT **TAAG**
AGGTTTCTAGTCTACTACTGCTAGTACATTGCCCGTGGTACTCTTGTTTTGCATCTAGGCT
AGGGCCAGTGTGAACCAGCAGACTACCACTGTGAGTCGCCTCTGTAATAAAATTTGTTTCGG
CCTATGGCATCCTCAGTACGTTGTCAATGTCTCGGTGGGCTGTTATGCTCAACTGCAATGC
TGCATCCACTGAAACCTCTTCTAGAT **TGTGTTGGTATGAAATGCGG**

OsAPx2

Seqüência genômica TIGR: LOC_Os07g49400

ATGGGCAGCAAGTCGTACCCGACGGTGAGCGATGAGTACCTGGCGGCCGTGGGCAAGGCGA
AGCGCAAGCTCCGCGGCCTCATCGCCGAGAAGAACTGCGCCCCACTCATGCTCCGCCTCGC
GTAAC TTTCTTCTTCTTCTTCTTCTACTGATTAATTTCCAGAAGATAGAGTAGGAGGAGTA
GATGTTGAATTGCAGTGGCTGGCTGGCTGCAGGTGGCACTCTGCTGGCACCTTCGATGTGT
CGTCGAGGACCGGCGGGCCCTTCGGCACCATGAAGAACCCCGGCGAGCAGTCCCA **CGCCG**
CCAACGCCGGCCTCGA CATCGCCGTCAGGCTTCTCGACCCCATCAAGGACCAACTTCCCA
TCCTCTCCTACGCCGACTTCTACCAGGTAAGGTTCACTTCCCTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTC
CTCTCAACTCATCAACCTCTTAATTGGAGTCTCTCCCTCTCTATTGGCAGCTTGCTGGCGT
TGTGGCCGTGAGGTCACCGGCGG**ACCTGAGGTCCCCTTCCA**TCCGGGCAGGCAGGTCAGA
ATCACATTTCCCATCCCTAAACCCCTCTCCCTCTCTCTCCCCCTTCTTCTTTCTTCTTCTG
GTAGATGCAAATGGTATTTTTCTTAAGTCAATTCTTTTCTTTTCGTATCTTGTACGCCGT
GTTTCCCTTTCCCTGAATTCTCCACTGTCTTGTGAATGTTGATGATGTGATGTGTTTGTTC
TAGGACAAGCCTGAGCCTCCTCCTGAAGGCCGTCTTCCCTGATGCCACACAAGGTATTAAGA
TTTCCCTCTGTATTAAGTTACCCCTATGACAATGCATTTCCAATGTGTTGGTGATTAATTT
TTCTAGATCTATGACCAGCATTGTATGTGCTACTGATGGAGTAGTTCATATTGCAAGTCC
ATTACCAGAATTTCTTTCATGCTTAAGTAAGTTGTGTAACCTACATAAGACTAAAATTTTCC
AACCCCTGTTTATGCAAACCACATTACTAAAGTTTGTGTTTGTGTTCCCTGTTTATTCTTCTTT
CTTATATGGAGCATACATGTTACCTGTGTGTTCTTTAATTAACAGTGTGCCAATTTGTGGA
TGCGAGATAACTAATATGTCATGGTCTTCTGGCTGTTGGTCCAGGTTCTGACCACCTAAGG
CAGGTCTTTTC **TGCGCAGATGGGTTTGAGTG** ACAAGGACATAGTTGCTCTTTCTGGTGGT
CACACCCTGGTTGGTACACTTGTGCAATTGCCCTAGTGTGTTTCTCATATCTTGTAAACCGG
AAGGGTTATTCATGCAGCTTCACTTCATCTTCTGTAG**GGAAGATGCCACAAGGAGAG**ATCT
GGCTTTGAGGGAGCCTGGACGTCCAACCCCTTTGATCTTTGACAACCTTACTTACAGTGC
TGATCTCTGATCTTTTAAAGATGCATCCTGTCTGTTGATAAACAGCCAGCCACAGCTTG
TTTCCCTTGTATGCTAAAGAATGAAAACCAAATCTCCTCTCGATCAACAGCGAGCTTGTA
GTGGCGAGAAGGAAGGCCTTCTTCAGCTGC **CAAGTGACAAAGCCCTCAT**GGCTGACCCAGC
CTTCCGTCCACTGGTGGAGAAATATGCTGCGGTACACCCCTTGATCCTTGCATTATTTTCT
CTCGTCTTCTTTCTAAAGAGTTGTTTTTTTTTAAATAAAAAGAAATAAGAGAAATGGATCAT
CGTTGATCTCTTAAAAAGTAGATGATTGTTGCCTGATATGTAGGATGAGGACGCCTTCTTT
GCGGATTACGCCGAGGCCACCTCAAGCTCTCTGAACTGGGGTAAGGGATGCAACTGGTGT
GCTTGTCTGTGATGCGTTATTGGAGTGCTTTGTGCCAGAGTTTACTAATTATTGTTGTGT
TTGTGGGTTTCAGATTTGCTGAGGAA**TAA**

Seqüência cDNA completo (Número de Acesso NCBI: AB053297):

AGGTGAGTTGAGTTGGGGATTGATTGATTGATTTCGGATTGGGAAGAAGAAGCAGGGGA
GCATGGGCAGCAAGTCGTACCCGACGGTGAGCGATGAGTACCTGGCGGCCGTGGGCAAGGC
GAAGCGCAAGCTCCGCGGCCTCATCGCCGAGAAGAACTGCGCCCCACTCATGCTCCGCCTC
GCGTGGCACTCTGCTGGCACCTTCGATGTGTCGTCGAGGACCGGCGGGCCCTTCGGCACCA
TGAAGAACCCCGGCGAGCAGTCCCA **CGCCGCCAACGCCGGCCTCGA** CATCGCCGTCAGGC
TTCTCGACCCCATCAAGGACCAACTTCCCATCCTCTCCTACGCCGACTTCTACCAGCTTGC
TGGCGTTGTGGCCGTGAGGTCACCGGCGG**ACCTGAGGTCCCCTTCCA**TCCGGGCAGGCAG
GACAAGCCTGAGCCTCCTCCTGAAGGCCGTCTTCCCTGATGCCACACAAGGTTCTGACCACC

TAAGGCAGGTCTTTTC **TGCGCAGATGGGTTTGAGTG** ACAAGGACATAGTTGCTCTTTCTG
GTGGTCACACCCTG **GGAAGATGCCACAAGGAGAG** ATCTGGCTTTGAGGGAGCCTGGACGTC
CAACCCTTTGATCTTTGACAACCTTACTTCACCGAGCTTGTGAGTGGCGAGAAGGAAGGC
CTTCTTCAGCTGC **CAAGTGACAAAGCCCTCAT** GGCTGACCCAGCCTTCCGTCCACTGGTGG
AGAAATATGCTGCGGATGAGGACGCCTTCTTTGCGGATTACGCCGAGGCCACCTCAAGCT
CTCTGAACTGGGATTTGCTGAGGAA **TAA** GAAGCCTTTAGAGAGCGGGATATCCGCAAAGA
TTAATGC **CGATTTGTATTTTGC** **CCCTT**AGAGTCAGTACGATCAAGACTGTCGTGGCGGTTG
TAATAAAAATTAGTGCGCTTTGGGCCATCTTTTTATGTGATTCCAATTGTCTTTCTCTTCA
TTCTTGCTTTGATGCTCTTTGTCTGGACCTCTAGACCGCCGTATTGTACTGTGGAGTTTCA
AAGTTACCAAGCTATTTGCTGTCAAGATAACTATGGATTGAATCCCCTTGATGGATGAAA
AA
AAA

OsAPx3

Seqüência Genômica TIGR: LOC_Os04g14680

ATGTCGGCGGGCGCCGGTAGTGGACGCGGAGTACATGGCGGAGGTTCGAGAGGGCGCGCCGCG
ACCTGCGCGCCCTCATCGCCAGCAAGAGCTGCGCTCCCATCATGCTCCGCTGGCGTGC
TGCCGTTTCATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTGTCTCTGCTGTCTTGTCTATGCTCCACGAT
CGTGTATGTCTAGCTCGCCGCTGATGTCTGCTCTGGCGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCG
CGCTGTTTTTGCAGGTGGCACGACGCCGGCACGTACGACAAGGCGACGAAGACGGGAGG
GCCCAACGGCTCCATCAGGTTCCCGCAGGAGTACAGCCACGCCGGAATGCGGGCATCAAG
ATTGCTATTGATCTGCTAGGTCTGTGCATGTTTCTGTCTCAGATTCTTGTTCAGGATGTGAAC
TTGTTTTTTGATGCTGTTGTTGTTAATTTTGTCTGACCTTAACAAGTTTGATTTGAGATG
ATATATATGGTTCTTTCATGTGGTGCAGAACCGATGAAACAGAAGCATCCCAAGATTACCT
ATGCTGACCTGTATCAGGTAACCTCAGCTGCATATTTGAACACTAACAAGTAACCTTACAAT
GGCCTGTTTCGGCAGCTCGATTACGCAGCTGTTTTGGCTGTGCTGTACAGCCCAGCCGTTT
GTCTGCCTGTTGGCTGGCAGCGGCCCTGGCTGTTGGCTGCCTGCAGCCTCTACAGCCGCTGT
TAGCTAGCTGCTGTAGCACTGTAGCTGCTGCTGCCGTGCAGCTGCAGCGCTGCAGCAGCAA
TCTCATCCGAACAAGCCCAATCCTACTTTTCTGCTGGTAAACTTCACCAATCACATACCAA
TTATAAATCTCATCACCTCTAATTTTCAGCTTGCCGGAGTTGTTGCCGTTGAAGTCACCGGT
GGGCCAACTATAGATTATGTTCCCTGGCAGGAGGGTGAGTTGATGCATCGACATTGATTTTT
TTCCAGACTGAATATCTTATGAAACCATCTTGAGTTCTCCTTTTTTTTTTCTCATTTATC
TACAGGATTCTTCAGATTCCCCAGAGGAAGGCCGTTTGCCAGATGCTAAGAAAGGTTGATT
CATGACCCGTTATCTCTGCTCCTATCTACTAATCTAAAATAAAAATATCAGCTCCAATGCAT
TGATACTTTTTTCTGTGATTTCTTGGGTTAATTTTGCTAATTATAAATGATTAATGAAAT
GAGCGCTGAAACCTTCCAATATGTTGTATGCACAAAGTTCAGATGATACAATTAATTCGA
AATTTTGTTTTTCTGGATAAATTTGCTTCAAAAATGTCAAAGGTATTTAGTTTCTTGTACTA
TATTTTACTTTTTTGAAAAGGTGCTGCGCATCTGAGGGAAGTCTTCTACAGGATGGGCTTA
TCAGACAAGGACATAGTAGCACTCTCAGGCGGCCATACTCTCGTATGCAACATCATCTTTC
TACTGGTGTATATAATATCAACTACTATTTTCCAGCTAAATTAGAGATCATGTTCTGAA
TAGTTCATTTTCAGGGGAAAGCTCGTCCCGAAAGATCAGGATTTGATGGTGCCTGGACAAA
GGATCCACTGAAATTTGACAACCTCCTATTTTCATGTAAGATTAATATGACTTGTCCCTCCA
CAGAAATTAATTATTGATGGTGGCTTGGACAAAGAATCCTCCGAAATTTGATAACTCCTATTT
CATGTAATATTAATATGACTTATCCATCTATAGAATTAATTAATATCACCATTTGCTTC
AATGCAGTGAGCTTCTGAAAGAGAATTGAGAAGGGCTTCTGAAGTTGCCTACTGACAAGGC
TCTTGTGAAAGATCCTACATTCGCGCGCTATGTGCAACTATATGCCAAGGTACATCGCATT
TATATCCCAAATCTTTTCTATTCACTGTAACATTTGAGGTAGCTTATCAGGATGGTAATTA
ATTTTTTTTTCTTTTCTGAAAATCGTAGTGCTTCTGTAAATGTCATGTTTTCTTTGTTATG
GTAATCACAATAGTTTGTAAACTATAAACTTTCTGATAGATTGCATTAGTATTGCACAAAT
AGAAACCTAACCGAATGATGTGTGCAATGAGCAATTGAGCATTCTCTAGTTAGTAGTTAA
TGAGTTCATTGATTTGCTAACAATAAATTTGTATTTTTCTTTGTAGGACGAAGATGCATTTTT
CAGGGACTATGCAGAGTTCGCACAAGAAGCTATCTGAGCTGGGGTTTACGCCTCCTCGCTCT
GCATTCATCTACAAATCATGCCAGAAACCAAGTCCCTGTTGATGCAAACTGCAGCTGGGG
TTGCAGTTGCTGCTGCAGTTGTTCGCATGGGCTTACCTCTGTGAATCCAACAAGAGGCTTGG
CTAA

Seqüência cDNA completo (Número de Acesso NCBI: AY382617):

CTATCACCTCTCCTCGGATCGTCAGCAACAGCGGCGGCGATGTCGGCGGCGCCGTTGGTGG
ACGCGGAGTACATGGCGGAGGTTCGAGAGGGCGCGCCGCGACCTGCGCGCCCTCATCGCCAG

CAAGAGCTGCGCTCCCATCATGCTCCGCCTGGCGTGGCACGACGCCGGCACGTACGACAAG
GCGACGAAGACGGGAGGGCCCAACGGCTCCATCAGGTTCCCGCAGGAGTACAGCCACGCCG
CGAATGCGGGCATCAAGATTGCTATTGATCTGCTAGAACCGATGAAACAGAGGCATCCCAA
GATTACCTATGCTGACCTGTATCAGCTTGCC**GGAGTTGTTGCCGTTGAAGT**CACCGGTGGG
CCAAC TATAGATTATGTTCCCTGGCAGGAGGGATTCTTCAGATTCCCCAGAGGAAGGCCGTT
TGCCAGATGCTAAGAAAGGTGCTGCGCATCTGAGGGAAGTCTTCTACAGGATGGGCTTATC
AGACAAGGACATAGTAGCACTCTCAGGCGGCCATACTCTCGGGAAAGCTCGTCCC**GAAAGA**
TCAGGATTTGATGGTGCCTGGACAAAGGATCCACTGAAATTTGACAACTCCTATTTTCATTG
AGCTTCTGAAAGAGAATTCAGAAGGGCTTCTGAAGTTGCC TACTGACAAGGCTCTTGTTGA
AGATCCTACATTCCGCCGCTATGTCGAACTATATGCCAAGGACGAAGATGCATTTTTTCAGG
GACTATGCAGAGTCGC**ACAAGAAGCTATCTGAGCTGGG**GTTTACGCCTCCTCGCTCTGCAT
TCATCTACAAATCATGCCAGAAACCAAAGTCCCTGTTGATGCAAAC TGCAGCTGGGGTTGC
AGTTGCTGCTGCAGTTGTCGCATGGGCTTACCTCTGTGAATCCAACAAGAGGCTTGGCTAA
TTTAATTTGCATCGATCACAATGATCGTTATTTCTGTCTCAACCACTAATGGCTGTACAATA
AGAAGG TACTCGATTGGAACATTTGGATGATGTATATGTGTTTGTGGTATATATATGTGA
GTGCTGCTAAGTCTGCTATGTTG

OsAPx4

Seqüência genômica TIGR: LOC_Os08g43560

ATGGCCGCCCGGTCTGGACGCCGAGTACCTCCGCCAGGTCGACAGGGCGCGCCGCCACC
TCCGCGCCCTCATCTCCTCCAAGGGATGCGCGCCCATCATGCTCCGCTCGCGTACGTACC
TACCGGCCTACCCCCATCTCCTGCTCCTCCTAGAACCCTCCCCTAGTTCCTAATCCTTGT
GATGGATTTCGCGCGGCGGTGGCGAGGGAGGAGCTCTCGTGTGTTTGGATTTGGAGCCCGC
TCGGCTCTGCTTGCCTCGAGTGGTGGGATGAGTTACTGCTGGTGGTGGTGGATGGGTGCG
TTGCGATTGCGAGACTGTATGATTGGGTTTGGTTAGTTGCTTGCGGCGGGTACCTGCGCTG
GTCCGTGGCGTGGCTGTTGGGCGAGGCAATTCGACGAACACCTTGAGTGCCTGCGCGCCTG
CTTTGGATGGCTCCCAGATTTGGTTTTGGATTTGTGTGACTGCGCCTTTGGAATTAACGAGGA
ACGGCGGACGATGTTTAGTTTCGCTAGTTACATGTAGAGTGCACGCGTTTTTCTGTTGATC
CGTTGGTTCTCTCATACTAGTCAGGAACTAGCAACCTAGCAGGGGAGAGCGAGCATTTTT
AATCACTCCCATATTCGGTCATAACGGCAATATCGCAGGAAGCTAAGACGAATTTCTTAT
TTCTGTCTATAGTAGGTGTTCCACTCCATGAGCTTCGTGTTACATTTGTGGAGCTGATGAG
AGACCAGTGTACAACTGGAACAAATAAGTGATGTTTTATTATCTAAAAAAGGGGATGT
TTGCACTACTGCTGCAAATGTTCTATGTATATTGTAATTACGAATGGACTCAGAAGAAGCA
TTACCATTTAACGCACCATTACAGATAGTGCAGCGTGTATTTGCTAATTAATTAGTACTTT
ATATATGGAATTGTGATTTTTTTTTATCTTATATGTTGTATACAGTGTCTTCTGTAATGTA
CTATGAGTTTTTCTCATTTATCATGGAGGATATTCTGCGTGCTCTTGGATTACTCTTGGAC
TAAACTTAGTTCCTGTGCACTCCCTTGCAGATGGCATGACGCGGGCACTTATGACGTGAA
CACAAAACCTGGTGGTCAAATGGTTCAATTAGATACGAGGAAGAGTACACTCACGGTTCA
AATGCTGGTCTAAAGATTGCTATTGATCTTCTCGGTATGTATTGTTTGTCCCAATGTGTT
CCTAGATGATTAGACGAAAGTAGCTTTCACTTTTTCCCCATTGTCAGAATGGCTCTAGTTC
CCTTTAAACCACTCATCAGCTATATGATTGATGCCTCTTAAGAAATCAATTTGAGTTTTCT
TGTCAGTTTTCTAAAATTCTTTTCTTTTTCTATTGTTTTGGGTTTTACCTTGATCGGACTA
CAAATAACTCTTTTTTTTTCTTAATTCGGGGATCAAATATTTGGGAGAAATAACTAAA
ACAAGAACTCCCATATTTTTGCAACTATTCTCAATGGTGTGTCAGTACTCACCACTCTT
CTCTGTACAATTGCATTAATTTACCTGTTCCACGTTATCTAGTTTATTGTTATATTTGTCACT
TTATTCAGTGATGAAATAAATCGAATGATTACTTATGCTTCTCCAATTGTCTTTTACTGTA
ACAGAGCCTATTAAGCCAAGAGCCCTAAGATCACATATGCTGACCTTTATCAGGTAATTT
AGCGTTGCTTGAATTGGTTCTTGTGCTGCCAACTTATTATAAGAGTGCCTTGATACTGTGA
CATCTTTTTTTTTTCTTGTGCGACATTTGATCTTTTTTATCTTATCGATTACTGTGTAAT
TTTTAAGATCCTAACTAGATTTTTCTTACAGCTTGCTGGAGTTGTTGCAGTTGAAGTTACT
GGGGTCCAACCTGTTGAGTTCATTCCCTGGAAGACGTGTACGTGAAATAACATTTCTTTATG
AATGGATGCATCTTTTATTGATTACACTTATTAAGTTCTTTTGACCTGAATCAGGATTGCG
TCAGTTTGCCCCCGTGAAGGGCGTCT **TCCTGATGCTAAGAAAG** GTAATTGCCACAAACTA
TTCTTTGAACTGGTCTACCTTTTTCTTTTGTCAATTATAATCATGCTTCCTGACTCCTAGTGT
TTGAAGCAATGAGTCAAATATGTGTTAGTATTCTACATGTATCACATTTAGTCCCATGCA
TTTCTCCTGTACTTGTCTGCTAGTACTCATGTTCTGGCATTTAGTACTTAGTGTGCTTGA
GACAACCAGTTCATGCAATACATAACCGTAATATGTACATTATCTTAAACACACATAACATC
TCTTCATAGATGGGAGCCTCGTCTTTCATTTATCTTATATTCCTGCATATCTGGTATAGTT
GTCATTTAGGTGTCATAACCAGCAGGTGCTGTTGTATGTCTGGTAATTTGTTTTATGTTATT
TATCTGTTTTCTATTCTTCTGCCGAAGTCTGTTTTCTTTCTTACATTTACTGGGATGC
AAGGTGCCAGTTCCTATTTTAGTATTTTAATAACTGGTGCCAGAATCCTGTTTTGATATGT
ATAATCGTAATCATATATCTATTTTTATGGGGTATATCTGCATTTTATCTTTGTTTCATG
AGCAGGTGCACTGCACTTGAGGGACATCTTTTACCGGATGGGCTTATCAGACAAAGATATA
GTAGCTTTATCTGGGGTCACTCTGGTAAATGCTCTAATTAATGTAGAATTTGTGTAAT
GGTAATCCTGATTCTTCATGAGAAGCACAGTTTTTAACTCGCTTTTACTTCAAGGGAA

GGGCACATCCTGAAAGGTCTGGATTTGAAGGCGCATGGACTCAGGAGCCTCTGAAGTTTGA
CAATTCGTACTTTCTGTAAGTTGAATACAAAACCTGGGTCATTTACGTAATAATTCTGGGCA
CTAGATTTGAGGTTAGAAGATAACAGTGTAATATTTTATTTAACTGCAGTGAGCTACTGAA
GGGGGAATCTGAGGGGCTTCTGAAGCTCCCAAC **TGACA AGGCATTGTTGGAAGATCC** TTC
ATTTAGACGCTATGTGGATCTTTATGCCAGGGTAAAAAGGATCTTTTATATATATATTTTTT
TTTCTATTCCCTTGCACTTAAAACCTCCCCATTTTATATGCCCTTTCATCCATTTTTTTAGGA
CTATAGACCATTAACAAACTATAAAGTATTTGAATTTGTTAGTTGAAAATGCAATTAATA
GATTTATTTATTTGTCAAATATGATTTCCGGAGCATTATATTTTTTACAACCTTTACTGCTATA
TAATTGGAAGTGAATAATTTTCAAATGCTACAAGAACTGTGAATATTTTCATGCCGACGTA
CTATGCCCTTGCGGTGCTCCATAATATAAGTTTTACATTCAGAACCATTTCTTCTGTTTATA
TGCCAGGATGAAGACACCTTCTTCAAGGACTACGCTGAATCGCACAGAAGCTTTCTGAAC
TTGGCTTCACTCCACGGAGCAGCGGCCCTGCATCTACGAAATCTGATCTTTCAACTGGTGC
TGTACTCGCACAGAGTGCTGTCGG **GGTAGCTGTTGCTGCAGCTG** TAGTTATCGTGAGCTAC
CTATACGAGGCTTCTAAGAAGAGCAAGTAA

Seqüência cDNA completo(Número de Acesso NCBI: AK070842):

GAGTGAGTACTAGTCACACCACACGCTTGGCTTGACGCCGCACGCCTCCGCTCCGCTCCGC
CGCCGCGGCCGATCTCTCTAGGGCTTCCAACCTCGCCGGCGACGCGACGCCACGCCATGGC
CGCCCCGGTCTGGACGCCGAGTACCTCCGCCAGGTCGACAGGGCGCGCCGCCACCTCCGC
GCCCTCATCTCCTCCAAGGGATGCGCGCCCATCATGCTCCGCCTCGCATGGCATGACGCGG
GCACTTATGACGTGAACACAAAACTGGTGGTGCAAATGGTTCAATTAGATACGAGGAAGA
GTACACTCACGGTTCAAATGCTGGTCTAAAGATTGCTATTGATCTTCTCGAGCCCATTA
GCCAAGAGCCCTAAGATCACATATGCTGACCTTTATCAGCTTGCTGGAGTTGTTGCAGTTG
AAGTTACTGGGGTCCAACCTGTTGAGTTCAATCCTGGAAGACGTGATTCGTAGTTTGCCC
CCGTGAAGGGCGTCT **TCCTGATGCTAAGAAAG** GTGCACTGCACCTTGAGGGACATCTTTTA
CCGGATGGGCTTATCAGACAAAGATATAGTAGCTTTATCTGGGGTCACTCTGGGAAGG
GCACATCCTGAAAGGTCTGGATTTGAAGGCGCATGGACTCAGGAGCCTCTGAAGTTTGACA
ATTCGTACTTTCTTGAGCTACTGAAGGGGAATCTGAGGGGCTTCTGAAGCTCCCAAC **TGA**
CA AGGCATTGTTGGAAGATCC TTCATTTAGACGCTATGTGGATCTTTATGCCAGGGATGA
AGACACCTTCTTCAAGGACTACGCTGAATCGCACAGAAGCTTTCTGAACTTGGCTTCACT
CCACGGAGCAGCGGCCCTGCATCTACGAAATCTGATCTTTCAACTGGTGTGTACTCGCAC
AGAGTGCTGTCCG **GGTAGCTGTTGCTGCAGCTG** TAGTTATCGTGAGCTACCTATACGAGGC
TTCTAAGAAGAGCAAGTAAGATTGCTATGTTCTTCATCAGCATGGCCTCATAGTAAGTATC
AGGGTCAAATAACAGAATTCTAGTGATGATCCAGCCATACGAACACTTCTTCATGTCTAC
ATATACCCTATCAATATTTTCATGGGGAATTATATGGAGATGACATAGCTTCACTATTTAAA
AGCACTTTGGACATATATTATCCGTCTTCTGTGTGCTCTCTAATATCTACAAGAACAGTG
GTTTGTGTCCT

***OsAPx5* (Número de Acesso NCBI: AK073910)**

Seqüência cDNA completo:

TCCCCCCCCCCCCCCCCAAACCCTTCCTCTCCCCTCGACTCCGGCGCCGACATGGCCGTCG
TGCACCGCATCCTCCGCCGCGGGCTCTCCGCCGCTCTCCCCTCCCTTCTCTCCGCGGCCCT
CCTCCTCGTCTCCCCTCAGGAGCTCGGCAGGCGTCCGGCGAGCTCGTTCGTCGTCGGCGGGC
GCGGCTGCGGGGGACGTGGAGGCTGAGCTGCGCGCCGCGCGGGAGGACGTCAGGCAGCTGC
TCAAGTCCAACCCCTGCCATCCCATCCTGGTTTCGGTTAGGGTGGCATGACGCTGGCACTTA
CGATAAGAACATCACTGAATGGCCAAAGTGTGGTGGTGCGAATGGTAGCTTGAGATTTGGA
GTTGAGTTAGTACATGCAGCTAACAAAGGTCTTCTGAAGGCGTTATTCTTGGTCATTCCCA
TCAAGAGCAAGTATGCAGGTGTCACTTATGCAGATATATTTCAACTTGCCAGTGTACAGC
CATTGAGGAAGCCGGTGGCCCCAAGATCCCATGATCTATGGAAGGGCTGATGTTGCTGAT
GGTGAAGAATGCCACCTGAGGGGAGACTTCCTGCTGCTGACCAACCTTCACCTGCTGAAC
ACTTGCGAGAAGTATTCTACAGAATGGGCCCTGAGTGACAAGGAAATTGTTGCGTTGTCAGG
AGCTCATACTTGGTCGAGCTAGACCAGAGCGTAGTGGATGGGGTAAACCAGAAACAAAA
TACTGAAAATGGGCCTGGTGCTCCTG**GAGGGCAATCTTGGACATCTG**AGTGGCTCAAGT
TTGACAACAGCTACTTCAAGGAAATCAAAGAACGCCGAGATGAGGATCTTCTAGTTCTCCC
TACTGATGCTGTGCTCTTTGAGGACTCATCATTCAAGATCCATGCTGAAAAGTATGCTGAG
GATCAGGATGCATTTTTTCGAAGACTATGCTGAAGCTCATGCCAACTGAGCAA**TCTTGGGG**
CAAAGTTTGATCCTCCAAAGGGTATTTCACTTGAATAGCTGGCGTCAGCTGCCGATGAACT
GCATTTTGGCGAGTGATAACAAGATAATACCTTGTTTGTCTTGGTACTATAGAGCATAT
TCTGGTTTTACTACCCATCCAGAAATTTAACTTATTGTAAATGTGATGCTGGTGTGTGTA
TTGAGCTGTGTTACTGCTTGCCATCTTATCTATTGTACTATATTATAAAGATAGCTCGAAA
AAGAGCAACCAAATTTGTTTCAGGTCAACAATTAGATGCATCACACCTCAGTTAGATAATA
CTAGGTTTTTATATAACGAAGTTAGTAATGCG

***OsAPx6* (Número de Acesso NCBI: AK061107)**

Seqüência cDNA completo:

GACCACGGAGCAGCGAACCCTCCCAAACGCCACCAAACCCTCCTCTCCCCACCTCCGC
CGCCGCCGACATGGCCGTCGTCCACCGCCTCCTCCGCCGCGGCCTCTCCGCCGCCTCTCCC
CTCCCCTCTCTTCAGGAGCTCGGGAGGCGTCCGGCGAGCTCGTCCGGCGGCGGCGGCGGGG
ACGCGGCGGCTGAGCTGCGGGGCGCGGGGAGGACGTCAAGCAGCTGCTCAAGTCCACCTC
CTGCCATCCCATCCTGGTTCGGTTAGGGTGGCATGATGCTGGTACTTATGACAAGAACATT
ACTGAATGGCCAAAGTGTGGTGGTGCCAATGGTAGCTTGAGATTCGAAATTGAGTTAAAAC
ATGCGGCTAATGCAGGTCTTGTGAATGCTTTGAAGCTGATCCAGCCATCAAAGACAAGCA
TGCAGGTGTCACCTATGCAGATCTGTTTCAGCTCGCCAGTGCTACAGCCATTGAGGAAGCC
GGTGGCCCCAAGATCCCCATGATCTATGGAAGGGTTGATGTTGCTGCCCTGAACAATGCC
CGCCAGAGGGGAGACTTCCTGCTGCTGGCCCTCCTTCACCTGCGGAACATCTACGAGAAGT
ATTCTATAGAATGGGCCTGAGTGACAAGGAAATTGTTGCATTGTCAGGAGCTCATACTT
GGACGATCTAGACCAGAGCGCAGTGGATGGGGCAAACCAGAACTAAATACACTAAAAACG
GACCTGGTGCACCTG**GAGGGCAATCTTGGACATCAC**AGTGGCTGAAGTTTGATAATAGCTA
CTTCAAGGACATCAAAGAACGCCGAGATGAGGACCTTCTAGTTCTGCCTACTGATGCTGTG
CTCTTTGAGGACTCATCATTCAAGATCTATGCTGAAAAGTACGCCGCAGATCAGGATGCAT
TTTTTTGAAGACTATGCTGAAGCTCATGCCAACTGAGCAA**TCTCGGAGCAAAGTTTGATCC**
TCCAAAGGGTATTTCACTGGAATAAGTGGCGTCTGCTGCCGATGAGCTGCATTTTGGCGAA
TGAACAAGACGATAACCCTGTTTCTTCTTGCTACTATAGAGCATATTATGGTTTTATTACCG
ATCCAGAAATTTAATCCATTGATCGGCAAATGTGATGTTGGTGTTTTGTATTGAGTTGTGC
TCTCCATTAGAAATAAAAATAGCGGTGGCCATTTTCGTTTCCAGGACCAAACATTTTGGCA
CATTACAATACAATGTTTTAGATGATGTCTGCATTGAGCTCTTACACAGGATGATCAAAAT
ATATGACATAATTTTACTG

***OsAPx7* (Número de Acesso NCBI: AB1148551, AK103344)**

Seqüência cDNA completo:

GCAAGGCCACGCTCCCCTCCCTCCCACCAACCCACCACCAGCGTCACCCATGGCGGCCAG
CGACTCGCCGCCCTCCACGCCGCCGCGCCGTCGGCCTTCTCCTCCACCTCCTCCGCCTCGC
ATGGCCGCCCGCGGGCGCGATCCAGCACCACCGCTCTCCTCCCGGTGGCCCTCCCGCGCGC
CTCCGCCACCTCCGCGCCGCACCTTCTCGGCTCCTCCCCAGGAGGCGAAGGCGGCGGGG
AGCGGCAGGTGGTGATGTGCATGGCGTCGGCGTCGGCGTCGGCGGCGTCGGCGGCGGTGG
CGTCGGGCGCGGCGGAGCTGAAGGCCGCTCGCGAGGACATCAGGGAGCTCCTCAAGACGAC
GCACTGCCACCCCATCCTGGTTCGTCTTGGATGGCATGATTCCGGTACGTATGACAAGAAT
ATTAAGAGTGGCCACAACGAGGTGGAGCTAATGGAAGCTTGAGATTTGATGTTGAGTTAA
AACATGGAGCCAATGCTGGGCTGGTAAATGCTCTAAAGCTTGTCCAACCTATCAAGGACAA
ATACCCAAATATCTCATATGCGGATTTATTCCAGCTGGCAAGTGCTACAGCAATTGAGGAA
GCTGGTGGTCCAAAGATTCCAATGACATATGGACGGATTGATGTCACAGGTCCTGAGCAGT
GTCCACCTGAGGGGAAGCTTCCCGATGCTGGCCCAAGTGCACCTGCGGATCACTTGAGGAA
GGTATTTTACAGGATGGGTCTTGATGACAAGGAGATTGTTGTGCTGTCTGGAGCACATACA
CTTGAAGGTCCAGACCTGAACGGAGTGGCTGGGGGAAACCAGAAACGAAATATACTAAGA
ATGGCCCTGGTGCACCTGGTGGGCAATCGTGGACAGCTGAATGGCTTAAGTTTGATAACAG
TTATTTCAAGGAGATAAAAGAGAAAAGAGATCAGGATCTCCTGGTCTTGCCTACAGATGCT
GCATTATTTGAGGACCCAACATTCAGGTCTATGCAGAAAAATACGCAGAGGACCAAGAAG
CATTCTTTAAAGACTATGCCGGAGCTCATGCTAAACT**GAGCAATCTGGGTGCAAAAT**TCAA
TCCTCCTGAGGGATTCACGTTGGACGGTTAATGCGATGCGCATGAGCCAGATCGCTGAAGT
GGCCAACCACTTTTACAGAAAGGATCAAGAGAGAAACACTACACAATCCAATTTCTGCTC
CAACGTTGTGTCATCATTCCAGATGAA**GCTTTTCTGACCAGAG**TCATATTGGATTTGGA
AACTGAGTATTCGAATAAAAAACAGACTGGCTAGAGAGGCAAATTTGAGCCGAACCTGCG
GACCAAATTCGACGAGAAACCAAAAAGAAAAACATTTTAATACTATTCTTTACTTATTATG
CTTT

***OsAPx8* (Número de Acesso NCBI: AB114856.1)**

Seqüência cDNA completo:

AAAACTCACTCGACTCGAGCGCGCGCCATGGCGGAGCGCATCGCCGCCTCCCTCCTCC
CGGCTGCCTCGCCCTCGCCTGCTCCGTCCCCCTCCCCCCCCGCGCCCCCGCGTCTCCGCCGC
GGCCGCCGCCTCCTTCCCATGCTGCTCCACCAGCGCCGGCGGCCTCCGCCTCCGCTCCCGC
CCGTCTCGCTTCCCGCAGAAGGCTGCGACGACGAGGAGCGGGCGCGCCGGCGCGGGGGCGC
GGGCGGTGGTCCGGTGCATGGCGGCGGGCGGTGGCGGCGTCCGACGCGGCGCAGCTCAA
GAGCGCCCCGGAGGACATCAGGGAGATCCTCAAGACCACCTACTGCCACCCCATCATGGTC
CGTCTTGGGTGGCACGATTCTGGCACGTACGACAAGAACATCGAGGAGTGGCCGCAGAGGG
GCGGAGCCGACGGGAGCTTGAGATTTGACGCCGAATTGAGCCACGGAGCCAATGCTGGTCT
GATTAATGCTTTGAAGCTTATCCAACCAATCAAGGACAAATACCCGGGTATAACTTATGCT
GATTTGTTCCAGTTGGCAAGTGTACAGCAATTGAGGAAGCTGGTGGGCCGAAAATTCCAA
TGAAATATGGACGAGTTGATGTCACAGCAGCTGAGCAGTGCCACCAGAGGGGAGGCTTCC
TGATGCCGGTCCACGTGTGCCCGCTGATCATCTTAGGGAGGTATTCTACAGGATGGGCCTT
GATGACAAGGAAATTGTTGCATTATCTGGAGCACACACACTTGGAAGATCAAGACCTGACA
GGAGTGGCTGGGAAAGCCAGAAACAAAATATACTAAGGATGGGCCTGGTGAACCTGGAGG
GCAATCATGGACAGTTGAATGGTTGAAGTTTGATAACAGTTACTTCAAGGACATAAAAGAG
CAAAGGGACCAGGATCTTCTAGTGCTACCCACAGATGCTGCATTATTTGAGGATCCGTCCT
TCAAGGTATATGCCGAAAAATATGCAGAGGATCAGGAGGCATTCTTTAAAGACTACGCTGA
AGCTCATGCTAAACTGAGCGACCTTGGTGCAAAGTTCGATCCACCTGAGGGATTTTCACTG
GACGATGAACCAGCCGTCGAAGAGAAGGATCCTGAACCAGCACCAGCGCCAGCAGCAGCAC
CACCACCTCCACCAGTCGAGGAGAAGAAGGAAGCTGAACCAACTCCAGTACCAGTAACGGT
AGGAGCAGCAGTGGCATCATCGCCAGCGGATGACAACAACGGTGCAGCACCCGCAACCAGAG
CCCTTCGTC**GCTGCGAAATACTCCTACGG**AAAGAAGGAGCTGTCCGACTCGATGAAGCAGA
AGATCAGGGCGGAGTACGAGGGATTCCGAGGCAGCCCGGACAAGCCTCTGCAGTCCAAC TA
CTTCCTCAACATCATGCTCTTGATCGGAGGGCTGGCCTTCTTGACGTCTCTGCTCGGGAGC
TGAGAG**CGATGGTCTGATGACTCCTCT**GACGAGTGTTTTGAGTTGTTCTGCCTGTGCTAA
GATTTGCGTGTTTCTCTTTCCATGTTTTGAGTCGTTATTCCGTAAATAAATTGAGGTAAAA
GGATGGGCATGTGAATGGATTCCAGTACTTTCTGAACTTCTTGAGTAATTCCTCTAGAGAA
ATATTTGTCCGAGAGAAATGTCACATTATCTAGTTGTCATGGCTCATGACT

APÊNDICE 2:

Meios de cultura e solução nutritiva utilizados na transformação de arroz.

A) N6	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,3 g
B) N6	KNO ₃	53,6 g
C) N6	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7 g
D) N6	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3 g
E) N6	KH ₂ PO ₄	8 g
F)	FeSO ₄ .7H ₂ O	556 mg
	Na ₂ EDTA	746 mg
G) B5	H ₃ BO ₃	60 mg
	MnSO ₄ .H ₂ O	200 mg
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	40 mg
	KI	15 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5 mg
	CoCl ₂ .6H ₂ O (substock)	0,5 mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O (substock)	0,5 mg
H) VIT B5	Tiamina	200 mg
	Piridoxina	20 mg
	Ác.Nicotinico	20 mg
	Mio Inositol	2000 mg
	Sacarose	600 g
	Água destilada q.s.p.	2000 mL

Apêndice 2.1. Meio 20x concentrado de NB (UPADHYAYA *et al.*, 2000).

1°	Micro do B5 (100 x conc)	200 mL	mantenha aquecido e só coloque o seguinte quando o anterior estiver dissolvido
2°	Fe EDTA do MS(100 x conc)	200 mL	
3°	Vitaminas do B5(100 x conc)	200 mL	
4°	Sacarose	180 g	
5°	Complete c/água q.s.p.	1000 mL	
6°	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,3 g	
7°	KNO ₃	53,6 g	
8°	Sacarose	180 g	
9°	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7 g	
10°	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3 g	
11°	Sacarose	180 g	
12°	KH ₂ PO ₄	8 g	
13°	Sacarose	60 g	
14°	Caseína Hidrolisada	6 g	
15°	Glutamina	10 g	
16°	Prolina	10 g	
17°	Complete c/água q.s.p.	2000 mL	
Distribuir em alíquotas de 50 mL e 100 mL			

Apêndice 2.2. Meio NB concentrado 20 x (UPADHYAYA et al., 2000). A ordem citada na tabela deve ser mantida para evitar precipitação dos sais.

		Massa/L de meio	Concentração do estoque	Massa/ estoque	Volume do estoque	Volume no meio
A)	KNO ₃	2500 mg	100 X	125 g	500 mL	10 mL
B)	CaCl ₂ .2H ₂ O	150 mg	100 X	7,5 g	500 mL	10 mL
C)	MgSO ₄ .7H ₂ O	250 mg	100 X	12,5 g	500 mL	10 mL
D)	(NH ₄) ₂ SO ₄	134 mg	100 X	6,7 g	500 mL	10 mL
E)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150 mg	100 X	7,5 g	500 mL	10 mL
MICROELEMENTOS		Massa/estoque				
F)*	Na ₂ EDTA	37,3 mg	100 X	3730 mg	1 L	10 mL
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg	100 X	2780 mg		
G)	H ₃ BO ₃	3 mg	100 X	150 mg	499,8 mL**	10 mL
	MnSO ₄ .H ₂ O	10 mg	100 X	500 mg		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 mg	100 X	100 mg		
	KI	0,75 g	100 X	37,5 g		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg	100 X	12,5 mg		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg	1000 X	12,5 mg		
G')**	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg	1000 X	12,5 mg	2mL +200µL	
Vit do B5	Tiamina	10 mg	100 X	500 mg	500 mL	10 mL
	Pyridoxina	1 mg	100 X	50 mg		
	Ac. Nicotínico	1 mg	100 X	50 mg		
	Mio Inositol	100 mg	100 X	5000 mg		

Apêndice 2.3. Soluções estoques de B5 (GAMBORG, 1968).

* aquecer e dissolver os 2 separados, misturar o EDTA no Ferro e completar com H₂O.

**note que é necessário fazer um subestoque G' para melhor precisão de pesagem.

MACROELEMENTOS		Massa/L de meio	Concentração do estoque	Massa/estoque	Volume do estoque	Volume no meio
A)	NH ₄ NO ₃	1,650 g	50 X	82 g	1 L	20 mL
B)	KNO ₃	1,900 g	50 X	95 g	1 L	20 mL
C)	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,370 g	100 X	18,5 g	500 mL	10 mL
D)	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,440 g	100 X	22 g	500 mL	10 mL
E)	KH ₂ PO ₄	0,170 g	100 X	8,5 g	500 mL	10 mL
MICROELEMENTOS		Massa/L de meio		Massa/estoque		
F)*	Na ₂ EDTA	37,3 mg	100 X	3730 mg	1 L	10 mL
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg	100 X	2780 mg		
G)	H ₃ BO ₃	6,2 mg	100 X	310 mg	499,8 mL**	10 mL
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9 mg	100 X	845 mg		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg	100 X	430 mg		
	KI	0,83 mg	100 X	41,5 mg		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg	100 X	12,5 mg		
G')**	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg	1000 X	12,5 mg	2mL	+200µL
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg	1000 X	12,5 mg		
H) Vit do B5***	Tiamina	10 mg	100 X	500 mg	500 mL	10 mL
	Pyridoxina	1 mg	100 X	50 mg		
	Ac. Nicotínico	1 mg	100 X	50 mg		
	Mio Inositol	100 mg	100 X	5000 mg		

* Aquecer e dissolver os 2 separados, misturar o EDTA no Ferro e completar com H₂O.

**Note que é necessário fazer um subestoque G' para melhor precisão de pesagem.

***Não se utiliza as vitaminas do MS, pois esse é muito pobre em tiamina.

Apêndice 2.4. Soluções estoques de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).

		Massa/L de meio		Massa/ 2 L	Volume do concentrado
A)	NH ₄ NO ₃	1,650 g	x20	33 g	
B)	KNO ₃	1,900 g	x20	38 g	
C)	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,370 g	x20	7,4 g	
D)	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,440 g	x20	8,8 g	
E)	KH ₂ PO ₄	0,170 g	x20	3,4 g	
MICROELEMENTOS		Massa/L de meio		Volume/2 L	
F)	Na ₂ EDTA	37,3 mg	10 mLx20	200 mL	COMPLETAR PARA 2000 mL
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg			
	H ₃ BO ₃	6,2 mg			
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9 mg			
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg			
G)	KI	0,83 mg	10 mLx20	200 mL	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg			
	G')CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg			
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg			
H) Vit B5	Tiamina	10 mg	10 mLx20	200 mL	
	Pyridoxina	1 mg			
	Ac. Nicotínico	1 mg			
	Mio Inositol	100 mg			
SACAROSE		30 g	x20	600 g	

Apêndice 2.5. Meio MS 10 X concentrado para o volume de 20 L (MURASHIGE E SKOOG, 1962). Em um erlenmeyer de 2 L deve ser colocado primeiro os líquidos F, G e H e depois os sais, antes de colocar a sacarose, complete para 1 L, pois esse aumenta muito o volume da solução, complete para 2 L e deixe dissolver bem antes de separar em alíquotas de 50 mL e 100 mL, coloque no freezer devidamente fechado e identificado.

	NB sólido	NB líquido	NBA	HTC	Pré-regeneração	Regeneração
NB concentrado (conforme apêndice 2.2)	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Fitigel	3,5 g	--	3,5 g	3,5 g	4,5 g	4,5 g
2,4D (1 mg/mL)	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	--	--
BAP (10 mg/mL)	--	--	--	--	200 µL (2 mg/L)	300 µL (3 mg/L)
ANA (10 mg/mL)	--	--	--	--	100 µL (1 mg/L)	50 µL (0,5 mg/L)
pH*	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Água destilada	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L
Autoclavar	15'	15'	15'	15'	15'	15'
Acetoseríngona (19,62 mg/mL)	--	--	1 mL	--	--	--
Timentina (259 mg/mL)	--	--	--	581 µL (150 µg/mL)	--	--
Cefotaxima (200 mg/mL)	--	--	--	1000 µL (200 µg/mL)	--	--
Higromicina (50 mg/mL)	--	--	--	1000 µL (50 µg/mL)	--	--
ABA (10 mg/mL)	--	--	--	--	500 µL (5 mg/L)	--

Apêndice 2.6. Meios de cultura de tecidos de arroz – *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cv. Nipponbare.

* Dependendo da autoclave a ser utilizada, ocorre alteração do pH do meio. O pH final do meio após ser autoclavado deve ser 5,8.

		N6D
Macroelementos N6 (10X)		
KNO ₃	28,3 g/L	100 mL/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,7 g/L	
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,9 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,6 g/L	
KH ₂ PO ₄	4 g/L	
FeEDTA		
Na ₂ EDTA	37,3 mg	10 mL/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg	
Microelementos N6 (1000X)		
MnSO ₄ .4H ₂ O	440 mg/100 mL	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	150 mg/100 mL	
H ₃ BO ₃	160 mg/100 mL	
KI	80 mg/100 mL	
Vitaminas		
Glicina	20 mg/100 mL	1 mL/L
Tiamina-HCl	10 mg/ 100 mL	
Piridoxina-HCl	5 mg/100 mL	
Ácido Nicotínico	5 mg/100 mL	
Myoinositol		100 mg/L
Caseína hidrolisada		300 mg/L
Prolina		2,9 g/L
2,4D (1 mg/mL)		2 mL/L
Sacarose		30 g/L
Fitigel		3 g/L
pH		5,8
Autoclavar		15 min

Apêndice 2.7. Meios de cultura de tecidos de arros – *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cv. Nipponbare: indução de calos – N6D.

* Dependendo da autoclave a ser utilizada, ocorre alteração do pH do meio. O pH final do meio após ser autoclavado deve ser 5,8.

	MS ½ sem higromicina	MS ½ com higromicina
MS concentrado (conforme apêndice 2.5)	50 mL	50 mL
Fitigel	3,5 g	3,5 g
pH*	5,8	5,8
Água destilada	q.s.p. 1 L	q.s.p. 1 L
Autoclavar	15'	15'
Higromicina (50mg/mL)	--	1000 µL (50 µg/mL)

Apêndice 2.8. Meios de cultura de tecidos de arros – *Oryza sativa* L. subespécie japônica cv. Nipponbare.

* Dependendo da autoclave a ser utilizada, ocorre alteração do pH do meio. O pH final do meio de cultura após ser autoclavado deve ser 5,8.