



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização funcional dos genes de ascorbato
peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre
estresse oxidativo e estresses abióticos**

Andréia Caverzan

Porto Alegre, Fevereiro de 2008

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Caracterização funcional dos genes de ascorbato
peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre
estresse oxidativo e estresses abióticos**

Andréia Caverzan

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro

Porto Alegre, Fevereiro de 2008

Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS.

As agências de financiamento do Projeto de Pesquisa em que se enquadra o presente trabalho de mestrado foram Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology (ICGEB) e Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO).

Agradecimentos

À professora Márcia Margis-Pinheiro, pela sua orientação, acompanhamento, incentivo, atenção e imensa paciência ao longo do trabalho desenvolvido, sobretudo pela compreensão e por sempre estar disponível para ajudar.

Aos professores membros da Comissão de Acompanhamento, Dr. Giancarlo Pasquali e Dr. Rogério Margis. Em especial, ao professor Rogério pela ajuda nos experimentos de *real-time PCR* e ao professor Giancarlo pela revisão da dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação e aos funcionários Sílvia e Luciano, secretários do PPGBCM.

A todos do Laboratório de Genômica e Genética de População de Plantas.

A todos os amigos que conquistei do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, pela ajuda, sobretudo pelo apoio nos momentos difíceis em que passei.

Aos amigos Sílvia, Débora e Júlio, pelo apoio e ajuda.

À amiga Beatriz, pelo incentivo, amizade e sugestões. Muito sucesso em sua vida.

À amiga Gisele, pela sua sinceridade e amizade, alegria, incentivo, também pelas sugestões. Muito sucesso em sua vida de bióloga molecular.

A todos amigos (as) de Passo Fundo, pela amizade e incentivo.

Ao IC Rafael Rauber, pela ajuda nos últimos meses para finalização deste trabalho. Muito sucesso ao longo da sua vida profissional como biólogo.

Ao Delmir, pela amizade, dedicação e carinho que sempre teve comigo, sobretudo pelo incentivo e força.

À minha família, agradeço por terem oferecido-me a oportunidade de estudar. Em especial, à minha mãe pelo incentivo, apoio, estabilidade para que eu pudesse continuar seguindo em frente e por acreditar em mim sempre.

Agradeço a Deus pela força e energia.

Resumo

ERO são produzidas continuamente por organismos aeróbicos. Em situações de estresse, a produção de ERO é aumentada, podendo causar a morte celular. Para manter uma concentração ideal de ERO dentro da célula, as plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante para proteção das membranas celulares e organelas contra os efeitos danosos causados pela ação dessas ERO sobre os tecidos vegetais. A ascorbato peroxidase (APx) é uma das principais enzimas do sistema de detoxificação de ERO nas plantas, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio em água, usando o ascorbato como doador de elétrons. No arroz, oito genes codificam APx. As diferentes isoformas são classificadas de acordo com a localização subcelular em citosólicas (APx1 e APx2), peroxissomais (APx3 e APx4), mitocondriais (APx5 e APx6) e cloroplastídicas (APx7 e APx8). O desenvolvimento do presente trabalho teve como objetivo geral caracterizar funcionalmente os genes de APx em arroz (*Oryza sativa*) com o intuito de identificar a função dos diferentes membros dessa família no controle dos níveis de ERO na planta. Foi analisado o padrão de expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de APx em arroz cultivado sob condições de estresses abióticos tais como o tratamento com concentrações tóxicas de alumínio, frio, seca e exposição ao peróxido de hidrogênio exógeno. Utilizando a estratégia de silenciamento por RNA de interferência (RNAi), foram produzidas construções para o silenciamento simultâneo dos genes *OsAPx5* e *OsAPx6* e, também, para os genes *OsAPx7* e *OsAPx8*. Adicionalmente, foram ainda geradas construções gênicas para o silenciamento individual dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8*. Linhagens de arroz contendo construções RNAi para o silenciamento individual de *OsAPx7* e *OsAPx8* apresentaram redução de cerca de 90% na expressão relativa destes genes quando comparadas com plantas não-transformadas. Os oito membros da família gênica APx em arroz mostraram padrão de expressão diferencial frente às condições de estresse testadas, indicando um complexo modo de regulação desses genes.

Abstract

Aerobic organisms continuously produce Reactive Oxygen Species (ROS). Under stress conditions ROS production is increased and can lead to cellular death. To keep the ideal concentration of ROS inside the cells, plants developed a complex antioxidant system to protect cellular membranes and organelles against harmful effects produced by the action of these ROS. Ascorbate peroxidase (APx) is a major enzyme of the ROS detoxification system in plants, catalyzing the conversion of hydrogen peroxide into water using ascorbate as electron donor. In rice (*Oryza sativa*), eight genes encode APx. The different isoforms are classified according to their subcellular localization in cytosolic (APx1 and APx2), peroxisomal (APx3 and APx4), mitochondrial (APx5 and APx6) or chloroplastidic (APx7 and APx8). The general aim when developing the present work was to functionally characterize the APx genes in rice in order to identify the function of different members of this family in the control of ROS levels in the plant cell. The expression pattern of genes encoding different isoforms of APx in rice was analyzed when plants were grown under abiotic stress conditions such as under the treatment with toxic concentrations of aluminum, cold, drought and exposition to exogenous hydrogen peroxide. Using the strategy of gene silencing by interference RNA (RNAi), were produced RNAi constructs to simultaneously silence the *OsAPx5* and *OsAPx6* genes, and also the *OsAPx7* and *OsAPx8* genes. In addition, it was produced constructs to individually silence the *OsAPx7* and *OsAPx8* genes. Rice lines carrying RNAi to silence *OsAPx7* and *OsAPx8* individually presented reduction of gene expression of about 90% when compared to the expression assayed in non-transformed plants. The eight genes coding APx presented different expression patterns in response to the stress conditions tested, indicating that these genes are under a complex mode of regulation.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Espécies Reativas de Oxigênio	15
1.2 Estratégias para a geração de ERO e seus papéis fisiológicos	17
1.3 Mecanismos celulares para inibição do acúmulo das ERO em diferentes compartimentos	22
1.3.1 Mecanismos não enzimáticos de eliminação de ERO	22
1.3.2 Mecanismos enzimáticos de eliminação de ERO	23
1.3.2.1 Superóxido dismutases	25
1.3.2.2 Catalases.....	26
1.3.2.3 Ascorbato peroxidase	26
1.4 Estresse ambiental e estresse oxidativo.....	31
1.4.1 Alumínio	32
1.4.2 Frio	33
1.4.3 Seca	34
1.5 Arroz: modelo de estudos, importância agrícola e econômica	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAIS	38
3.1 Material vegetal	38
3.2 Meios de cultura para plantas de arroz.....	38
3.2.1 Meio hidropônico para o cultivo de arroz	38
3.2.2 Meio de indução de calos (N6D).....	38
3.2.3 Meio NB para proliferação de calos.....	39
3.2.4 Meio NBA (NB+acetoseringona).....	39
3.2.5 Meio de seleção NB-HTC	39
3.2.6 Meio de pré-regeneração	39
3.2.7 Meio de regeneração.....	40
3.2.8 Meio de cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de arroz.....	40
3.2.9 Meio de cultura para bactérias.....	40

4. MÉTODOS	41
4.1 Construção dos vetores de transformação de planta	41
4.2 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	42
4.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
4.4 Extração de plasmídeos	43
4.5 Transformação de calos de arroz por <i>A. tumefaciens</i>	44
4.6 Extração de DNA genômico de arroz	44
4.7 Extração de RNA total	44
4.8 Síntese de cDNA a partir de RNA total.....	45
4.9 PCR.....	45
4.10 qRT-PCR	45
4.11 Cultivo de plantas para a análise da expressão gênica das ascorbato peroxidases	46
4.11.1 Tratamento com alumínio	47
4.11.2 Tratamento com peróxido de hidrogênio	47
4.11.3 Frio	47
4.11.4 Seca	47
4.11.5 Tratamento com luz UV	48
4.13 Localização <i>in situ</i> de peróxido de hidrogênio	48
4.14 Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS	50
5.1 Construções hpRNA para os genes de APx.....	50
5.2 Obtenção de plantas transgênicas de arroz e análise do nível de transcritos dos genes <i>OsAPx</i> nas mesmas.....	51
5.3 Análises do padrão de expressão dos genes de APx de arroz em resposta a diferentes tratamentos	53
5.3.1 Tratamento com alumínio	53
5.3.2 Tratamento com peróxido de hidrogênio	54
5.3.3 Frio	54
5.3.4 Seca	55

6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO I Inertos RNAi específico.....	90
ANEXO II Inertos RNAi simultâneo.....	91

Lista de Abreviaturas

- ANA - ácido naftalenoacético
- APx - ascorbato peroxidase
- ABA - ácido abscísico
- ASC - ascorbato
- AttB* - sítios para recombinação de DNA baseados no bacteriófago Lambda
- ATP - adenosina trifosfatada
- BAP - N-benziladenina
- °C - graus Celsius
- CAM - metabolismo ácido das crassuláceas
- cm - centímetro(s)
- cDNA - DNA complementar
- CAT - catalase
- cv - cultivar
- DAB - 3,3-diaminobenzidina
- dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- dsRNA - RNA de fita dupla
- DHA - desidroascorbato
- DHAR - desidroascorbato redutase
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- D.O. - densidade ótica
- DTT - 1,4-ditiotreitol
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESTs - etiquetas ou marcas de seqüências expressas, do inglês “*Expressed Sequence Tags*”
- ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- eF - fator de alongação
- FAD - flavina-adenina dinucleotídeo, forma oxidada
- FDH - formaldeído-desidrogenase
- g - grama (gramum - singular; grama - plural)

GFP - proteína fluorescente verde, do inglês "*Green Fluorescent Protein*"

GPx - glutathiona peroxidase

GR - glutathiona redutase

GSH - glutathiona reduzida

GSSG - glutathiona oxidada

GUS - β -glicuronidase

h - hora(s)

HPT - higromicina-fosfotransferase

kb - quilobase(s)

LB - meio Luria-broth (meio de cultura universal para o cultivo de *Escherichia coli*)

min - minuto (s)

mRNA - RNA mensageiro

MS - meio de Murashige e Skoog (meio de cultura universal para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais)

M - molar

MDHA - monodesidroascorbato

MDHAR - monodesidroascorbato redutase

mg - miligrama

ml - mililitro(s)

mM - milimolar

M-MLV - Vírus Moloney da leucemia de murinos, do inglês "*Moloney Murine Leukemia Virus*"

NAD⁺/NADH - nicotinamida-adenina dinucleotídeo, forma oxidada/forma reduzida

NADP⁺/NADPH - nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato, oxidada/reduzida

NAD(P)H-DH - NAD(P)H-desidrogenase

ng - nanograma

NCBI - do inglês "*National Center for Biotechnology Information*"

nM - nanomolar

ORF - fase aberta de leitura, do inglês "*Open Reading Frame*"

Os - *Oryza sativa*, arroz

OsAPx - ascorbato peroxidase de *Oryza sativa*

P - fósforo

pb - par (es) de bases

ppm - partes por milhão

PCR - reação em cadeia da DNA-polimerase, do inglês "*Polymerase Chain Reaction*"

PSI - fotossistema I

qRT-PCR - reação em cadeia da DNA-polimerase em tempo real (ou quantitativa) precedida de transcrição reversa, do inglês "*Quantitative (or real-time) Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*".

pH - potencial hidrogeniônico

poli-T - oligonucleotídeo de desoxitimidina

RNA - ácido ribonucléico

RNAi - RNA de interferência

rpm - rotação(ões) por minuto

s - segundo(s)

SDS - dodecil sulfato de sódio

SOD - superóxido dismutase

T-DNA - DNA de transferência, sendo este parte do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*

Tris - tri-hidroximetilaminometano

UV - luz ultravioleta

Ubi - ubiquitina

Ω - ohm

μg - micrograma

μl - microlitro(s)

μM - micromolar

V – volume

xg- aceleração da gravidade

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Formação de ERO pela redução univalente do oxigênio molecular (reproduzido de SCANDALIOS, 2002) “Overall reaction”, do inglês, significa “reação geral”).	17
Figura 2. A eliminação enzimática de ERO via ciclo do ascorbato-glutationa....	28
Figura 3. Estrutura protéica das isoformas de APx em plantas superiores.....	31
Figura 4. Confirmação da obtenção dos clones RNAiOsAPx5/6 e RNAiOsAPx7/8.	67
Figura 5. Confirmação da obtenção dos clones RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8.	68
Figura 6. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com os clones RNAiOsAPx5/6 e RNAiOsAPx7/8.	69
Figura 7. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com os clones RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8.	70
Figura 8. Confirmação da transformação genética das plantas de arroz.	71
Figura 9. Plantas transgênicas RNAiOsAPX7 e RNAiOsAPx8.	73
Figura 10. Análises por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos níveis de mRNA em plantas RNAiOsAPx.	74
Figura 11. Quantificação dos transcritos correspondentes aos genes <i>OsAPx</i> nas plantas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8.	75
Figura 12. Determinação do nível de expressão dos genes da família das	

APx de arroz em resposta ao tratamento com Al.	76
Figura 13. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz em resposta ao tratamento com H ₂ O ₂	77
Figura 14. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz submetidas ao frio.	78
Figura 15. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz submetidas à seca.	79
Figura 16. Sistema de clonagem Gateway para construção RNAi.	80
Figura 17. Representação esquemática das reações de PCR com os <i>primers</i> específicos para as construções OsRNAi.....	81
Tabela 1. Exemplos de danos oxidativos causados pelas ERO ao DNA, lipídeos e proteínas (adaptado de SCANDALIOS, 2005).	21
Tabela 2. Antioxidantes naturais enzimáticos e não-enzimáticos (adaptado de SCANDALIOS, 2005).	24
Tabela 3. Estrutura dos genes e principais características das isoformas de ascorbato peroxidase em arroz (reproduzido de TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2004).	30
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados nas análises de expressão dos genes APx por qRT-PCR.	49
Tabela 5. Construções RNAi para o silenciamento específico dos genes de <i>OsAPx</i>	82
Tabela 6. Construções RNAi para o silenciamento simultâneo dos genes de <i>OsAPx</i>	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécies Reativas de Oxigênio

O acúmulo de oxigênio na atmosfera mudou profundamente as condições necessárias para a vida na Terra. Usando a água como fonte redutora e liberando oxigênio no ambiente, a fotossíntese mudou a atmosfera da terra de um ambiente redutor para um oxidado, alterando a direção da evolução. O acúmulo do dióxigênio (O_2) na atmosfera da Terra proporcionou a evolução de uma grande variedade de organismos aeróbicos que usam oxigênio como aceptor de elétrons, fornecendo, deste modo, um alto rendimento de energia, quando comparado com a fermentação e a respiração anaeróbica (SCANDALIOS, 2002; 2005).

O metabolismo aeróbico é um processo oxidativo onde os compostos orgânicos são oxidados e metabólitos intermediários como, por exemplo, a nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD^+) e a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), atuam como receptores de elétrons e estes, por sua vez, são re-oxidados nas mitocôndrias para a produção de adenosina trifosfatada (ATP). Na cadeia transportadora de elétrons, a energia é liberada e controlada pela transferência de elétrons entre os diferentes carreadores até o receptor final, o oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Uma limitação química da molécula de O_2 faz com que a adição de elétrons ocorra por meio de reações seqüenciais de redução univalente, o que leva à formação de intermediários parcialmente reduzidos conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (**Figura 1**); (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; SCANDALIOS, 2002). A expressão “radical livre” também é empregada para designar as ERO sendo que, quimicamente, um radical livre é definido como um átomo, íon ou molécula química capaz de existência independente e que possui um ou mais elétrons livres não pareados.

Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados, têm uma instabilidade elétrica muito grande e, por esta razão, mesmo tendo meia-vida muito curta, apresentam alta capacidade reativa. Sendo assim, são consideradas ERO o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o oxigênio singleto (1O_2)

e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BOLWELL & WOJTASZEK, 1997; SCANDALIOS, 2002; SHARMA & DUBEY, 2004).

O peróxido de hidrogênio, que é a forma protonada do íon peróxido, não possui qualquer elétron não pareado e, portanto, não é considerado um radical livre (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). No entanto, o peróxido de hidrogênio tem uma grande importância nos sistemas biológicos por sua capacidade de gerar o radical hidroxila na presença de metais divalentes. Sendo assim, o peróxido de hidrogênio é considerado uma ERO. O peróxido de hidrogênio é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar a sua passagem através da camada bilipídica da membrana celular. Essa capacidade de se difundir rapidamente através da membrana celular favorece a rápida indução da resposta vegetal. O superóxido pode ser produzido por meio de vários mecanismos incluindo a ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases da parede celular e lipoxigenases como resultado imediato da transferência de elétrons nas mitocôndrias ou nos cloroplastos. Como consequência, o peróxido de hidrogênio pode oxidar várias moléculas orgânicas como o ascorbato (ASC) (REZENDE, 2003). Os radicais hidroxila, embora tenham meia-vida curta, são ERO potencialmente fortes e com alta afinidade por biomoléculas no seu sítio de produção (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), o que dificulta o estudo dos mesmos.

Em comum, os diferentes tipos de ERO possuem a capacidade de causar danos às proteínas, ao DNA e aos lipídeos, podendo levar à morte celular. Várias evidências indicam que as ERO também funcionam como moléculas sinalizadoras em plantas e que possuem um papel importante na ativação de fatores de transcrição, ativando (ou reprimindo) a expressão de genes relacionados com a resposta de defesa a patógenos, e durante o desenvolvimento da planta (SCANDALIOS, 2002; APEL & HIRT, 2004). Estudos recentes realizados por diferentes grupos utilizando diversos organismos indicam que o estresse oxidativo é um denominador comum fundamental em muitas doenças e estresses ambientais, os quais podem levar à morte celular em todos os organismos aeróbicos. Este fato demonstra que os estresses abióticos e bióticos causam seus

efeitos deletérios direta ou indiretamente, via geração de ERO (SCANDALIOS, 2005).

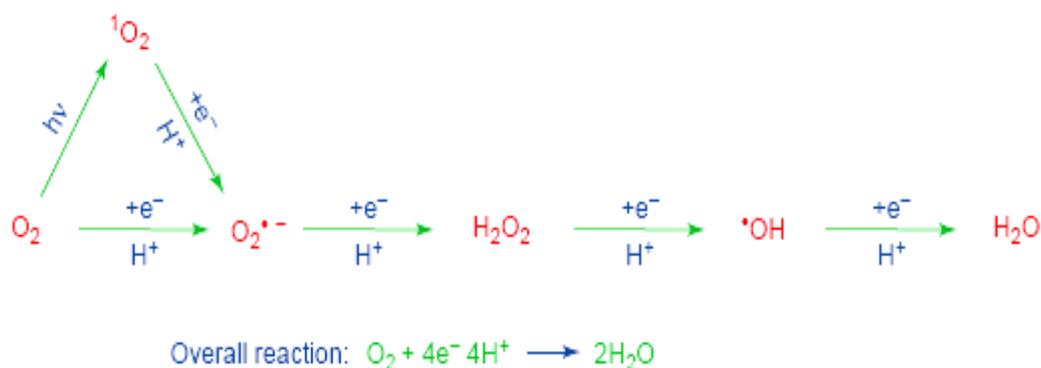


Figura 1. Formação de ERO pela redução univalente do oxigênio molecular (reproduzido de SCANDALIOS, 2002) “Overall reaction”, do inglês, significa “reação geral”).

1.2 Estratégias para a geração de ERO e seus papéis fisiológicos

As ERO são geradas em diferentes compartimentos celulares, como subprodutos do metabolismo aeróbico. Plantas e animais possuem mecanismos comuns de produção de ERO que são a respiração celular e as reações oxidativas que ocorrem no sistema de endomembranas e nos peroxissomos. No entanto, alguns mecanismos são particulares do reino vegetal. Sendo assim, uma ênfase desses mecanismos específicos será apresentada neste trabalho.

Em condições fisiológicas, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO pode ser perturbado por fatores ambientais adversos. Como resultado desses distúrbios, o nível intracelular de ERO pode aumentar rapidamente. Cada organela ou compartimento tem o potencial para ser alvo de danos oxidativos, assim como possuem mecanismos de eliminação de excesso das ERO (SCANDALIOS, 2005). As organelas com alta taxa de atividade metabólica oxidante e com uma alta taxa de fluxo de elétrons, como os cloroplastos e as mitocôndrias, são a maior fonte de produção dessas espécies reativas nas células

das plantas. Muitas reações envolvidas na fotossíntese e na respiração são responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio. Isto significa que o peróxido de hidrogênio e outras ERO são inevitavelmente produtos do metabolismo aeróbico normal. As plantas também geram ERO ativando várias oxidases e peroxidases que as produzem em resposta a certas mudanças ambientais (MITTLER *et al.*, 2004).

O rápido aumento na concentração de ERO é chamado de explosão oxidativa (do inglês, “*oxidative burst*”). As condições externas que afetam adversamente as plantas podem ser bióticas, impostas por outros organismos, ou abióticas, originadas de um excesso ou déficit no ambiente físico ou químico. (APEL & HIRT, 2004). O termo “estresse oxidativo” refere-se a uma situação de sérios desequilíbrios entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes. Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar da diminuição dos antioxidantes ou, então, do aumento da produção de ERO. As células normalmente toleram o estresse oxidativo brando, o qual freqüentemente resulta na modificação da regulação do sistema de defesa antioxidante na tentativa de restaurar o balanço oxidante e antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Quando o estresse oxidativo ocorre, a célula age contra o efeito oxidante para restaurar o balanço redox. Desta maneira, a atividade celular conduz à ativação ou ao silenciamento de genes que codificam enzimas de defesa, fatores de transcrição e proteínas estruturais (SCANDALIOS, 2005).

O oxigênio é continuamente produzido durante o transporte de elétrons fotossintético e simultaneamente removido dos cloroplastos pelo processo de redução e assimilação. Existem alguns processos associados à fotossíntese que consomem oxigênio diretamente como, por exemplo, a reação de oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxigenase (rubisco) e a redução direta do oxigênio molecular pelo fotossistema I (PSI) durante o transporte de elétrons (APEL & HIRT, 2004). Os dois processos primários envolvidos na formação de ERO durante a fotossíntese são a fotorredução do oxigênio produzindo o radical superóxido devido à redução dos componentes de transporte de elétrons associados com o PSI, e reações ligadas ao ciclo foto-respiratório, incluindo a

rubisco no cloroplasto e a glicolato-oxidase e a catalase (CAT)-peroxidases no peroxissomo. (APEL & HIRT, 2004).

A formação de ERO impõe riscos oxidativos aos seres vivos. Por outro lado, estas moléculas apresentam um potencial para desempenhar papéis fisiológicos importantes, atuando como moléculas para a transdução de sinais e tendo significativa função na ativação de fatores de transcrição como o NF-kB e AP1 (ambos envolvidos na proliferação e diferenciação celular e morfogênese). Baixas doses de peróxido de hidrogênio (<20 μ M) podem induzir mudanças na fosforilação de proteínas regulatórias específicas. Além disto, as ERO estão também envolvidas na indução da expressão de genes de defesa contra patógenos, na formação da parede celular e na promoção da morte celular programada (SCANDALIOS, 2002; APEL & HIRT, 2004).

A geração de ERO nos compartimentos celulares como mitocôndria e cloroplasto resulta na mudança do transcriptoma nuclear, indicando que a informação deve ser transmitida dessas organelas para o núcleo. No entanto, a identidade do sinal transmitido permanece desconhecida (APEL & HIRT 2004). Segundo os mesmos autores, existem três modos principais de ação pelas quais as ERO podem afetar a expressão gênica: i- sensores de ERO devem ser ativados para induzir cascatas de sinalização que resultam na repressão ou na expressão dos genes; ii- componentes das rotas de sinalização podem ser oxidados pelas ERO; iii- as ERO podem mudar a expressão dos genes modificando a atividade de fatores de transcrição.

Em plantas, o peróxido de hidrogênio mantém-se no citoplasma das células em concentrações suficientes para alcançar os núcleos das células vegetais ou de patógenos, podendo reagir com íons metálicos intracelulares. Desta forma, embora moderadamente reativas, muito do prejuízo celular causado por peróxido de hidrogênio e pelo radical peróxido resulta da conversão destas moléculas para espécies ainda mais reativas (MOLLER, 2001). Conforme já mencionado, esses radicais podem reagir com proteínas e, assim, reduzir a atividade de enzimas. Além disso, podem reagir com lipídeos e modificar a

permeabilidade das membranas e, ainda, reagir com o DNA causando mutações (Tabela 1).

Por muitos anos, o cloroplasto foi considerado a principal fonte de produção de ERO nas células e, conseqüentemente, um dos principais alvos de danos durante o estresse. Segundo MITTLER (2002), além do cloroplasto, outros compartimentos subcelulares são considerados fontes adicionais de ERO, tais como a mitocôndria e o núcleo. Quando as plantas são expostas à luz, a quantidade de peróxido de hidrogênio produzida na mitocôndria é menor que a dos cloroplastos ou peroxissomos, mas, no escuro ou em tecidos não-verdes, a mitocôndria pode ser a maior fonte de ERO (SLESÁK *et al.*, 2007). Além disso, estudos recentes demonstraram que a mitocôndria é uma reguladora-chave da morte celular programada em plantas e que o aumento do nível de ERO na mitocôndria pode conduzir à morte celular programada. Ambos, mitocôndrias e cloroplastos, contêm mecanismos de eliminação de ERO. Por outro lado, pouco é conhecido sobre as propriedades de eliminação dessas espécies no núcleo (MITTLER, 2002).

As ERO produzidas em um sítio específico por exemplo, no cloroplasto durante um certo estresse e no apoplasto durante o ataque de um patógeno, podem afetar outros compartimentos celulares, reduzindo a capacidade dos mesmos em eliminá-las, alterando o padrão de expressão de genes durante o estresse, infecção por patógeno e morte celular programada. O citosol, com o ciclo do ascorbato-glutationa, e os peroxissomos, com CAT, podem atuar como zonas de proteção para o controle de todos os níveis de ERO que reagem com diferentes compartimentos celulares durante estresse e o metabolismo normal. Sendo assim, a importância do peroxissomo no metabolismo das ERO está começando a ganhar reconhecimento devido ao fato de que os peroxissomos não são apenas o sítio de detoxificação de ERO pela CAT mas, também, por serem o sítio de produção de ERO pela glicolato-oxidase e pela β -oxidação de ácidos graxos, podendo ser também um sítio celular para a síntese do óxido nítrico (MITTLER, 2002; APEL & HIRT, 2004).

O peróxido de hidrogênio é também produzido no citoplasma, na membrana plasmática e na matriz extracelular. No citoplasma, a cadeia de

transporte de elétrons associada com o retículo endoplasmático é a principal fonte de peróxido de hidrogênio/ERO. O citosol não pode ser considerado como a principal fonte de peróxido de hidrogênio nas células das plantas, mas ele pode atuar na eliminação do peróxido de hidrogênio de outros compartimentos celulares. No entanto, a função do peróxido de hidrogênio gerado no citosol ainda não é compreendida (SLESÁK *et al.*, 2007).

Tabela 1. Exemplos de danos oxidativos causados pelas ERO ao DNA, lipídeos e proteínas (adaptado de SCANDALIOS, 2005).

Danos oxidativos ao DNA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ deleções, mutações e translocações ▪ degradação de bases e quebra de fitas simples ▪ ligação cruzada entre DNA e proteínas
Danos oxidativos aos lipídios
<ul style="list-style-type: none"> ▪ ocorre via vários mecanismos envolvendo a reação de ERO com ácidos graxos na membrana lipídica, conduzindo à morte celular ▪ nos alimentos, a peroxidação de lipídios desenvolve odores e sabores desagradáveis
Danos oxidativos às proteínas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ modificações de sítios específicos nos aminoácidos ▪ fragmentação da cadeia peptídica ▪ alteração da carga elétrica ▪ aumento da suscetibilidade à proteólise ▪ oxidação de centros Fe-S pelo superóxido que destrói funções enzimáticas ▪ oxidação de aminoácidos específicos

1.3 Mecanismos celulares para a inibição do acúmulo das ERO em diferentes compartimentos

A célula dispõe de vários mecanismos para evitar o acúmulo de ERO. Segundo MITTLER (2002), esses mecanismos incluem adaptações anatômicas como o movimento e o dobramento da folha, o desenvolvimento de uma epiderme refratária e de estômatos escondidos sob estruturas especializadas, adaptações fisiológicas como o metabolismo das plantas C₄ e CAM e mecanismos moleculares que rearranjam os aparatos fotossintéticos e seus pigmentos de acordo com a qualidade e a intensidade da luz, ou completamente suprimem a fotossíntese.

A produção de ERO também pode ser evitada nas mitocôndrias e nos cloroplastos pelas enzimas oxidases alternativas que podem desviar elétrons da cadeia de transporte de elétrons e usá-los para reduzir o oxigênio à água. Essa estratégia permite, por um lado, evitar a formação de ERO e, por outro, diminuir a concentração de oxigênio celular. Moléculas antioxidantes, enzimas simples e um sistema mais complexo de detoxificação podem estar envolvidos na proteção celular contra o acúmulo de ERO. Conhecidas como “scavengers” ou “recicladoras”, várias enzimas antioxidantes reguladoras impedem a ação tóxica das ERO nas células vegetais (MITTLER, 2002; MITTLER *et al*, 2004).

1.3.1 Mecanismos não enzimáticos de eliminação de ERO

Antioxidantes não enzimáticos são encontrados em todos os compartimentos celulares. HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) definiram os compostos antioxidantes como substâncias que em concentrações relativamente baixas competem com outros substratos oxidáveis e, portanto, diminuem ou inibem a oxidação destes substratos. Sob esta definição encontram-se os componentes com propriedades intrínsecas como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e glutathiona (GSH). Adicionalmente, incluem-se nesta classe flavonóides, alcalóides e carotenóides (**Tabela 2**) (APEL & HIRT, 2004; SACANDALIOS, 2005). Estes podem atuar diretamente na detoxificação de ERO e radicais derivados ou, então, atuar como substratos redutores para as enzimas antioxidantes (MITTLER, 2002).

A GSH, por exemplo, é oxidada por ERO formando glutathiona oxidada (GSSG), a qual está presente em todos os compartimentos celulares. Ela é também a principal forma de armazenamento do enxofre e atua como detoxificadora de xenobióticos pela conjugação GSH. Junto com sua forma oxidada GSSG, a GSH mantém o balanço redox nos compartimentos celulares. Vários estudos indicam que a mesma está envolvida na regulação da expressão de genes e também no ciclo celular devido às propriedades do par GSH:GSSG (MITTLER, 2002).

Nas plantas, o ASC é encontrado nas organelas da maioria dos tipos celulares e também no apoplasto. A capacidade de doar elétrons em reações enzimáticas e não enzimáticas faz do ASC o principal componente detoxificador das ERO na fase aquosa. O ASC pode eliminar diretamente o superóxido, os radicais hidroxila e o oxigênio singlete e, assim, reduzir o peróxido de hidrogênio à água via reação da ascorbato peroxidase (BLOKINA *et al.*, 2003). Segundo os mesmos autores, o ASC está envolvido na regulação da divisão celular, na progressão da fase G1 para S do ciclo celular e na alongação celular.

Com relação aos componentes fenólicos, flavonóides e carotenóides, pouco é conhecido sobre a atividade de detoxificação de ERO por esses compostos em plantas. O α -tocoferol (vitamina E) é o maior detoxificador de radicais peroxila (ROO^{\cdot}) em bicamadas lipídicas. O α -tocoferol presente na membrana dos cloroplastos protege a mesma contra danos foto-oxidativos. Em relação às várias funções não antioxidantes da vitamina E na membrana, acredita-se que a mesma estabiliza a estrutura da membrana e modula a fluidez de uma maneira similar ao colesterol e, também, a permeabilidade da membrana para pequenos íons e moléculas (BLOKINA *et al.*, 2003).

1.3.2 Mecanismos enzimáticos de eliminação de ERO

As enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de ERO em plantas incluem a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APx), a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT), a glutathiona S-transferase, peroxidases (não-específicas), a monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e a desidroascorbato redutase (DHAR), (**Tabela 2**) (APEL & HIRT, 2004;

SACANDALIOS, 2005). As SODs atuam na primeira linha de defesa contra as ERO, dismutando o superóxido a peróxido de hidrogênio. As enzimas APx, GPX e CAT subseqüentemente detoxificam o peróxido de hidrogênio. Ao contrário da CAT, a APx requer um sistema de regeneração do ascorbato e GSH, o ciclo do ascorbato-glutationa (**Figura 2**).

Ao contrário de muitos organismos, as plantas possuem múltiplos genes codificando SOD e APx. Diferentes isoformas são específicas dos cloroplastos, das mitocôndrias e dos peroxissomos, bem como do citosol. A abrangência do estresse oxidativo numa célula é determinada pela quantidade de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Desta maneira, o balanço da atividade de SOD, APx e CAT parece ser crucial para reduzir o nível tóxico de ERO em uma célula, sendo que mudanças no balanço dessas parecem induzir mecanismos compensatórios (APEL & HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2002; 2005).

Tabela 2- Antioxidantes naturais enzimáticos e não-enzimáticos (adaptado de SCANDALIOS, 2005).

Antioxidantes não-enzimáticos		
Molécula antioxidante	Localização subcelular	
Ascorbato (vitamina C)	Plastídeo;	apoplasto; citosol; vacúolo;
β-Caroteno	Plastídeo	
Glutationa, reduzida (GSH)	Plastídeos; mitocôndria; citosol	
Poliaminas (putrescina, espermina)	Núcleo;	plastídeo; mitocôndria; citosol
α-Tocoferol	Membranas celular e de plastídeo	
Zeaxantina	Cloroplasto	
Antioxidantes enzimáticos		
Enzima	Numero EC	Localização subcelular
Ascorbato peroxidase	1.11.1.11	Citosol, estroma e membranas de plastídeo, peroxissomo, mitocôndria

Peroxidasas (não-específicas)	1.11.1.7	Citosol; parede celular
Catalase	1.11.1.6	Glioxissomo; peroxissomo; citosol; mitocôndria
Superóxido dismutase	1.15.1.1	Citosol (Cu/ZnSOD); plastídeo (Cu/ZnSOD; FeSOD); mitocôndria (MnSOD); peroxissomo; citosol; plastídeo
Desidroascorbato redutase	1.8.5.1	Citosol; plastídeo
Glutationa redutase	1.6.4.2	Mitocôndria; citosol; plastídeo
Monodesidroascorbato redutase	1.6.5.4	Estroma dos plastídeos
Glutationa S-transferase	2.5.1.18	Citosol; microssoma

1.3.2.1 Superóxido dismutases

O radical superóxido é o primeiro intermediário formado pela adição de um elétron ao O_2 , este radical pode sofrer dismutação espontânea, no entanto, nas células as enzimas superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) catalisam a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio (APEL & HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005). Essas enzimas podem estar ligadas a um íon metálico (Cu/Zn, Mn, Fe e Ni). As SODs foram isoladas e caracterizadas em muitos organismos. São consideradas importantes agentes antioxidantes, sendo extremamente eficientes, reagindo com o superóxido em uma velocidade limitada apenas pela difusão. Essas proteínas estão presentes desde bactérias e leveduras a animais e plantas (HALLIWEL & GUTERIDGE, 1999).

Uma classe de superóxido dismutases consiste das SODs contendo Cu (I) e Zn (I) no sítio ativo (Cu/ZnSOD), outra contendo Mn (II) (MnSOD), uma terceira com o Fe (III) (FeSOD) e uma quarta classe com o Ni (Iv) (NiSOD). As Cu/ZnSODs são geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas, em cloroplastos e em alguns procariotos. As MnSODs encontram-se em procariotos e na mitocôndria. As FeSODs são geralmente encontradas em procariotos, em algas e em alguns cloroplastos de plantas superiores. Já as NiSODs foram

encontradas em *Streptomyces*. Ao contrário de muitos organismos que possuem apenas um tipo de cada SOD nos vários compartimentos celulares, as plantas têm múltiplas formas de cada tipo, codificadas por mais de um gene (SCANDALIOS, 2005).

1.3.2.2 Catalases

As catalases (CAT, EC 1.11.1.6) são proteínas tetraméricas que catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio em água. São amplamente distribuídas em organismos como bactérias, alguns eucariotos inferiores, fungos, animais e plantas. São largamente, mas não exclusivamente, encontradas nos peroxissomos, organelas que possuem metabolismo primariamente oxidativo. São altamente eficientes podendo atuar sobre o peróxido de hidrogênio produzido antes mesmo dele difundir-se para outras partes da célula. Como no caso das SODs, múltiplas CATs são codificadas por genes específicos em plantas, enquanto os animais possuem apenas uma forma de CAT. Ambos os genes, *Cat* e *Sod*, respondem diferentemente a vários estresses que produzem ERO (SCANDALIOS, 2005).

1.3.2.3 Ascorbato peroxidase

As peroxidases exercem importantes funções na defesa antioxidante, removendo peróxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio gerado pelas reações de oxi-redução. Nas plantas, as peroxidases são classificadas em três classes. A classe I corresponde às peroxidases intracelulares de origem procariótica (ex. citocromo c-peroxidase, ascorbato peroxidase); a classe II inclui as enzimas secretórias de fungos (ex. peroxidase dependente de manganês); e a classe III que são as enzimas secretórias de plantas (TEIXEIRA *et al.*, 2004). As ascorbato peroxidases (APx, EC 1.1.11.1) são membros da classe I da super-família de heme-peroxidases, cujo grupo prostético é a protoporfirina e são reguladas por sinal redox e peróxido de hidrogênio (SHARMA & DUBEY, 2004). Elas são encontradas em plantas superiores, clorófitas e algas vermelhas. As APx apresentam alta especificidade por ascorbato como substrato redutor e catalisam a redução do peróxido de hidrogênio em água.

O processo de detoxificação do peróxido de hidrogênio catalisado pela enzima ascorbato peroxidase é acompanhado por uma série de reações que, em conjunto, formam uma das vias antioxidantes mais importantes presentes nas plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa (**Figura 2**). Neste ciclo, o ascorbato e a glutathione são utilizados como fonte redutora para a detoxificação do peróxido de hidrogênio e os compostos oxidados são recuperados por várias reações, à custa de ATP e NAD(P)H. Desta maneira, o radical monodesidroascorbato (MDHA), gerado pela oxidação do ascorbato pela APx durante a detoxificação do peróxido de hidrogênio é regenerado por duas vias: ele pode ser convertido à ascorbato pela ação da enzima monodesidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4) utilizando NAD(P)H ou, então, devido à sua instabilidade, ele pode gerar o radical desidroascorbato (DHA) em uma reação não enzimática. Em seguida, o DHA é regenerado a ascorbato pela enzima desidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1) utilizando o glutathione como fonte redutora. Por fim, a glutathione oxidada é recuperada pela ação da glutathione redutase (GR EC1.8.1.7), às custas de NAD(P)H (**Figura 2**) (TEIXEIRA *et al.*, 2005). O principal papel do ciclo do ascorbato-glutationa é a proteção dos compartimentos celulares contra os danos oxidativos causados pelas ERO. Nas plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa é particularmente importante nos cloroplastos, visto que estes são importantes fontes produtoras de peróxido de hidrogênio. Este ciclo também opera no citosol, no peroxissomo e nas mitocôndrias (JIMÉNEZ *et al.*, 1997).

Por apresentar alta especificidade por ascorbato, uma das propriedades característica da APx é a sua instabilidade na ausência de ASC. Sob condições onde a concentração de ASC é menor que 20 μM , a atividade da APx é rapidamente perdida (SHIGEOKA *et al.*, 2002). As isoenzimas APx são distribuídas em quatro compartimentos celulares distintos: mitocôndria (miAPx), citosol (cAPx), peroxissomo/glioxissomo (mAPx) e no cloroplasto (chlAPx). No cloroplasto, a APx ocorre em duas isoformas: a forma solúvel no estroma (sAPx) e a forma da membrana tilacóide (tAPx) (MANO, *et al.*, 1997; YOSHIMURA, *et al.*, 2000; SHIGEOKA *et al.*, 2002; MADHUSUDHAM *et al.*, 2003; MITTOVA, *et al.*, 2004). Segundo ASAI *et al.* (2004), as APx estromal e da membrana tilacóide estão envolvidas na eliminação do peróxido de hidrogênio produzido pela

fotossíntese e a mAPX e a miAPX eliminam o peróxido de hidrogênio produzido pela foto-respiração e pela respiração, respectivamente. A função fisiológica da cAPx parece ser a proteção das plantas sob várias condições de estresse. Em arroz e *Arabidopsis*, as isoformas cloroplastídicas são codificadas por genes distintos (JESPERSEN *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Os componentes enzimáticos podem funcionar independentemente em diferentes compartimentos celulares ou, então, cooperarem um com o(s) outro(s). As APx protegem as células contra o peróxido de hidrogênio sob condições normais, bem como em condições estressantes. O aumento da atividade de APx em resposta a estresses ambientais como salinidade, frio, intoxicação por metais, seca, calor, ozônio, alta intensidade luminosa e ataque por patógenos, entre outros, tem sido relatada em diferentes espécies de plantas (YOSHIMURA *et al.*, 2000; MITTOVA *et al.*, 2004; SHARMA & DUBEY, 2004). Esses dados indicam que estas enzimas desempenham papel importante na detoxificação de ERO produzidas em condições de estresses (SHIGEOKA *et al.*, 2002).

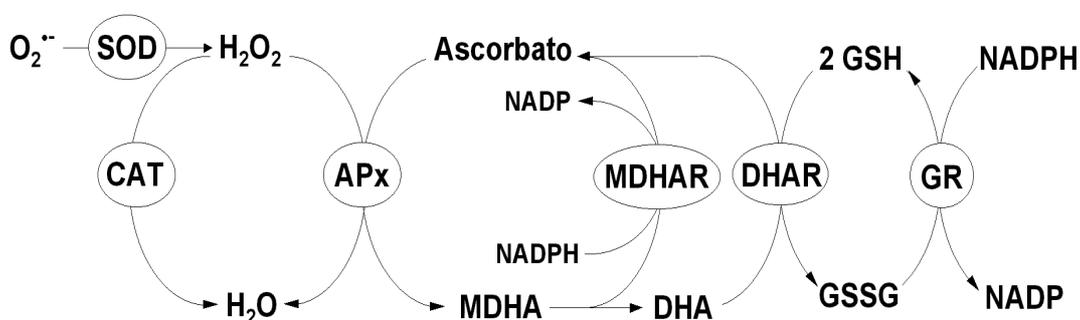


Figura 2. A eliminação enzimática de ERO via ciclo do ascorbato-glutationa. APx – Ascorbato peroxidase; CAT – Catalase; DHA – Desidroascorbato; DHAR – Desidroascorbato redutase; MDHA – Monodesidroascorbato; MDHAR – Monodesidroascorbato-redutase; GR – Glutationa redutase; GSH – Glutationa reduzida; GSSG – Glutationa oxidada; SOD – Superóxido dismutase (reproduzido de TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Diversas seqüências gênicas e de cDNA foram obtidas a partir de diferentes espécies de plantas, indicando que as APx são largamente distribuídas no reino vegetal, sendo codificadas por pequenas famílias gênicas (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Análises *in silico* indicaram que as APx de arroz são codificadas por uma família gênica de oito membros e que os produtos desses genes estão localizados em diferentes compartimentos celulares: duas isoformas citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*); duas isoformas peroxissomais/glioxissomais (*OsAPx3* e *OsAPx4*); e quatro isoformas cloroplastídicas (*OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*), sendo que *OsAPx8* pode estar associada à membrana tilacóide.

A localização cromossômica de cada um dos genes de APx, os códigos de acesso aos cDNAs e proteínas no banco de dados “*GenBank*” acessáveis pelas ferramentas de bioinformática disponíveis pelo “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), os números de éxons e íntrons, os tamanhos dos cDNAs e das fases abertas de leitura (ORF, do inglês, “*open reading frame*”), os tamanhos preditos das proteínas, os números de aminoácidos e as prováveis localizações subcelulares dos produtos gênicos estão indicados na **Tabela 3** (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Em *Arabidopsis*, seis genes APx foram descritos, sendo que seus produtos gênicos apresentam as seguintes localizações: duas isoformas citosólicas, duas localizadas nos peroxissomos/glioxissomos, uma no estroma e outra em tilacóides de cloroplastos (JEPERSEN *et al.*, 1997). Em eucalipto, seis genes foram descritos (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Em espinafre (ISHIKAWA *et al.*, 1996), abóbora (MANO *et al.*, 1997), tabaco e *Mesembryanthemum crystallinum* (SHIGEOKA *et al.*, 2002), as isoformas cloroplastídicas, do estroma e das tilacóides são codificadas a partir de um único gene, cujo transcrito primário sofre processamento (“*splicing*”) alternativo.

Tabela 3. Estrutura dos genes e principais características das isoformas de ascorbato peroxidase em arroz (reproduzido de TEIXEIRA *et al.*, 2004).

	Cromossomo	Número de		cDNA/ORF (pb)	Proteína (aa)	PM (kDa)	Número de acesso NCBI		Localização Subcelular Predita
		exons	introns				cDNA	proteína	
OsAPx1	3	9	8	983/753	250	27.2	D45423	BAA08264	Citosol
OsAPx2	7	9	8	1160/756	251	27.1	AB053297	BAA20889	Citosol
OsAPx3	4	9	8	1060/876	291	32.0	AY382617	AAQ88105	Peroxisomo
OsAPx4	8	9	8	1244/876	291	31.7	AK070842	-	Peroxisomo
OsAPx5	12	11	10	1129/963	320	34.8	AK073910	-	Cloroplasto
OsAPx6	12	11	10	1288/930	309	33.5	AK061107	-	Cloroplasto
OsAPx7	4	12	11	1392/1080	359	38.3	AB114855 AK103344	BAC79362	Cloroplasto
OsAPx8	2	12	11	1698/1497	478	51.2	AK070842	BAC79363	Cloroplasto

A localização subcelular das diferentes isoformas de APx é determinada pela presença de peptídeos de direcionamento organela-específica e de domínios transmembrana encontrados nas regiões N-terminal e C-terminal das proteínas (**Figura 3**). Além disto, análises filogenéticas das isoenzimas de APx revelaram que as isoformas de um mesmo compartimento celular são mais semelhantes entre si do que quando comparadas às isoformas de diferentes compartimentos celulares de um mesmo organismo (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

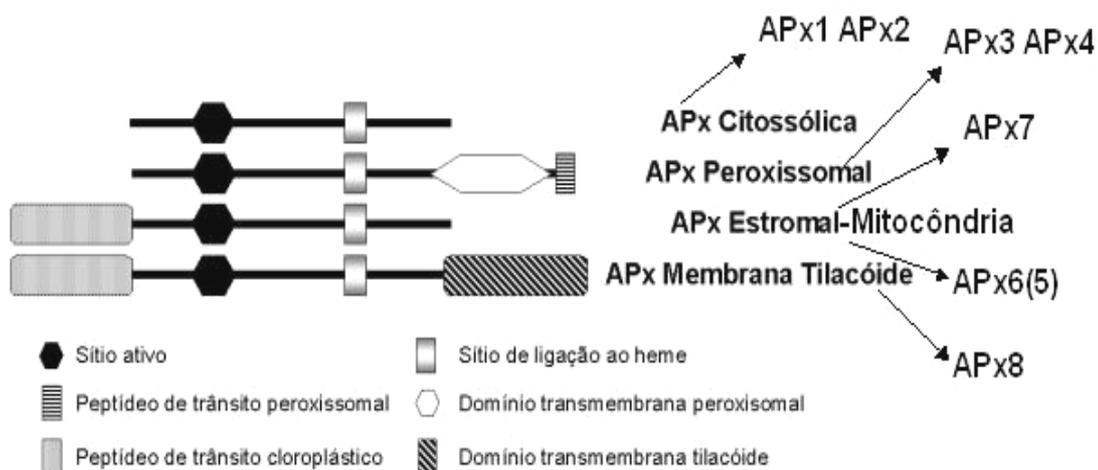


Figura 3. Estrutura proteica das isoformas de APx em plantas superiores. Na figura está ilustrada uma comparação da estrutura primária das proteínas de diferentes compartimentos subcelulares. As localizações preditas das APx de arroz estão indicadas (adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2004).

1.4 Estresse ambiental e estresse oxidativo

As plantas freqüentemente enfrentam condições rigorosas de estresses ao longo de suas vidas tais como baixas e altas temperaturas, calor, salinidade, seca, inundação, estresse oxidativo, intoxicação por metais pesados e ataques de patógenos, entre outros. Esses estresses, muitas vezes, conduzem a uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares causando danos irreparáveis aos vegetais, reagindo com seu potencial genético e limitando seu crescimento, reprodução e a produtividade. Atividades antropogênicas podem ter acentuado os fatores de estresses até então existentes (MAHAJAN & TUTEJA, 2005).

Segundo WANG *et al.* (2003), seca, salinidade, temperaturas extremas e estresse oxidativo estão freqüentemente interconectados e podem induzir danos celulares similares. Por exemplo, seca e salinidade manifestam-se primeiramente como estresse osmótico, resultando no rompimento da homeostase e distribuição de íons na célula. O estresse oxidativo que geralmente acompanha os danos

derivados de altas temperaturas, salinidade e seca, entre outros, pode causar desnaturação funcional e estrutural das proteínas. Conseqüentemente, esses diversos estresses ambientais muitas vezes ativam rotas de sinalização e respostas similares nas células tais como a produção de proteínas anti-estresse, a regulação de antioxidantes e a acumulação de solutos compatíveis.

Os estresses abióticos são a principal causa para a redução da produtividade da colheita de grãos, chegando a até 50% de redução da mesma. Centenas de milhões de dólares são perdidos a cada ano devido à redução da produtividade, o que ameaça a sustentabilidade da agricultura. Um estresse biológico é uma força adversa ou uma condição que impede o funcionamento e a constituição normais de um sistema biológico. O estresse é primeiro percebido por receptores presentes na membrana das células de plantas; o sinal é, então, transmitido para o interior da célula, resultando na geração de mensageiros secundários incluindo cálcio, ERO e inositol fosfato (MAHAJAN & TUTEJA, 2005). Estudos prévios demonstraram que o estresse ambiental que inclui mudanças na temperatura, deficiência de água e um excesso de íons metálicos, causa danos moleculares às plantas, direta ou indiretamente, via produção de ERO (MITTLER, 2002).

Conforme mencionado, são inúmeros os estresses que as plantas enfrentam durante o seu ciclo de vida, e esses prejudicam o crescimento, o desenvolvimento e a produção das mesmas. Neste trabalho, vamos dar ênfase aos efeitos causados pela intoxicação por alumínio, frio, seca e pelo tratamento com peróxido de hidrogênio.

1.4.1 Alumínio

O alumínio (Al) é um dos elementos mais abundantes no solo e se torna mobilizado na forma fitotóxica (Al^{3+}) sob condições ácidas (pH abaixo de 5,0). Sua toxicidade depende da quantidade em que se encontra na solução do solo e a relação com outros elementos, principalmente cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K) e magnésio (Mg). Em solos ácidos, a toxicidade por Al parece ser o principal fator limitando a colheita e a produtividade. Estudos realizados com diferentes

espécies mostraram que o Al é extremamente tóxico e causa a inibição do crescimento e morte celular. O Al, além de inibir a divisão celular, também inibe o fluxo de íons e afeta a estabilidade e a função da membrana plasmática (ROUT *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2007).

Segundo ROUT *et al.* (2001), são vários os efeitos prejudiciais do Al, entre esses destacam-se a interferência na divisão celular nas pontas das raízes e raízes laterais, o aumento da rigidez da parede celular pela deposição de pectinas, a redução da replicação do DNA, a fixação de fósforo na superfície radicular, a diminuição da respiração radicular, a interferência na atividade enzimática responsável pela fosforilação de açúcares e deposição de polissacarídeos na parede celular, e a interferência no transporte de alguns nutrientes essenciais e água para a planta. Entre as culturas de importância econômica, o arroz é uma das mais tolerantes ao Al. A tolerância de várias espécies vegetais ao Al tem sido atribuída à capacidade das plantas de manterem em suas raízes e parte aérea níveis adequados de certos macro e micronutrientes essenciais para as mesmas (MENDONÇA *et al.*, 2003).

1.4.2 Frio

Muitas espécies de plantas são sensíveis ao frio, especialmente nos estágios precoces do desenvolvimento. Cada espécie de planta tem seu próprio requerimento de temperatura ótima para seu crescimento e desenvolvimento. Condições ótimas de temperatura para uma determinada espécie pode ser estressante para outra. Durante e após a exposição a baixas temperaturas, a taxa de fixação de dióxido de carbono (CO₂) diminui e o suplemento disponível de NADP⁺ para a cadeia de transporte de elétrons é restrito, conduzindo à redução excessiva do oxigênio e, desse modo, aumentando a geração de espécies reativas (AROCA *et al.*, 2003).

As plantas apresentam vários sintomas fenotípicos em resposta ao frio e estes incluem a redução da expansão foliar, o murchamento, a clorose (amarelamento das folhas) e pode, também, levar à necrose (morte do tecido). Em nível celular, o frio resulta na perda da integridade das membranas que leva à

dispersão de solutos. A integridade intracelular das organelas é rompida levando à perda da compartimentalização, à redução da fotossíntese e de processos metabólicos gerais. Em arroz, plantas expostas a temperaturas baixas na época da antese (abertura floral) têm o desenvolvimento reprodutivo afetado resultando na esterilidade das flores (MAHAJAN & TUTEJA, 2005). As plantas das regiões tropicais e subtropicais podem ser severamente prejudicadas pelas temperaturas abaixo de 12°C. O modo como as plantas aclimatizam-se a estresses como o frio ainda não é bem compreendido em nível bioquímico, mas plantas de arroz expostas a baixas temperaturas mostraram várias mudanças em seus transcriptoma e proteoma (RABBANI *et al.*, 2003).

1.4.3 Seca

A seca ou déficit hídrico pode ser definida como uma condição de ausência de umidade adequada necessária para uma planta crescer normalmente e completar seu ciclo de vida. A falta de umidade necessária geralmente ocorre em áreas com baixas incidências de chuvas e pobre irrigação. Como resultado ocorrem danos à membrana, proteínas citosólicas e organelares podem reduzir suas atividades ou, ainda, sofrerem completa desnaturação quando desidratadas. A alta concentração celular de eletrólitos, devido à desidratação do protoplasto, pode também causar o rompimento do metabolismo celular. Como conseqüências do estresse por seca, algumas mudanças ocorrem na célula incluindo a mudança no nível de expressão dos genes como, por exemplo, daqueles codificadores das chaperonas (proteínas que auxiliam no reparo de outras proteínas) e enzimas envolvidas na produção e eliminação de ERO. Em termos fisiológicos, a seca nas plantas afeta o desenvolvimento, restringe o aproveitamento dos nutrientes e a aquisição de água (JALEEL *et al.*, 2007).

A redução do crescimento vegetativo, em particular, o crescimento dos brotos e a diminuição da divisão celular são também decorrentes do estresse. A redução da expansão foliar é um efeito benéfico para plantas sob estresse hídrico, pois, com uma menor área foliar exposta, menor é a transpiração. Evidências indicam que a primeira resposta de todas as plantas ao déficit de água é o fechamento dos estômatos para prevenir a perda de água por transpiração.

Contudo, este leva à diminuição da taxa fotossintética. Muitas plantas respondem ao estresse hídrico acelerando a senescência e a abscisão de folhas velhas, processos também conhecidos como ajustamento da área foliar. Em relação às raízes, o crescimento relativo pode sofrer aumento, o qual facilita a capacidade do sistema radicular de extrair mais água das camadas mais profundas do solo. A tolerância à seca é fundamental para as plantas que passam por períodos prolongados de deficiência de água no solo. Plantas tolerantes podem manter o conteúdo de água de seus tecidos, permitindo às mesmas sobreviverem à redução do conteúdo de água nos mesmos e se recuperam mais efetivamente após a reabsorção de água (MAHAJAN & TUTEJA, 2005).

1.5 Arroz: modelo de estudos, importância agrícola e econômica

O arroz (*Oryza sativa*) é considerado a planta modelo de estudos entre as monocotiledôneas, assim como *Arabidopsis* é considerada a planta modelo para as dicotiledôneas. É um organismo diplóide com 24 cromossomos e com genoma de 460 megabases (Mb), o menor entre os cereais. Devido à sintonia do genoma de arroz com o de outros cereais como milho e trigo, o progresso nos protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium*, a disponibilidade de etiquetas de genes expressos ou ESTs (do inglês, “*Expressed Sequence Tags*”) e de mapas moleculares saturados, fazem do arroz um organismo modelo para estudos fisiológicos, genéticos e de evolução dentre as plantas, principalmente em relação às monocotiledôneas (GALE & DEVOS, 1998; SHIMAMOTO & KYOZUKA, 2002;).

Entre os cereais, o arroz é um dos mais importantes do mundo, cultivado e consumido em todos os continentes, destacando-se pela produção e área de cultivo, contribuindo tanto no aspecto econômico quanto social. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, chegando a uma produção de cerca de 590 milhões de toneladas. Na maioria dos países em desenvolvimento, o arroz é a cultura alimentar de maior importância. O cereal é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, possuindo um excelente balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária à dieta humana (EMBRAPA, 2007).

Por ser uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, o arroz é considerado a espécie que apresenta um grande potencial para o combate à fome no mundo. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas para um consumo de 11,7 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2007). Tendo em vista a importância social e econômica do arroz e os efeitos extremamente danosos dos estresses abióticos sobre a agricultura, um maior conjunto de dados a respeito das interações entre ERO e as respostas vegetais faz-se necessários.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar funcionalmente os genes codificadores de ascorbato peroxidase em arroz com o intuito de identificar a função dos diferentes membros dessa família no controle dos níveis de ERO na planta. Assim, os objetivos específicos propostos para o desenvolvimento deste trabalho foram:

- Produzir e analisar plantas transgênicas de arroz silenciadas nos genes *OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*.
- Estudar o padrão de expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de APx em arroz sob condições de estresses abióticos tais como o tratamento com concentrações tóxicas de alumínio, frio, seca e exposição ao peróxido de hidrogênio exógeno.

3. MATERIAIS

3.1 Material vegetal

Plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare) foram usadas neste estudo. As plantas foram crescidas em casa de vegetação à temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 h em potes permanentemente irrigados por submersão das suas bases em água. Calos embriogênicos de arroz foram induzidos a partir de sementes e cultivados em meio NB a 28°C no escuro.

3.2 Meios de cultura para plantas de arroz

3.2.1 Meio hidropônico para o cultivo de arroz

O meio para cultivo de plantas em hidroponia consistiu de uma formulação de sais descrita por FURLANI & FURLANI (1998): (NH₄)SO₄ a 56,6 g/L; Ca(NO₃)₂.4H₂O a 202,3 g/L; CaCl₂ a 90,9 g/L; K₂SO₄ a 55,8 g/L; MgSO₄.7H₂O a 136,9 g/L; KH₂PO₄ a 35,1 g/L; FeSO₄.7H₂O a 24,1 g/L; Na.EDTA a 25,1 g/L; MnCl₂.4H₂O a 2,34 g/L; H₃BO₃ a 2,04 g/L; ZnSO₄.7H₂O a 0,88 g/L; CuSO₄.5H₂O a 0,20 g/L; Na₂Mo₇O₄.2H₂O a 0,26 g/L. O pH do meio foi ajustado para 5,8.

3.2.2 Meio de indução de calos (N6D)

O meio de indução de calos, denominado N6D foi constituído de (NH₄)₂SO₄ a 460 mg/L; KNO₃ a 2.830 mg/L; KH₂PO₄ a 400 mg/L; MgSO₄.7H₂O a 190 mg/L; H₃BO₃ a 1,6 mg/L; ZnSO₄.7H₂O a 2 mg/L; KI a 0,75 mg/L; CaCl₂.2H₂O a 170 mg/L; FeSO₄.7H₂O a 27,8 mg/L; Na₂EDTA a 37,3 mg/L; mioinositol a 100 mg/L; caseína hidrolisada a 300 mg/L; prolina a 2,9 g/L; 2,4-D a 1 mg/mL; sacarose a 30 g/L; Fitagel (Sigma) a 3 g/L. O pH do meio foi ajustado para 6,4 e a solução foi autoclavada por 15 minutos a 1,5 atm.

3.2.3 Meio NB para proliferação de calos

O meio NB concentrado foi constituído de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 460 mg/L; KNO_3 a 2.830 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 190 mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 170 mg/L; KH_2PO_4 a 400 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 27,8 mg/L; Na_2EDTA a 37,3 mg/L; H_3BO_3 a 1.6 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 10 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 2 mg/L; KI a 0,75 mg/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,25 mg/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,025 mg/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,039 mg/L; tiamina a 0,1 mg/L; piridoxina a 0,05 mg/L; ácido nicotínico a 0,05 mg/L; mioinositol a 100 mg/L; caseína hidrolisada a 300 mg/L; glutamina a 500 mg/L; prolina a 500 mg/L; sacarose a 30 g/L. Fitigel (Sigma) a 3 g/L. O pH da solução foi ajustado para 6,4 e a solução foi autoclavada por 15 minutos a 1,5 atm.

3.2.4 Meio NBA (NB+acetoceringona)

O preparo do meio NBA foi realizado conforme descrito no item 3.2.3 e, após autoclavagem, foi adicionado ao meio acetoseringona para uma concentração final de 100 μM (ou 19,62 mg/mL).

3.2.5 Meio de seleção NB-HTC

O meio de seleção NB-HTC (NB + higromicina a 50 $\mu\text{g/mL}$, timetina 150 $\mu\text{g/mL}$ e Claforan a 200 $\mu\text{g/mL}$) foi preparado seguindo os mesmos passos do item 3.2.3 e os antibióticos esterilizados por ultrafiltração em membrana Millipore de 14 ou 22 μm foram adicionados ao meio após a autoclavagem.

3.2.6 Meio de pré-regeneração

Para o preparo de um litro de meio pré-regeneração foram adicionados 100 mL de NB concentrado, 3 g de Fitigel, N-benziladenina (BAP) a 2 mg/mL e ácido naftalenoacético (ANA) a 1 mg/mL, e completado o volume para um litro com água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,4 e a solução foi autoclavada por 15 minutos a 1,5 atm. Posteriormente, foi adicionado ao meio ácido abscísico (ABA) esterilizado por ultrafiltração em membrana Millipore de 14 ou 22 μm para a concentração final de 5 mg/mL.

3.2.7 Meio de regeneração

O preparo do meio de regeneração foi realizado conforme descrito no item 3.2.7, no entanto com 3 mg/mL de BAP e ANA a 0,5 mg/mL e sem a adição de ABA após a autoclavagem.

3.2.8 Meio de cultivo *in vitro* de plântulas de arroz

O meio de cultivo de plântulas regeneradas foi constituído da mistura de sais de MURASHIGE & SKOOG (MS, 1962), acrescido de Fitigel a 3% e o antibiótico de seleção (higromicina a 50 µg/mL). O pH do meio foi acertado para 6,4. As condições de autoclavagem foram de 15 minutos a 1,5 atm.

3.2.9 Meio de cultura para bactérias

Para o preparo do meio LB sólido para bactérias foi adicionado 32 g do composto LENNOXL AGAR (Invitrogen) em água destilada até completar o volume de 1 L. Para o preparo do meio LB líquido foi adicionado 25 g do preparado comercial LURIA BROTH BASE (Invitrogen) em água para o volume final de 1 L. Os meios foram autoclavados por 15 minutos a 1,5 atm.

4. MÉTODOS

4.1 Construção dos vetores de transformação de planta

Os cDNAs codificando os genes *OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8* (códigos de acesso GenBank AK073910, AK061107, AB114855/AK103344; AK070842, respectivamente) foram clonados usando tecnologia de clonagem GatewayTM (Invitrogen) por TEIXEIRA (2005). Para adicionar a seqüência completa dos sítios de recombinação *attB* nas extremidades dos cDNAs de interesse, duas reações em cadeia da DNA-polimerase (PCR) foram realizadas. Na primeira reação, os pares de *primers* específicos para a amplificação dos fragmentos correspondentes a *OsAPx5/6*, *OsAPx7/8*, *OsAPx7* e *OsAPx8* foram usados. Na segunda reação de amplificação, o par de *primers* contendo o sítio de recombinação foi usado à temperatura 47°C de anelamento: *primer forward* - AttB1 5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' e *primer reverse* - AttB2 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'.

A primeira reação de recombinação (recombinação BP) envolveu a clonagem dos produtos de PCR flanqueados por *attB* junto ao vetor pDONRTM201 (Invitrogen). Para obter os plasmídeos pENTR-*OsAPx*, uma segunda reação de recombinação (recombinação LR) foi realizada com 150 ng dos plasmídeos pENTR-*OsAPx5/6*, pENTR-*OsAPx7/8*, pENTR-*OsAPx7* e pENTR-*OsAPx8*, os quais foram recombinados com 150 ng do vetor pANDA (MIKI & SHIMAMOTO, 2004) (**Figura 16**) para gerar os vetores pANDAOsAPx5/6, pANDAOsAPx7/8, pANDAOsAPx7 e pANDAOsAPx8. Seqüências de mRNA com uma estrutura “*hairpin*” (hpRNA) foram construídas baseadas na seqüência do gene *OsAPx5* para a construção RNAiOsAPx5/6 e do gene *OsAPx7* para a construção RNAiOsAPx7/8. Essas construções foram desenvolvidas por TEIXEIRA (2005) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As Construções RNAi para os genes *OsAPx7* e *OsAPx8* individualmente foram desenvolvidas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) durante o desenvolvimento da presente dissertação. As construções RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 basearam-se nas seqüências dos seus respectivos genes. Em cada construção, o RNA “*hairpin*” foi transcrito sob o controle do promotor forte da ubiquitina de milho (*Zea mays*). Um

íntron está presente na região 5' da repetição invertida visando aumentar a expressão do "hairpin" (MIKI & SHIMAMOTO, 2004). Células competentes de *E. coli* XL1-Blue foram transformadas por eletroporação e semeadas em placas de LB agar contendo canamicina (50µg/ml) para a transformação via eletroporação (ver item 4.2).

As bactérias contendo os clones obtidos foram multiplicadas visando a amplificação e a purificação dos plamídeos. Os DNAs plasmidiais foram usados para confirmar a clonagem por PCRs usando-se os *primers* HPT1: 5'-GAGCCTGACCTATTGCATCTCC-3' e HPT2: 5'-GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG-3' e os *primers* OsAPx5/6 F e R (OsAPx5/6-F 5'-CACCGGAGTTGAGTTAGTAGA-3' e OsAPx5/6-R 5'-AGGTGGGCATTCTTCACCAT-3' (204 bp); e OsAPx7/8 F e R (OsAPx7/8 F 5'-TCAAGACCCATCCTGTAA-3' e OsAPx7/8-R 5'-CACCTCTAAAGCTTGTCCAAC-3' (238 bp); OsAPx7 F e R (OsAPx7-F 5'-AAAAAGCAGGCTCCGAGCAATCTGGGTGCAAAT-3' e OsAPx7-R 5'-AGAAAGCTGGGTCTGACTCGTGGTCAGGAAAAGC-3' (220 bp); OsAPx8 F e R (OsAPx8-F 5'-AAAAAGCAGGCTCCGCTGCGAAATACTCCTACGG-3' e OsAPx8-R 5'-AGAAAGCTGGGTCTGACTCGTGGTCAG-3' (227 bp) para os genes de ascorbato peroxidase.

A transformação de *A. tumefaciens* foi feita por choque térmico (ver item 4.3). Os clones obtidos foram lançados em cultura, igualmente como descrito acima. A confirmação das clonagens foi realizada por PCR usando os *primers* HPT e APx. As bactérias contendo os vetores de transformação foram utilizadas na transformação dos calos de arroz.

4.2 Transformação de *Escherichia coli*

As células competentes de *E. coli* XLI-Blue para transformação por eletroporação foram produzidas conforme o protocolo descrito em SAMBROOK *et al.* (1989) Para a transformação de *E. coli*, 1 a 10 ng de DNA foram adicionados a 40 µl de células competentes. A mistura foi incubada por 30 s no gelo e, em seguida, eletroporada em cubeta de 0,2 cm sob pulso elétrico de 2,5 volts, 25 µF e 200 Ω, no eletroporador (Bio Rad, Gene Pulser® II). A seguir, 1 mL de LB líquido foi adicionado às células e a suspensão foi incubada por 2 h a 37°C sob agitação

constante de 225 rpm. Por último, as bactérias foram inoculadas sobre meio LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina para as células transformadas com plasmídeos derivados do pDONRTM201, e mantidas a 37°C por 16 h.

4.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Visando obter células de *A. tumefaciens* AGL1 competentes para a transformação por choque térmico, uma pré-cultura em 5 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de rifampicina foi inoculada com uma colônia isolada da bactéria. Depois de 1 a 2 dias de multiplicação a 28°C sob agitação constante de 225 rpm, 500 µL da pré-cultura foram inoculados em 100 mL de LB líquido com 100 µg/mL de rifampicina. O inóculo foi mantido a 28°C sob agitação constante até atingir a D.O. de 0,5 à 600 nm, quando foi centrifugado à 5.000 xg, por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 2 mL de LB líquido. Alíquotas de 200 µL foram estocadas à -80°C e descongeladas somente para transformação.

Para a transformação, 1 µg do DNA foi adicionado à 200 µL de células de *A. tumefaciens* e congeladas por 5 minutos em nitrogênio líquido. A seguir, a mistura foi incubada à 37°C. Depois de 25 minutos, as células foram transferidas para um novo tubo contendo 1 mL de LB líquido e incubadas à 28°C por 1 hora sem agitação e por mais 2 horas sob agitação constante. Por último, as células foram centrifugadas por 3 minutos a 14.000 xg, e o precipitado foi ressuscitado em 500 µL de LB líquido e plaqueado em LB sólido contendo 100 µg/mL de rifampicina e 50 µg/mL de canamicina e mantidas à 28°C por 3 dias.

4.4 Extração de plasmídeos

A extração de plasmídeos de *E. coli* e *A. tumefaciens* foi realizada pelo processo de lise alcalina conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

4.5 Transformação de calos de arroz por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de calos de arroz por *A. tumefaciens* foi realizado baseado no protocolo de UPADHYAYA *et al.* (2000).

4.6 Extração de DNA genômico de arroz

O material foliar de arroz foi pulverizado em nitrogênio líquido utilizando graal e pistilo e distribuído em tubos de microcentrífuga até alcançar a marca de 0,5 mL. A cada tubo foi adicionado 0,6 mL de tampão de extração (Tris/HCL 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, SDS 1%; Protocolo PureGene, CSIRO Plant Industry) e a mistura foi agitada em um vórtex por 30 s. Após uma incubação à 65°C por 1 hora, foram adicionados 3 µL de solução de RNase a 5 mg/mL e a mistura foi incubada durante 30 minutos à 37°C.

Após centrifugação à 16.000 xg por 3 minutos, à fase aquosa foi adicionado 200 µL de acetato de amônia a 6 M e a mistura foi agitada em vórtex por 30 s e centrifugada por 5 minutos à 13.000 xg. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) sendo a mistura agitada em um vórtex por 30 s e centrifugada por 10 minutos como descrito anteriormente.

A fase aquosa foi recuperada em outro tubo e misturada a 600 µL de isopropanol, por inversão (50 vezes). Após a centrifugação (13.000 xg) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 3 vezes em etanol a 70%. O precipitado foi seco em estufa a 37°C por 15 minutos, e solubilizado em água ultrapura e estéril e estocado a -20°C.

4.7 Extração de RNA total

As amostras de tecido vegetal (parte aérea ou raiz) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C até o momento da extração. A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

4.8 Síntese de cDNA a partir de RNA total

A síntese de cDNA a partir de RNA total foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante, com as seguintes adaptações: em um volume final de 20 μL , foi utilizado uma quantidade inicial de 2 μL de RNA total de arroz, 1 μL do oligonucleotídeo poli-T (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL de desoxirribonucleotídeos (dNTP) a 10 mM, 8 μL de água ultrapura. Visando desnaturar o RNA, a solução foi incubada à 65°C por 5 minutos e imediatamente incubada em gelo por mais 5 minutos. A seguir, 4 μL de tampão 2,5X (*First Strand Buffer 2,5X*), 2 μL de DTT 0,1 M, 1 μL de H₂O, 1 μL de M-MLV *Reverse Transcriptase* (200 U/ μL) foram adicionados à solução. A reação foi mantida a 37°C por 2 horas e em seguida incubada a 70°C por 15 minutos. Todos os cDNAs foram checados por PCR usando *primers* constitutivos FDH e/ou PiP.

4.9 PCR

As reações de amplificação dos DNAs genômico e plasmidial foram realizados usando *primers* específicos para cada APx e, ainda, os *primers* HPT e/ou GUS. Para a reação de amplificação, foram adicionados 2 μL de DNA, 0,5 μL de dNTP a 10 mM, 2 μL de tampão de PCR 10X concentrado (Tris/HCL a 100 mM, (pH 8,0), KCl a 500 mM), 1 μL de MgCl₂ a 10 mM, 1 μL de cada *primer* a 10 mM (*forward* e *reverse*), 0,2 μL de Taq DNA-polimerase (5 U/ μL) e 12,3 μL de água ultrapura estéril. As condições utilizadas na amplificação dos DNAs foram: 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento 55°C, (1 min) e extensão (72°C por 1 min). O último ciclo foi seguido de uma extensão final de 5 min a 72°C. A amplificação e o tamanho dos fragmentos de DNA foram confirmados por eletroforese em gel de agarose.

4.10 qRT-PCR

As análises por PCR semi-quantitativo (qRT-PCR) foram realizadas em um aparelho “*Applied Biosystems 7500 Real-Time System*”. As qRT-PCRs foram

compostas de um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 60°C e 15 s a 72°C. As amostras foram mantidas por 2 min a 40°C para reanelamento e, então, aquecidas de 55 para 99°C para adquirir dados procedentes da curva de desnaturação do produto de amplificação. Os qRT-PCRs foram feitos usando 10 µL da amostra de cDNA diluído 100X em 2,0 µL tampão PCR 10X, 1,2 µL MgCl₂ 50 mM, 0,1 µL dNTPs 5 mM, 0,2 µL de cada *primer* 10 µM, 4,25 µL H₂O, 2,0 µL SYBER GREEN (1:100,000), e 0,05 µL *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U/µL; Invitrogen). O volume final da reação por tubo foi de 20 µL. Os *primers* utilizados nas reações estão listados na **Tabela 4**. Como normalizadores internos da reação, foram utilizados três seqüências gênicas: fator de alongação (eF; código de acesso no GenBank AJ252135); Ubiquitina (Ubi; código de acesso no GenBank AK103230) formaldeído-desidrogenase (FDH; código de acesso no GenBank U77637.1) e posteriormente foi feito a média dos genes controles. Todas as reações foram realizadas com quatro repetições experimentais e o cálculo foi feito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4.11 Cultivo de plantas para análise da expressão gênica das ascorbato peroxidases

Sementes maduras de arroz Nipponbare foram descascadas e esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio comercial (MAZZAROLLO, 8%) a 50% por 5 minutos sob agitação constante e em três repetições e posteriormente lavadas 5 vezes com água ultrapura e estéril. As sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água ultrapura e estéril em B.O.D. a 28°C ± 2°C durante 4 dias no escuro. Para todos os tratamentos, o material vegetal foi coletado de um “*pool*” de três plantas, com três repetições biológicas. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes, exceto para o tratamento com alumínio e peróxido de hidrogênio. As amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -80°C até extração do RNA com o reagente TRIZOL (Invitrogen).

4.11.1 Tratamento com alumínio

Plântulas de 4 dias foram colocadas em potes de plástico contendo solução hidropônica conforme descrito por FURLANI & FURLANI (1998) e crescidas em câmara de crescimento a 28°C e 12 h de luz por 5 dias. Após este período, as plantas foram submetidas ao tratamento com 20 ppm de cloreto de alumínio (AlCl₃) e, então, amostras do tecido radicular foram coletadas de plantas em tempos de 4 e 8 h de estresse. Como controles, foram utilizadas plantas não tratadas com alumínio, mas mantidas nas mesmas condições.

4.11.2 Tratamento com peróxido de hidrogênio

Plântulas foram cultivadas em vidros contendo meio MS à metade da concentração original (MURASHIGE & SKOOG, 1968) sob condições assépticas e mantidas em câmara de crescimento a 28°C e 12 h de escuro/luz por 5 dias. Para o tratamento, primeiramente foi substituído o meio MS sólido por MS líquido e, então, adicionado o peróxido de hidrogênio a 10 mM. O material vegetal utilizado foi a parte aérea e este foi coletado de plantas em diferentes tempos de tratamento: 2, 4 e 8 h de estresse.

4.11.3 Frio

As plântulas foram colocadas em vasos de plástico contendo solo comercial "Solomax" (Eucatex Química e Mineral Ltda.) e crescidas em câmara de crescimento à 28°C e 12 h de escuro/luz durante quatro semanas. Após esse período, as plantas foram submetidas ao tratamento com frio a 10°C. As amostras, parte aérea, foram coletadas as 6 e 24 h de exposição ao frio. Plantas controle foram mantidas em condições normais à 28°C e o material foi coletado seguindo os mesmos procedimentos.

4.11.4 Seca

As plântulas foram colocadas em vasos de plástico contendo solo comercial "Solomax" (Eucatex Química e Mineral Ltda.) e crescidas em câmara de crescimento à 28°C e 12 h de escuro/luz durante quatro semanas submersos em bandejas com água. Para o tratamento com estresse hídrico foi retirado a água da

bandeja e escoado a água restante dos vasos. As amostras das folhas foram coletadas aos 6 e 15 dias de estresse. Uma bandeja de plantas controle foi mantida em condições normais, ou seja, com água e coletado as amostras dessas seguindo os mesmos procedimentos.

4.11.5 Tratamento com luz UV

Para o tratamento com luz UV, plantas transgênicas e plantas não transformadas foram expostas à irradiação UV de 254 nm, proveniente de lâmpadas germicidas por 15 minutos. Em seguida, as plantas foram mantidas em condições normais por 30 minutos. Após esse período as plantas foram submetidas novamente por mais 15 minutos à exposição à luz UV. Posteriormente, folhas das plantas irradiadas foram coletadas e incubadas em 0.1% de solução de tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma).

4.13 Localização *in situ* de peróxido de hidrogênio

A detecção do peróxido de hidrogênio em tecidos foliares de arroz foi realizada pela coloração com DAB. Para tanto, as folhas de arroz foram cortadas na sua região basal e incubadas com 0.1% de DAB em 10 mM de tampão MES (Sigma), pH 5,8, por 12 h. A clorofila foi então removida por lavagem em etanol a 96% fervente durante 10 minutos.

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student com $P < 0,05$ de significância usando o programa Excel (Microsoft Corporation).

Tabela 4. *Primers* utilizados nas análises de expressão dos genes APx por qRT-PCR.

Primer	F/R	Seqüência dos <i>primers</i>
OsAPx1	F	5'-CTCGAGCTACAAGGAGGCCACCTCA-3'
	R	5'-GGTACCTCAGCCGCATTTCATACCAACACA-3'
OsAPx2	F	5'-CTCGAGCCAAGTGACAAAGCCCTCAT-3'
	R	5'-GGTACCTCGAGAAGGCGCAAATACAAATCG-3'
OsAPx3	F	5'-GGTACCTCGAGCGAAAGATCAGGATTTGATGGT-3'
	R	5'-CTCGAGCCCAGCTCAGATAGCTTCTTGT-3'
OsAPx4	F	5'-CTCGAGTGACAAGGCATTGTTGGAAG-3'
	R	5'-GGTACCTCGAGCAGCTGCAGCAACAGCTACC-3'
OsAPx5	F	5'-CTCGAGAGGGCAATGTTGGACATCTG-3'
	R	5'-GGTACCTCGAGGATCAAACCTTTGCCCAAGA-3'
OsAPx6	F	5'-CTCGAGAGGGCAATCTTGGACATCAC-3'
	R	5'-GGTACCTCGAGGATCAAACCTTTGCTCCGAGA-3'
OsAPx7	F	5'-GAGCAATCTGGGTGCAAAT-3'
	R	5'-GGTACCTCGAGGACTCGTGGTCAGGAAAAGC-3'
OsAPx8	F	5'-CTCGAGGCTGCGAAATACTCCTACGG-3'
	R	5'-GGTACCTCGAGAGGAGGTCATCAGACCATCG-3'
OseF	F	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'
	R	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'
OsFDH	F	5'-CAAATCAGCTGGTGCTTCTC-3'
	R	5'-TTCCAATGCATTCAAAGCTG-3'
OsUbi	F	5'-ACCACTTGCACCGCCACTACT-3'
	R	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'

5. RESULTADOS

5.1 Construções de hpRNA para os genes de APx

Para investigar *in vivo* a função dos genes de ascorbato peroxidase em arroz, foram produzidas construções “*hairpin*” para os genes *OsAPx5*, *OsAPx6*, *OsAPx7* e *OsAPx8*, dirigidas pelo promotor da ubiquitina de milho (MIKI & SHIMAMOTO, 2004). As construções foram projetadas de forma a produzirem RNAs de dupla fita (dsRNA) de regiões específicas de cada um dos genes *OsAPx*. Foram produzidas construções RNAi para o silenciamento específico dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8*, bem como para o silenciamento simultâneo de ambos os genes. Essas construções basearam-se nas seqüências de cada um dos genes, sendo que RNAiOsAPx7 possui onze nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *OsAPx8*. Já a construção RNAiOsAPx8 possui quatro nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *OsAPx7* (**Tabela 5**). A construção RNAiOsAPx7/8, ou seja, para o silenciamento simultâneo de ambos os genes, foi baseada na seqüência de *OsAPx7* e possui 34 nucleotídeos contínuos iguais à seqüência de *OsAPx8* (**Tabela 6**).

Com relação aos genes *OsAPx5* e *OsAPx6*, somente foi possível produzir uma construção RNAi para o silenciamento simultâneo dos dois genes, devido à similaridade na seqüência de nucleotídeos (**Tabela 5**). Ou seja, não foi possível projetar-se construções para o silenciamento específico de cada um desses genes. A construção RNAiOsAPx5/6 foi baseada na seqüência do gene *OsAPx5* e possui 61 nucleotídeos contínuos idênticos à seqüência de *OsAPx6* (**Tabela 6**). Células competentes de *E. coli* XL1-Blue foram transformadas com os plasmídeos OsRNAi e inoculadas em placas contendo meio LB sólido com canamicina (50 µg/mL) como agente de seleção. Para confirmar a clonagem dos insertos no vetor de transformação de plantas, foram realizadas PCRs a partir do DNA plasmidial utilizando-se *primers* específicos para cada gene *OsAPx* e/ou *hpt*. Foi possível observar, como demonstrado nas **Figuras 4A, 4B e 5**, os fragmentos amplificados de tamanhos esperados com os *primers* específicos para cada construção ou para o gene *hpt*, confirmando-se, assim, a transformação de *E. coli* XL1-Blue com as construções RNAi corretas. Após a confirmação da transformação de *E. coli*,

foram realizadas as transformações de *A. tumefaciens* AGL1 com as construções obtidas. Nestas, foi possível observar, conforme ilustrado pelas **Figuras 6A, 6B e 7**, a confirmação da transformação das construções RNAi segundo os respectivos fragmentos amplificados com o emprego dos *primers* específicos.

5.2 Obtenção de plantas transgênicas de arroz e análise do nível de transcritos dos genes *OsAPx* nas mesmas

Para a obtenção de plantas transgênicas, foram transformados calos embriogênicos de arroz (*Oryza sativa* L. ssp *japonica* cv. Nipponbare) por *A. tumefaciens* (UPADHYAYA *et al.*, 2000) portadoras dos plasmídeos contendo individualmente as construções RNAiOsAPx5/6, RNAiOsAPx7/8, RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8. Primeiramente, foram transformados calos com T-DNAs derivados dos plasmídeos RNAiOsAPx5/6 e RNAiOsAPx7/8. No entanto, somente os calos transformados com RNAiOsAPx5/6 produziram, de fato, calos derivados com nítida resistência ao agente seletivo. Foram selecionadas três linhagens de calos resistentes derivadas desta construção RNAi. Esses calos foram multiplicados e transferidos para meio de pré-regeneração e regeneração, onde produziram plântulas que foram selecionadas em meio contendo higromicina. No total, as três linhagens produziram 27 plantas que foram crescidas em casa de vegetação.

Para confirmar a integração do T-DNA no genoma das plantas, foi feita a extração de DNA de tecidos foliares e PCRs utilizando *primers* específicos aos genes *HPT* e *GUS*. Todas as plantas regeneradas foram positivas para a presença do transgene. Como controle negativo, foi utilizada uma planta da cv. Nipponbare não-transformada (dados não mostrados). Em seguida, procederam-se as extrações de RNA total (parte aérea) e as sínteses de cDNA a partir dessas plantas transgênicas. Análises semi-quantitativas por PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas para verificar os níveis de mRNAs dos genes *OsAPx5* e *OsAPx6* produzidos pelas plantas contendo a construção RNAiOsAPx5/6. Os resultados obtidos mostraram que a expressão de ambos os genes *OsAPx* não foi reduzida nas linhagens transgênicas obtidas (dados não mostrados).

As transformações com as construções RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 foram realizadas em um segundo momento. Para RNAiOsAPx7, foram obtidas 27 linhagens de calos resistentes. Os calos resistentes foram multiplicados e

transferidos para meio de pré-regeneração e regeneração. Para a construção RNAiOsAPx8, foram selecionados 22 calos resistentes à higromicina. Apenas uma linhagem de calos transformados com cada construção RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 permitiu a regeneração de plantas. No total, 16 plantas derivadas da linhagem RNAiOsAPx7 e seis plantas derivadas da linhagem RNAiOsAPx8 foram obtidas, o que nos permitiu realizar algumas análises. O baixo rendimento na obtenção de plantas transgênicas foi provavelmente devido a um erro no preparo do meio de cultura, onde os antibióticos necessários para regeneração não foram adicionados ao meio. As plântulas obtidas foram transferidas para meio MS e, em seguida, para solo (**Figura 9A**). A confirmação da integração do transgene nas plantas obtidas foi realizada por PCR (**Figura 8A e 8B**).

Para verificar os níveis de mRNA relativos aos genes *OsAPx7* e *OsAPx8* nas plantas transgênicas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8, análises de qRT-PCRs foram realizadas. Como resultados, duas plantas transgênicas de cada linhagem foram escolhidas ao acaso para as análises (**Figura 9B e 9C**). Como controle, foram utilizadas plantas da cv. Nipponbare não-transformadas e os níveis de transcritos foram normalizados relativamente aos níveis de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*. Com as análises por qRT-PCR foi possível demonstrar que a expressão de ambos os genes *OsAPx* foi fortemente reduzida nas linhagens transgênicas obtidas (**Figura 10A e 10B**). Os níveis de expressão dos diferentes genes *OsAPx* em resposta ao silenciamento das isoformas cloroplastídicas, também foram analisados quanto ao acúmulo de transcritos de *OsAPx1* e *OsAPx8* por qRT-PCR nas plantas transgênicas OsRNAiAPx7 e OsRNAiAPx8. Os resultados demonstram que a expressão da maioria dos genes *OsAPx* não é alterada em resposta ao silenciamento dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8* (**Figura 11**). Apenas a expressão do gene codificador da isoforma peroxissomal *OsAPx3* foi afetada pelo silenciamento do gene *OsAPx8*.

Os fenótipos das plantas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 foram avaliados ao longo do desenvolvimento das mesmas. Interessantemente, essas plantas não produziram sementes. A maioria delas floresceu mas, no entanto, as flores caracterizaram-se como estéreis. Embora não tenham produzido sementes, as plantas RNAiOsAPx8 não apresentaram diferenças visíveis quanto à estatura e

demais características morfológicas em relação à planta controle (**Figura 9C**). Este não foi o resultado observado nas plantas RNAiOsAPx7, as quais apresentaram estatura bastante inferior à planta não-transformada (Figura 9B). Um estudo mais detalhado ao longo do desenvolvimento das plantas, bem como da anatomia das panículas, poderá contribuir para o entendimento do efeito do silenciamento gênico de genes APx sobre a fertilidade/esterilidade dessas plantas.

As mesmas plantas transgênicas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 foram submetidas à luz UV e, em seguida, foram incubadas com DAB para a determinação do acúmulo consequente de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares. O princípio do método fundamenta-se no fato do peróxido de hidrogênio atuar como agente polimerizante de DAB. O polímero formado é insolúvel e forma um precipitado de coloração vermelho-marrom. Como resultado destas análises, não foi possível observar sinais de marcação por peróxido de hidrogênio nos tecidos das plantas silenciadas (dados não mostrados).

5.3 Análises do padrão de expressão dos genes APx de arroz em resposta a diferentes tratamentos

Com o objetivo de estudar o padrão de expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de ascorbato peroxidase em arroz em resposta a condições de estresse, foram realizados experimentos nos quais plantas de arroz foram submetidas às condições de frio, estresse hídrico e concentrações tóxicas de alumínio e peróxido de hidrogênio exógeno.

5.3.1 Tratamento com alumínio

As plantas de arroz de uma semana foram submetidas ao tratamento com alumínio conforme descrito em Métodos (item 4.11.1). As raízes foram coletadas após 4 e 8 horas de tratamento e análises por qRT-PCR foram realizadas para os oito membros da família gênica codificadores de ascorbato peroxidases de arroz. As análises do padrão de expressão dos diferentes genes de APx em resposta ao tratamento com Al mostraram que os mesmos respondem

diferencialmente ao tratamento (**Figura 12**). Os genes *OsAPx5* e *OsAPx6* sofreram redução significativa na expressão após 4 horas de tratamento. O gene codificador da isoforma cloroplastídica *OsAPx8* também sofreu uma leve redução após 4 horas de tratamento, mas foi induzida após 8 horas de exposição ao Al. As expressões de *OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx3*, *OsAPx4* e *OsAPx7* não variaram no tempo de 4 horas de estresse. Por outro lado, os genes codificadores das isoformas *OsAPx1*, *OsAPx3*, *OsAPx5* e *OsAPx7* foram fortemente induzidos após 8 horas de tratamento. A expressão de *OsAPx2* e *OsAPx4* não variou, mesmo com 8 horas de tratamento com Al.

5.3.2 Tratamento com peróxido de hidrogênio

Após tratamento com 10 mM de peróxido de hidrogênio (Metódos, item 4.11.2), as amostras de tecido foliar de plantas de arroz com uma semana de idade foram coletadas para extração de RNA depois de decorridas 2, 4 e 8 horas de tratamento. As análises de qRT-PCR indicaram que as expressões da maioria dos genes *OsAPx* são, de fato, moduladas por peróxido de hidrogênio (**Figura 13**). Os genes *OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx5*, *OsAPx6* e *OsAPx7*, os quais codificam enzimas APx solúveis, foram significativamente induzidos pelo tratamento por peróxido de hidrogênio. Os genes que codificam as isoformas peroxissomais *OsAPx3* e *OsAPx4*, bem como o gene *OsAPx8* que codifica a APx da membrana tilacóide, não tiveram suas expressões alteradas pelo tratamento com peróxido de hidrogênio.

5.3.3 Frio

Com o objetivo de avaliar o efeito do frio sobre as expressões dos genes codificadores de APx, as plantas de arroz foram primeiramente cultivadas em vasos com solo e mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 28°C por quatro semanas. Após este período, as plantas foram submetidas à temperatura de 10°C. O material foliar para extração de RNA total foi coletado após 6 e 24 horas de estresse. Os dados de qRT-PCR permitiram concluir que os genes *OsAPx* são alterados quando submetidos à baixa temperatura (**Figura 14**). As expressões dos genes *OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx3*, *OsAPx4*, *OsAPx6* e *OsAPx7*

foram significativamente induzidas após 6 horas de exposição à baixa temperatura. Por outro lado, *OsAPx5* teve uma redução na sua expressão em resposta ao estresse. Os genes *OsAPx2* e *OsAPx8* também sofreram significativas alterações, sendo reprimidos após 24 horas de exposição a 10°C.

5.3.4 Seca

Os dados referentes às análises por qRT-PCR mostraram alteração no nível de expressão dos genes de *OsAPx* sob estresse de seca conforme ilustrado na **Figura 15**. Os genes codificadores das isoformas cloroplastídica *OsAPx8* e peroxissomal *OsAPx4* foram fortemente reprimidos após 15 dias de estresse de seca. Por outro lado, os genes das isoformas citosólicas *OsAPx1* e *OsAPx2*, das mitocôndriais *OsAPx5* e *OsAPx6* e, ainda, a *OsAPx7* estromal foram significativamente induzidos por esta condição de estresse.

6. DISCUSSÃO

Com o intuito de caracterizar funcionalmente os genes de ascorbato-peroxidase em arroz, neste trabalho foram produzidas e caracterizadas parcialmente plantas transgênicas e silenciadas nos genes *OsAPx7* e *OsAPx8*. Além disso, foram analisados os perfis de expressão dos oito genes que constituem a família gênica codificadora das APx de arroz em plantas selvagens submetidas a diferentes estresses.

A regulação do metabolismo antioxidante em células de plantas é altamente complexa, envolve uma série de enzimas representadas por várias isoformas que atuam em diferentes compartimentos celulares. O funcionamento dos mecanismos antioxidantes nas plantas ainda não está completamente elucidado. No entanto, existem evidências da existência de mecanismos compensatórios entre os diferentes sistemas antioxidantes (BLOKINA *et al.*, 2003; ASAI *et al.*, 2004). As diversas isoenzimas de APx exercem uma importante função na eliminação do peróxido de hidrogênio em vários compartimentos celulares. Sendo assim, a elucidação da função e o modo de regulação dos seus genes sob condições normais e de estresse é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos antioxidantes vegetais. Em trabalhos previamente desenvolvidos pelo nosso grupo (TEIXEIRA *et al.*, 2004; 2006) foi descrita a presença de uma família gênica codificadora de APx em arroz composta de oito genes, cujos produtos estão localizados em diferentes compartimentos celulares.

O padrão de expressão dos genes *OsAPx* foi analisado nas plantas silenciadas RNAi*OsAPx7* e RNAi*OsAPx8*. O nível de transcritos dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8* decorrente do silenciamento nas linhagens transgênicas foi analisado por PCR semi-quantitativa em tempo real (**Figura 10A e 10B**). As análises mostraram uma forte redução da expressão de cerca de 90% para ambos os genes nas plantas silenciadas em relação à planta controle (não-transformada). Os níveis de mRNA nos demais genes *OsAPx* também foram analisados, visando verificar se o silenciamento de *OsAPx7* e *OsAPx8* provocou alteração nas expressões destes (**Figura 11**). Os genes citosólicos (*OsAPx1* e *OsAPx2*) o peroxissomal (*OsAPx4*) e os mitocondriais (*OsAPx5* e *OsAPx6*) foram

induzidos em resposta ao silenciamento do gene cloroplastídico *OsAPx7*. Por outro lado, com o silenciamento do gene cloroplastídico *OsAPx8* o gene codificador da isoforma peroxissomal *OsAPx3* sofreu uma significativa redução na sua expressão em resposta ao silenciamento desse gene, no entanto com silenciamento do gene cloroplastídico *OsAPx8* o gene codificador da isoforma *OsAPx7* (estromal) foi fortemente induzido. Resultados semelhantes foram observados por ROSA *et al.* (resultados não publicados) com o silenciamento simultâneo dos genes citosólicos *OsAPx1* e *OsAPx2*. No trabalho, os autores demonstraram que a expressão de *OsAPx3* foi fortemente reprimida em resposta ao silenciamento dos genes citosólicos, enquanto que *OsAPx4*, que codifica uma isoforma bastante homóloga à *OsAPx3*, apresentou apenas 50% de redução no nível de acumulação do seu mRNA. A mesma redução de 50% ocorreu nos genes cloroplastídicos *OsAPx7* e *OsAPx8*, sendo que apenas a seqüência codificadora da isoforma mitocondrial *OsAPx6* não afetada pelo silenciamento de *OsAPx1* e *OsAPx2* (ROSA *et al.*, resultados não publicados).

O peróxido de hidrogênio pode atuar como molécula-sinal regulando a expressão gênica (SCANDALIOS, 2005). A alteração da expressão de outros genes da família gênica APx em resposta ao silenciamento daqueles codificadores das isoformas cloroplastídicas pode ter sido resultado de um possível aumento do nível dessa molécula decorrente da redução dos níveis de ascorbato peroxidase nas plantas transgênicas. Análises bioquímicas visando determinar o conteúdo de peróxido de hidrogênio nessas plantas serão ainda realizadas. Essas análises são fundamentais para a compreensão dos mecanismos que regulam a expressão dos genes *OsAPx* nas plantas silenciadas.

A literatura científica apresenta relatos do efeito do nocaute gênico de APx em plantas de *Arabidopsis thaliana* (MILLER *et al.*, 2007). Um complexo modo de regulação nos genes envolvidos com o sistema antioxidante foi observado em duplo-mutantes de *Arabidopsis* silenciadas nos genes *apx1* (citosólica) e *tylapx* (tilacóide). Diferentes sinais foram gerados nas plantas: na falta da APx cloroplastídica, a tolerância ao estresse promovido por excesso de calor aumentou, enquanto que na ausência da APx citosólica, houve um retardo no crescimento e um aumento da suscetibilidade das plantas ao estresse

oxidativo. Já em duplo-mutantes nocaute *apx1/tylapx*, uma resposta diferente foi observada envolvendo um sinal novo que bloqueou o crescimento e aumentou o acúmulo de antocianinas (MILLER *et al.*, 2007). No presente trabalho, o nível de silenciamento das plantas transgênicas RNAi foi bastante alto, resultando na redução de mais de 80% dos níveis de mRNA dos genes cloroplastídicos.

Experimentos de estresse oxidativo que resultassem no aumento da produção de peróxido de hidrogênio nos cloroplastos poderiam fornecer indicações da importância desses genes cloroplastídicos na planta. Por exemplo, o estresse por excesso de luz, o qual pode resultar na super-produção de peróxido de hidrogênio principalmente nos cloroplastos (SLESÁK *et al.*, 2007). Até o presente momento, foi testado apenas o estresse por radiação UV nas plantas geradas pelo presente trabalho. As plantas RNAi foram submetidas à luz UV e posteriormente foi analisada a localização *in situ* do peróxido de hidrogênio. No entanto, não foram observadas diferenças no acúmulo dessa molécula nas folhas das plantas transgênicas em comparação com as plantas não-transformadas. Uma explicação possível para este fato é que a sensibilidade do método testado não tenha sido suficiente para detectar essa diferença.

O cloroplasto possui uma alta taxa de atividade metabólica oxidante e uma alta taxa de fluxo de elétrons. Conseqüentemente, sofre mais danos causados pelas ERO uma vez que os genes *OsAPx*, responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio, encontram-se inativados nessa organela, sendo as células altamente suscetíveis aos danos provocados por estresses oxidativos. Um bom número de tratamentos e estresses como frio, estresse hídrico, herbicidas, alta temperatura entre outros, poderiam fornecer importantes indicações das funções exercidas pelas APx cloroplastídicas. Como observado por YABUTA *et al.* (2002), quando plantas transgênicas de tabaco super-expressando APx codificador da isoforma cloroplastídica foram geradas, estas exibiram um aumento da tolerância a estresses oxidativos causados por metilviologeno, alta intensidade luminosa e frio. Por outro lado, plantas com redução da atividade do gene codificador da APx cloroplastídica em *Arabidopsis* mostraram um aumento da suscetibilidade a herbicidas (TARANTINO *et al.*, 2005). Segundo SLESÁK *et al.* (2007), a atividade das APx nos cloroplastos

parece ser a formação de uma segunda barreira de defesa contra o peróxido de hidrogênio produzido nessas organelas. Análises mais detalhadas das plantas silenciadas nos genes de APx cloroplastídicas são necessárias para a compreensão da função desses nas plantas superiores e sua interação com outras enzimas do metabolismo antioxidante.

Para ambas as construções visando o silenciamento dos genes que codificam as APx cloroplastídicas foi obtida apenas uma linhagem transgênica para cada uma das transformações. As plantas obtidas apresentaram alterações fenotípicas, RNAiOsAPx7 teve seu desenvolvimento alterado e esterilidade, enquanto RNAiOsAPx8 apresentou apenas esterilidade. A ausência de um maior número de linhagens de plantas silenciadas inviabilizou a comprovação do fenótipo apresentado pelas plantas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8, bem como da resposta dessas plantas frente a diferentes estresses. Não se pode descartar a possibilidade de que o fenótipo observado seja decorrente do efeito de posição da inserção do transgene no genoma da planta. Somente após analisar diferentes linhagens independentes será possível confirmar a relação entre o fenótipo obtido e o silenciamento gênico.

Para as construções de silenciamento simultâneo dos genes *OsAPx5/OsAPx6* e *OsAPx7/OsAPx8* foram obtidas linhagens transgênicas apenas para os genes das isoformas mitocondriais (*OsAPx5/OsAPx6*). As PCRs utilizando os *primers* específicos para os genes *HPT* e *GUS* confirmaram a presença dos transgenes nessas plantas (dados não apresentados) em três linhagens independentes. No entanto, pelas análises de qRT-PCR, não foi observada redução na expressão de ambos os genes APx em quaisquer das linhagens transgênicas obtidas (dados não apresentados). Para a construção visando o silenciamento simultâneo de ambos os genes *OsAPx7/OsAPx8*, não foi obtida qualquer linhagem transformada. Existem duas possíveis explicações para esses resultados: (i) os calos embriogênicos Nipponbare utilizados nas transformações poderiam estar com uma baixa viabilidade e, desse modo, poderiam ter interferido na transformação; e (ii) problemas com as construções RNAi estariam de algum modo inviabilizando o processo de silenciamento

simultâneo dos genes *OsAPx5/OsAPx6* e, até mesmo, a obtenção de plantas transgênicas para os genes *OsAPx7/OsAPx8*.

Diante desses fatos, analisamos as construções RNAiOsAPx5/OsAPx6 e RNAiOsAPx7/OsAPx8, e ainda, as construções RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 visando detectar algum problema eventual que justificasse a ineficácia da construção RNAiOsAPx5/OsAPx6 em silenciar os respectivos genes, e a ausência de plantas transgênicas com a utilização da construção RNAiOsAPx7/OsAPx8. Foram feitas PCRs com os *primers* específicos para cada construção. Uma PCR foi feita somente com o *primer forward*, outra apenas com o *primer reverse* e uma terceira com os dois *primers* juntos. Uma vez que nessas construções uma seqüência do gene está presente em uma repetição invertida, a PCR com *primer forward* não deve produzir nenhum fragmento (o sentido de amplificação desse *primer* seria invertido e estende para fora da região compreendida entre os dois *primers*). Por outro lado, o produto da PCR com o *primer reverse* deve amplificar um fragmento de 1.500 pb correspondente às duas cópias do fragmento inserido e à toda região do gene *GUS* (**Figura 17 A**).

Dessa maneira, após exaustivas tentativas foi verificado que as construções para o silenciamento simultâneo dos genes *OsAPx5/OsAPx6*, *OsAPx7/OsAPx8* não amplificavam o fragmento esperado de 1.500 pb, apenas o fragmento obrigatório de 250 pb quando a reação era realizada com os dois *primers* (*forward* e *reverse*) (**Figura 17 B**). Por outro lado, as outras construções para o silenciamento dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8* individualmente as reações de PCR amplificaram o fragmento obrigatório 250 pb (com ambos os *primers*), e ainda, o fragmento de 1.500 pb (com apenas o *primer reverse*) (**Figura 17 B**). Desse modo, concluímos que as construções RNAiOsAPx5/OsAPx6 e RNAiOsAPx7/OsAPx8 não expressam o hairpin possivelmente por possuírem apenas uma cópia do fragmento alvo clonado no vetor pANDA. Essas análises confirmaram a validade das construções RNAi dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8*, corroborando os dados de qRT-PCR que mostram o silenciamento eficiente nas plantas portando essas construções (**Figura 10 A, B**). Após as análises que comprovaram os problemas com as construções RNAiOsAPx5/OsAPx6 e RNAiOsAPx7/OsAPx8, novas construções foram obtidas e analisadas, e no

momento linhagens transformadas com as mesmas estão em fase de seleção em processo de cultura de tecidos.

A obtenção de plantas silenciadas para os genes mitocondriais e cloroplastídicos de *OsAPx*, bem como a avaliação da expressão dos diferentes membros da família gênica quando esses genes encontram-se inativados é de extrema importância para fornecer indicações sobre a função de cada gene nos mecanismos de defesa da planta à estresses oxidativos, bem como a interação com outros genes do metabolismo antioxidante.

Em paralelo foram realizados experimentos visando o estudo da expressão de todos os genes da família das ascorbato peroxidases de arroz em resposta à diferentes estresses e tratamentos. A compreensão dos mecanismos de regulação dos genes que codificam as isoenzimas APx em resposta à estresses ambientais é uma abordagem importante para ajudar a elucidar as respostas de tolerância à estresses oxidativos em plantas superiores (SHIGEOKA *et al.*, 2002). O perfil de expressão de cada gene de *OsAPx* foi estudado frente a diferentes estresses em plantas não-transformadas cv. Nipponbare.

O tratamento com concentrações tóxicas de alumínio provocou alterações na expressão dos genes *OsAPx*. Foi observada uma redução significativa no nível de transcritos dos genes das isoformas mitocondriais (*OsAPx5* e *OsAPx6*) após 4 horas de exposição ao Al (**Figura 12**). Por outro lado, após 8 horas de exposição a expressão dos genes das isoformas *OsAPx1*, *OsAPx3*, *OsAPx5* e *OsAPx7* foi fortemente induzida. O gene que codifica a isoforma da membrana do tilacóide (*OsAPx8*) também foi induzido nesse tempo, após sofrer uma leve repressão às 4 horas de tratamento. O contrário foi observado em estudos com toxidez ao Al em plântulas de arroz submetidas à 160 μ M de alumínio (SHARMA & DUBEY, 2007). Nesse trabalho foi verificado um declínio na atividade das enzimas cloroplastídicas, bem como diferentes alterações nas demais isoformas. Normalmente, as plantas resistem ao estresse oxidativo pela indução da atividade de enzimas antioxidantes, entretanto, membros individuais da mesma família freqüentemente respondem diferentemente a vários estímulos de estresse (AROCA *et al.*, 2003). Além do mais, o nível de peróxido de hidrogênio difere nos vários compartimentos

celulares e esses níveis estão relacionados com o tipo de estresse e com a intensidade do mesmo (SLESAK *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo é um fator chave na produção de danos em plantas expostas à condições de estresses, incluindo toxicidade por metais. No entanto, o estresse oxidativo causado por metais varia dependendo das espécies de planta. O arroz é considerado tolerante ao Al, mas serve como um importante modelo de estudos entre as monocotiledôneas (YANG *et al.*, 2007).

A exposição de plantas de arroz ao peróxido de hidrogênio exógeno revelou resultados interessantes. Nesta análise todos os genes que codificam isoformas de APx solúveis (*OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx5*, *OsAPx6* e *OsAPx7*) foram induzidas pelo peróxido de hidrogênio. Ao contrário, nenhuma alteração no perfil de expressão nos genes que codificam isoformas ancoradas a membrana (*OsAPx3* e *OsAPx4* peroxissomal, e *OsAPx8* tilacóide) foi observada (**Figura 13**). Rosa *et al.* (resultados não publicados) observaram aumento do conteúdo de peróxido de hidrogênio em plantas transgênicas silenciadas para os genes das APx citosólicas submetidas ao estresse. O aumento do peróxido de hidrogênio não afetou o nível de mRNA das outras APx em plântulas, no entanto, reduziu o nível desses transcritos na plantas adultas. As respostas decorrentes do silenciamento das APx citosólicas diferem das respostas obtidas pelo tratamento com peróxido de hidrogênio exógeno em plantas de arroz não-transformadas. Esses resultados sugerem que o tratamento com peróxido de hidrogênio exógeno não afeta a fisiologia da planta do mesmo modo quando enzimas que eliminam peróxido de hidrogênio estão faltando em um compartimento celular específico.

Em um trabalho realizado por YOSHIMURA *et al.* (2000) com tratamento exógeno de ácido abscísico e herbicida, os níveis de transcritos das isoformas cloroplastídicas e peroxissomais de APx não foram alterados em plantas de espinafre. De maneira contrária, os transcritos das APx citosólicas foram fortemente induzidos pelo tratamento com o herbicida. Esse padrão de expressão coincide os resultados obtidos em nosso trabalho com aplicação exógena de peróxido de hidrogênio, onde as isoformas citosólicas foram induzidas e as cloroplastídica (*APx8*) e peroxissomal (*APx3*) não sofreram alterações. No trabalho realizado por TSAI & KAO (2004) a aplicação de ácido abscísico

exógeno em raízes de arroz provocou diferentes mudanças na atividade das enzimas antioxidantes e nas concentrações de peróxido de hidrogênio dessas enzimas. Foi observado um significativo decréscimo na atividade das enzimas superóxido dismutases e catalases, e por outro lado, um aumento da atividade da APx e glutathiona redutase, dessa maneira demonstrando a complexidade do sistema antioxidante.

Quando plantas de arroz foram submetidas à baixa temperatura ocorreu uma indução significativa na expressão dos genes *OsAPx1*, *OsAPx2*, *OsAPx3*, *OsAPx4*, *OsAPx6* e *OsAPx7* após 6 horas de exposição ao estresse (**Figura 14**). Por outro lado, após 24 horas sob 10°C, os genes *OsAPx2* e *OsAPx8* foram reprimidos. Esses resultados demonstraram mais uma vez a existência de uma regulação diferencial na expressão desses genes. KANG & SALTVEIT (2002) demonstraram que níveis elevados da atividade de enzimas antioxidantes como SOD, APx e CAT correlacionou com o aumento da tolerância ao frio em plantas de pepino. E ainda, que a APx parece ser uma das enzimas do sistema antioxidante mais importantes na defesa contra injúria a baixa temperatura (KANG & SALTVEIT, 2002).

Na maioria dos estresses os níveis de expressão dos genes das isoformas citosólicas foram aumentados. Esses resultados podem estar relacionados com o aumento da atividade das APx citosólicas (*OsAPx1* e *OsAPx2*) com intuito de proteger os componentes celulares contra o efeito do peróxido de hidrogênio originado pelo estresse oxidativo. Segundo SHIGEOKA *et al.* (2002) Os genes citosólicos são responsáveis pelas respostas às mudanças ambientais, resultando na proteção dos compartimentos celulares contra o estresse oxidativo e no estrito controle do nível de peróxido de hidrogênio na sinalização celular. PANCHUK *et al.* (2005) investigaram o envolvimento dos genes de APx de *Arabidopsis* na modulação do nível de peróxido de hidrogênio durante a senescência. Diferentes alterações no padrão de expressão foram observadas nos oito genes dessa família em folhas derivadas de uma única planta, e em folhas derivadas de plantas de diferentes idades. Além disso, os genes de APx cloroplastídica da membrana do tilacóide e *APx4* peroxissomal mostraram forte redução na expressão em folhas de ambas as plantas.

Interessantemente, nossos dados de estresse hídrico coincidem com os resultados de senescência obtidos por PANCHUK *et al.* (2005), os genes da isoforma cloroplastídica *OsAPx8* e a peroxissomal *OsAPx4* foram fortemente reprimidas após 15 dias de estresse de seca (**Figura 15**). Ao contrário, os genes das isoformas citosólicas, mitocondriais e APx estromal foram significativamente induzidas por esta condição de estresse. TEIXEIRA *et al.* (2006) após exposição de plantas de arroz ao sal observaram redução da expressão dessa mesma isoforma cloroplastídica. Em nossos experimentos a seca e o frio produziram a mesma alteração nesse gene, indicando que diferentes estresses provocaram redução na expressão da APx cloroplastídica (*OsAPx8*). Esses resultados sugerem que esta isoforma exerce funções importantes nas respostas a estresses que causam estresse oxidativo.

De um modo geral, cada gene de APx em arroz mostrou padrão diferencial de expressão nos diferentes tratamentos e estresses. Esses resultados sugerem que as isoformas de ascorbato peroxidases estão amplamente relacionadas com a detoxificação de ERO produzidas sob diferentes condições de estresse. A regulação diferencial dos oito membros revela a complexidade do sistema antioxidante nas plantas.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi realizado um estudo de caracterização funcional dos genes codificadores de ascorbato peroxidases de arroz visando contribuir para a elucidação da função de cada membro dessa família gênica. Além disso, foi feita uma análise do perfil de expressão desses genes em resposta a condições de estresse abiótico.

As análises do padrão de expressão dos oito genes de APx demonstraram uma diversificação na regulação dos mesmos. Nos diferentes estresses que as plantas foram submetidas, ocorreram fortes alterações na expressão dos genes referentes a todas as isoformas de APx, indicando uma diversificação funcional dos genes em estudo. Estes resultados reafirmaram a complexidade da regulação das enzimas que fazem parte do metabolismo antioxidante em plantas. Um estudo mais detalhado do perfil de expressão de cada gene frente a outras condições de estresse poderá contribuir para fornecer um quadro mais completo do papel das diferentes isoformas de APx. Análises do perfil de expressão das demais enzimas que fazem parte do sistema antioxidante nos vegetais em condições de estresse oxidativo poderá ajudar à elucidar a interação dessas com as APx em plantas na detoxificação de ERO.

Os resultados relacionados com a inativação dos genes *OsAPx7* e *OsAPx8* forneceram importantes indicações sobre o papel desses no metabolismo antioxidante. No entanto, a análise de um número maior de linhagens de plantas silenciadas para os genes cloroplastídicos e mitocondriais deverá fornecer mais indicações da função desses nos mecanismos de defesa da planta. Para isso, novas transformações encontram-se em andamento. Além disso, análises bioquímicas das enzimas APx e das demais enzimas relacionadas ao sistema antioxidante estão em andamento nas plantas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 já obtidas.

A localização subcelular dos produtos dos diferentes genes de APx foi determinada por análises *in silico* (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Além disso, foi determinada experimentalmente a localização subcelular das proteínas

codificadas por apenas três dos genes, *OsAPx1*, *OsAPx3* e *OsAPx6* (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Essas análises foram realizadas em sistema heterólogo utilizando células BY-2 de tabaco. Por esta razão, paralelamente ao desenvolvimento deste trabalho, foram construídos vetores visando o estudo da localização subcelular de todas as proteínas APX em fusão com a proteína fluorescente GFP.

Essas construções permitirão o estudo da localização dessas proteínas em sistema homólogo utilizando calos transgênicos de arroz ou plantas regeneradas. As análises em plantas transgênicas permitirão verificar se a localização dessas proteínas pode variar em resposta a estímulos ambientais. No momento, calos embriogênicos Nipponbare transformados com essas construções encontram-se em seleção no processo de cultura de tecidos para, posteriormente, serem analisados por microscopia confocal.

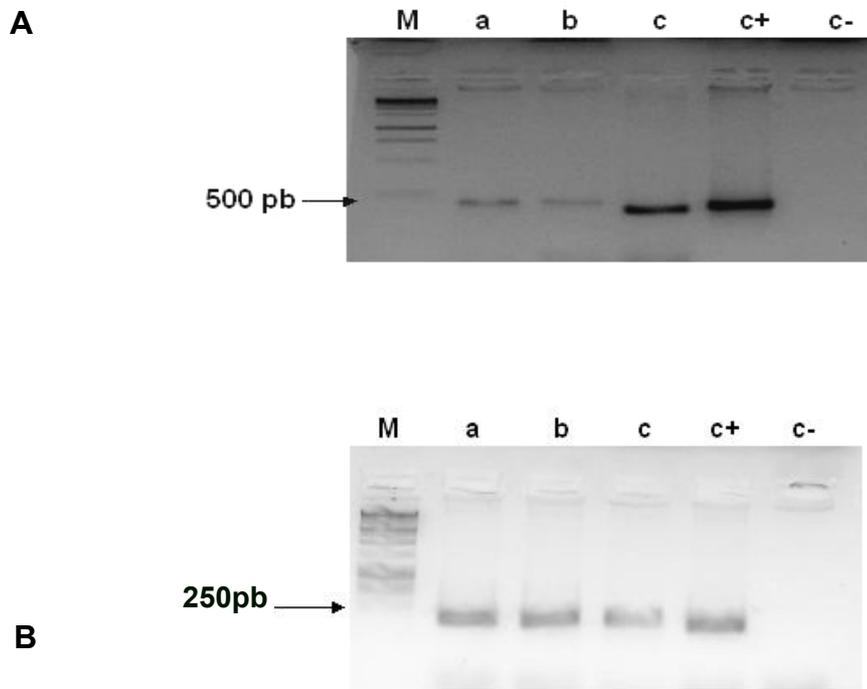


Figura 4. Confirmação da obtenção dos clones RNAiOsAPx5/6 e RNAiOsAPx7/8. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. **(A)** PCR utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx5/6 obtidos da transformação de *E. coli*. **(B)** PCR usando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx7/8 obtidos da transformação de *E. coli*. Os *primers* HPT (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo um fragmento de 500 pb (**M** - marcador 1 kb *ladder* (Promega); **a** - **c** - clones; **c+** - controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **c-** - controle negativo (plasmídeo vazio). *E. coli* XL1-Blue foi usada nas transformações.

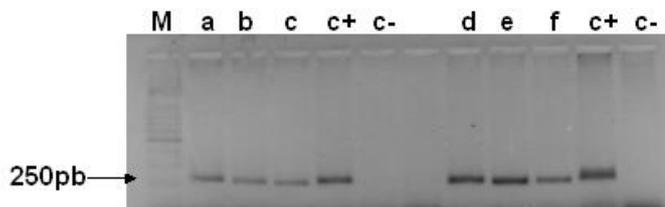


Figura 5. Confirmação da obtenção dos clones RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8.

Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. (**Canaletas a, b, c**) PCR usando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx7 obtidos da transformação de *E. coli*. (**Canaletas d, e, f**) PCR usando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx8 obtidos da transformação de *E. coli*. *Primers* específicos para *OsAPx7* e *OsAPx8* (*forward* e *reverse*) foram utilizados na reação produzindo, em ambos os casos, um fragmento de 250 pb (**M** - marcador 100 pb (Ludwing Biotec); **c+** controle positivo (plasmídeo pENTR contendo o fragmento); **c-** controle negativo (plasmídeo vazio). *E. coli* XL1-Blue foi usada nas transformações.

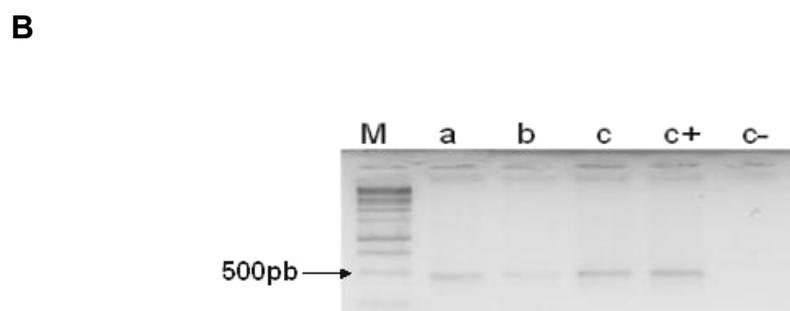
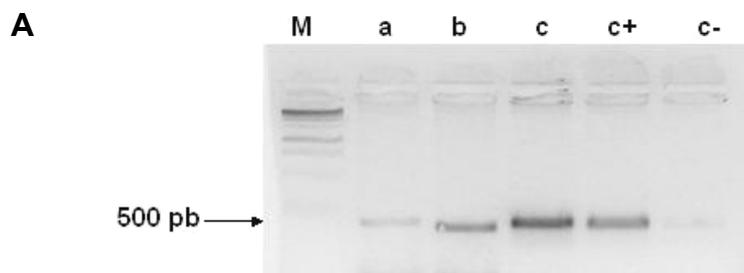


Figura 6. Transformação de *A. tumefaciens* com os clones RNAiOsAPx5/6 e RNAiOsAPx7/8. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR (**A**) PCR usando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx5/6 obtidos da transformação de *A. tumefaciens*. (**B**) PCR utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx7/8 obtidos da transformação para *A. tumefaciens*. O *primer* HPT (*forward* e *reverse*) foi utilizado na reação produzindo um fragmento de 500 pb (**M** - marcador 1 kb *ladder* (Promega); **a** - **c** clones; **c+** controle positivo; **c-** controle negativo). *A. tumefaciens* AGL1 foi usada nas transformações.

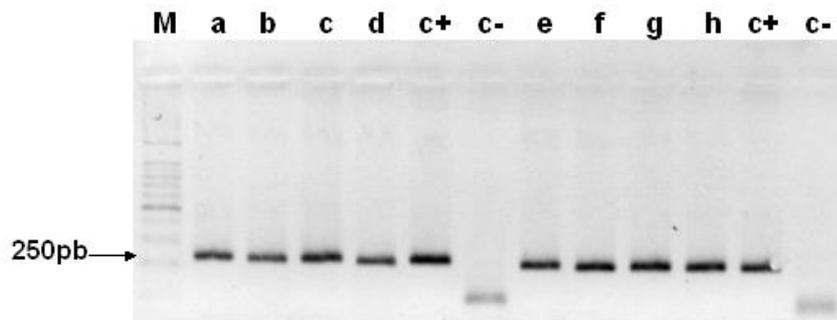


Figura 7. Transformação de *A. tumefaciens* com os clones RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8. Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. (**Canaletas a - d**), PCR usando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx7 obtidos da transformação de *A. tumefaciens*. (**Canaletas e - h**), PCR utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones RNAiOsAPx8 obtidos da transformação para *A. tumefaciens*. *Primers* específicos para *OsAPx7* e *OsAPx8* foram utilizados na reação produzindo em ambas as reações, um fragmento de 250 pb (**M** - marcador 100 pb (Ludwing Biotec); **c+** controle positivo; **c-** controle negativo). *A. tumefaciens* AGL1 foi usada nas transformações.

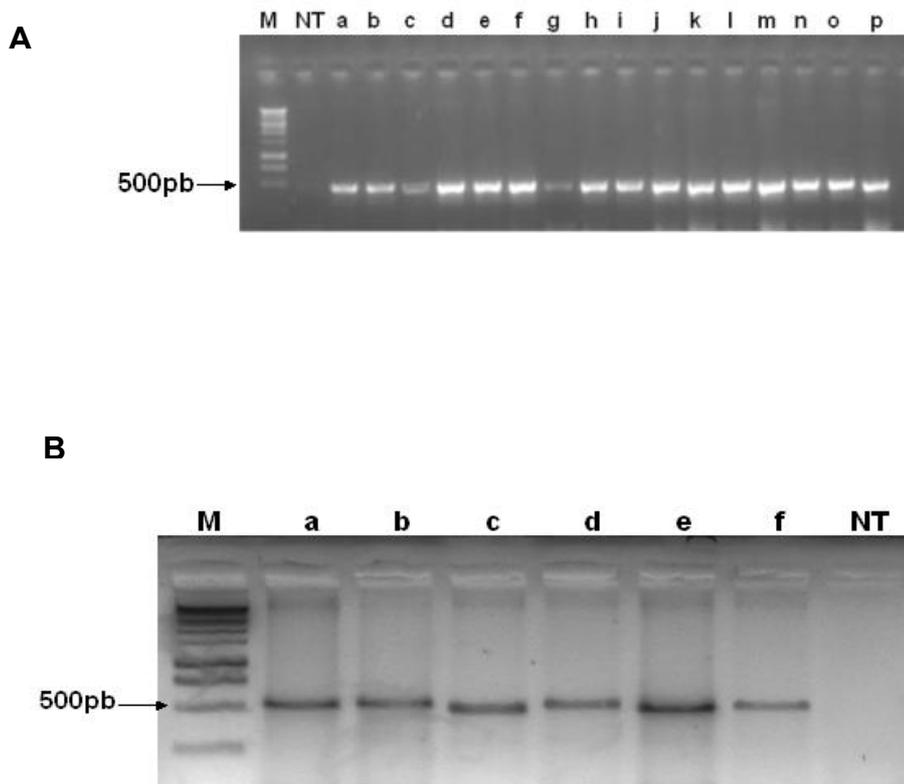


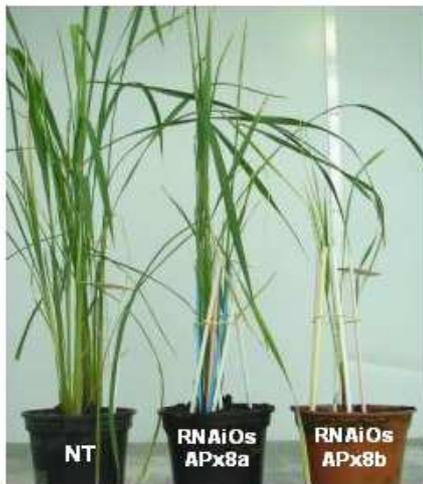
Figura 8. Confirmação da transformação genética das plantas de arroz. Análise dos produtos de PCR em eletroforese em gel de agarose a 1%. Na PCR foi utilizado o DNA genômico das plantas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 contendo o gene de resistência a higromicina (*hpt*). **(A)** DNA genômico de plantas RNAiOsAPx7 (**M** - marcador 1 kb *ladder* (Promega); **NT** - planta não-transformada; **a - p** plantas transgênicas positivas). **(B)** DNA genômico de plantas RNAiOsAPx8 (**M** - marcador 1 kb *ladder* (Promega); **a - f** plantas transgênicas positivas; **NT** - planta não-transformada). *Primer* HPT (*forward* e *reverse*) foi usado nas PCRs para confirmar a transgenia, produzindo um fragmento de 500 pb.



A



B



C

Figura 9. Plantas transgênicas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8. (A) Plantas RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx8 em casa de vegetação. **(B)** Plantas RNAiOsAPx7 usadas para análise de qRT-PCR (**NT** - planta não-transformada; plantas RNAiOsAPx7a e RNAiOsAPx7b). **(C)** Plantas RNAiOsAPx8 usadas para análise de qRT-PCR (**NT** - planta não-transformada; plantas RNAiOsAPx8a e RNAiOsAPx8b).

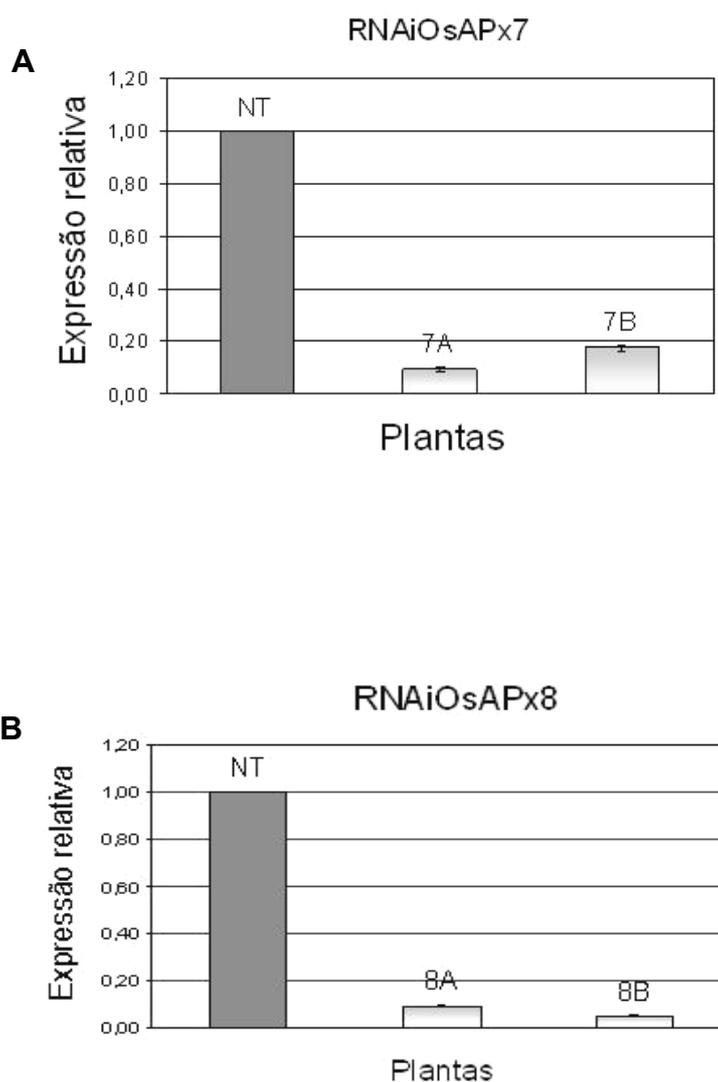


Figura 10. Análises por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos níveis de mRNA em plantas RNAiOsAPx. (A) Acúmulo de mRNA de OsAPx7 em plantas RNAiOsAPx7 (NT - planta não-transformada; 7A e 7B - plantas transgênicas da linhagem RNAiOsAPx7). (B) Acúmulo de mRNA de OsAPx8 em plantas RNAiOsAPx8 (NT - planta não-transformada; 8A e 8B - plantas transgênicas da linhagem RNAiOsAPx8). Os níveis de transcritos foram normalizados em relação aos níveis de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*.

APxs

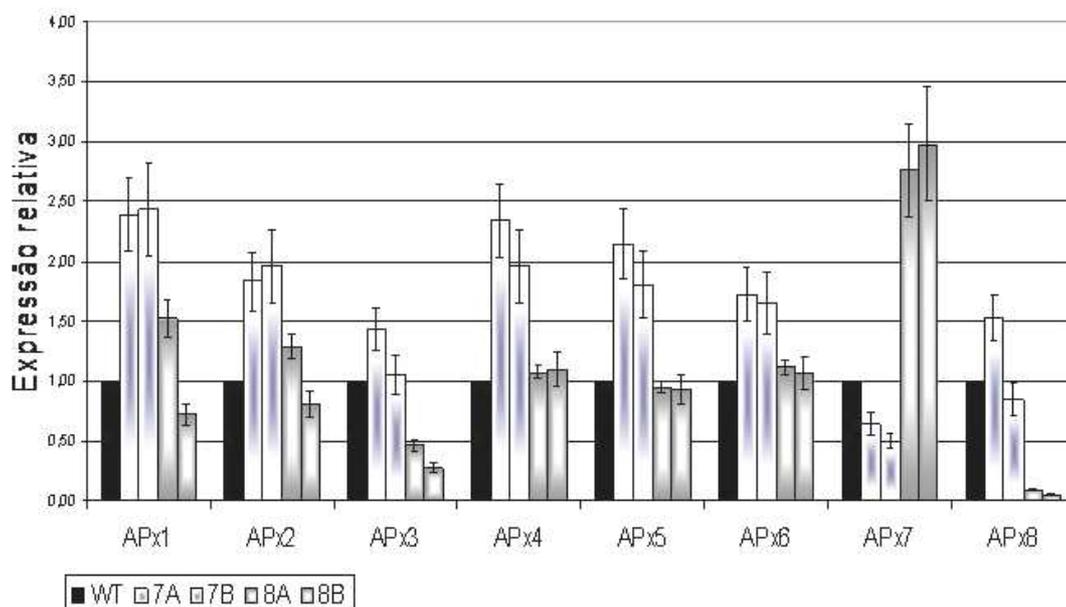


Figura 11. Quantificação dos transcritos correspondentes aos genes *OsAPx* nas plantas *RNAiOsAPx7* e *RNAiOsAPx8*. As análises foram realizadas por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os níveis de transcritos foram analisados em todos os genes de *OsAPx* nas plantas transgênicas e silenciadas para os genes *OsAPx7* e *OsAPx8*. Os níveis de transcritos foram normalizados em relação aos níveis de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*.

Alumínio

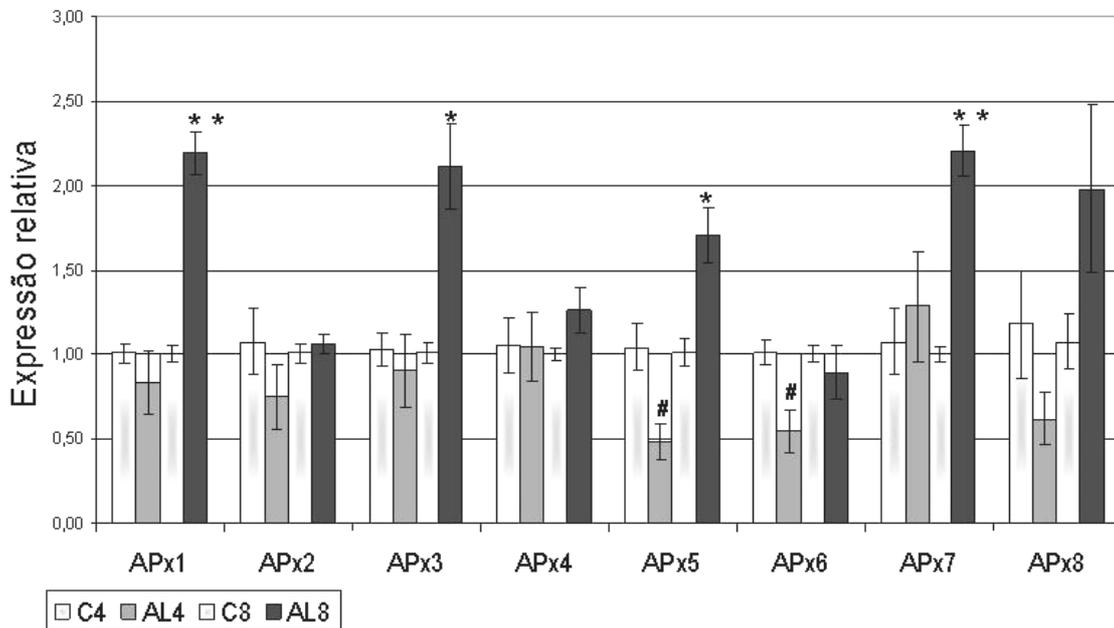


Figura 12. Determinação do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz em resposta ao tratamento com Al. O RNA total das raízes foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qRT-PCR. As raízes foram coletadas após 4 e 8 h de tratamento com 20 ppm de Al. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*. Os símbolos # e * indicam que os valores diferem significativamente quando comparados com a planta controle. ** Alto nível de significância ($P < 0,05$). (# 4 h de tratamento; * 8 h de tratamento). (C4 - controle 4 h; C8 - controle 8 h; AL4 - alumínio 4 h; AL8 - alumínio 8 h).

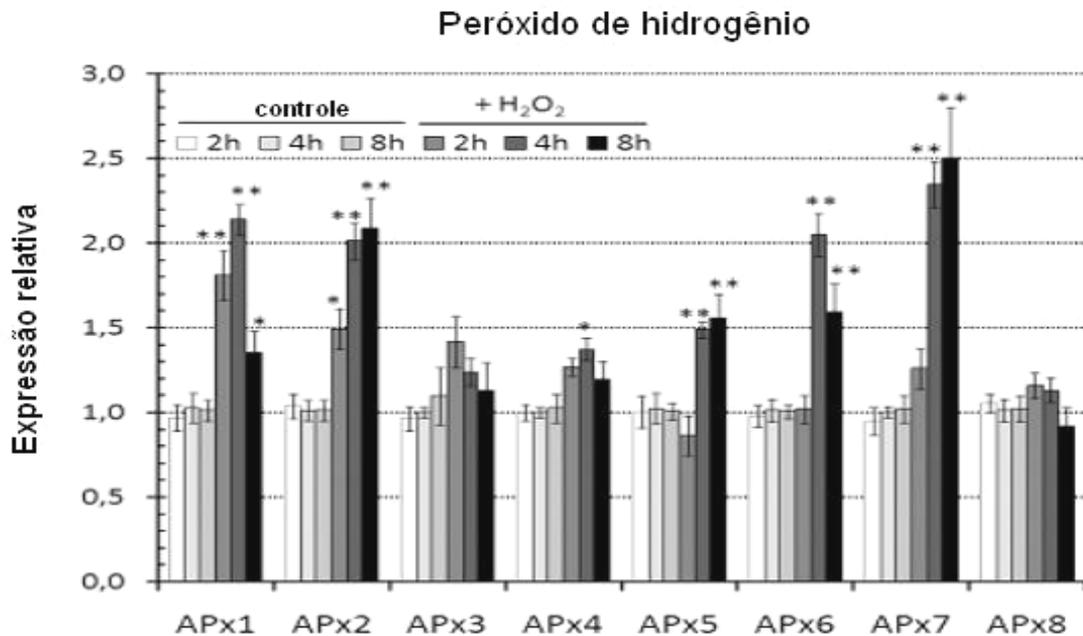


Figura 13. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz em resposta ao tratamento com H₂O₂. As análises foram realizadas em plantas submetidas após 2, 4 e 8 h de tratamento com 10 mM de peróxido de hidrogênio. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente quando comparados com a planta controle. ** Alto nível de significância ($P < 0.05$).

FRIO

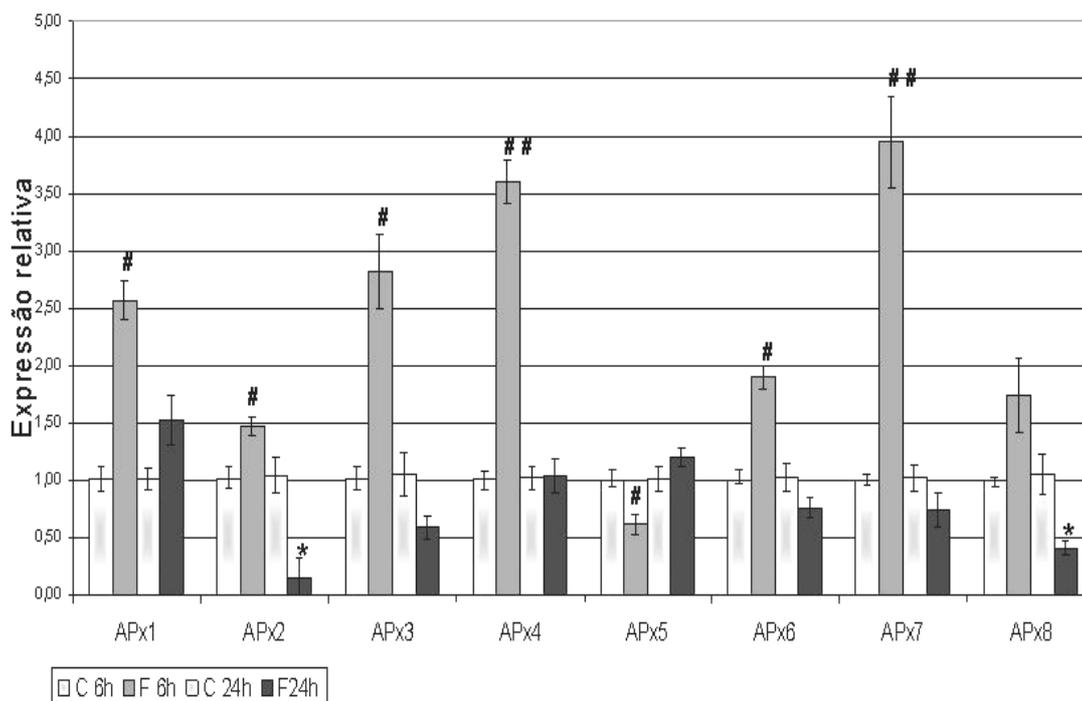


Figura 14. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz submetidas ao frio. O material vegetal foi coletado após 6 e 24 h de tratamento à temperatura de 10°C. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*. Os símbolos # e * indicam que os valores diferem significativamente quando comparados com a planta controle. ## Alto nível de significância ($P < 0.05$). (# 6 h de tratamento; * 24 h de tratamento). (C 6h - controle 6 h; C 24h - controle 24 h; F 6h - frio 6 h; F 24h - frio 24 h).

SECA

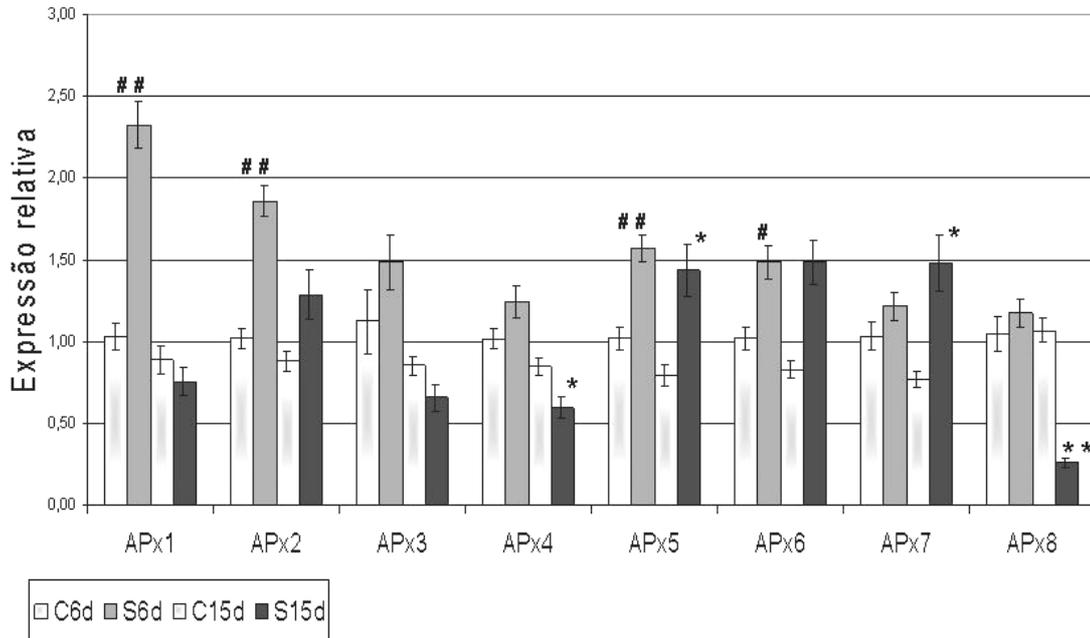


Figura 15. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos genes da família das APx de arroz submetidas à seca. O material vegetal foi coletado aos 6 e 15 dias de estresse à seca. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *ubi*, *fdh* e *ef*. Os símbolos # e * indicam que os valores diferem significativamente quando comparados com a planta controle. ## e ** Alto nível de significância ($P < 0.05$). (# 6 dias de estresse; * 15 dias de estresse) (C6d - controle 6 dias; C15d - controle 15 dias; S6d - seca 6 dias; S15 - seca 15 dias).

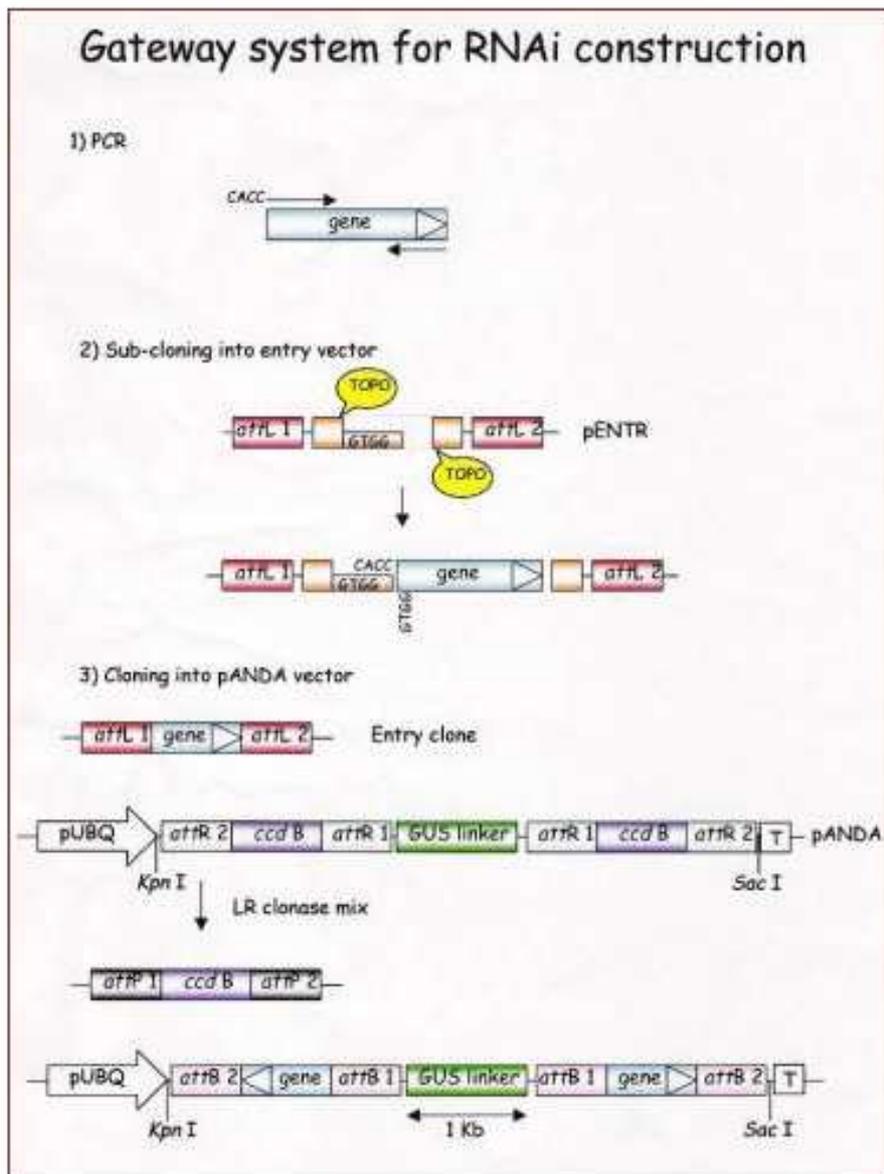


Figura 16. Sistema de clonagem Gateway para construção RNAi. O cDNA de interesse é amplificado por PCR usando *primers* específicos (1) e transferido para o vetor de entrada pENTR (2), posteriormente o clone de entrada é clonado no vetor de destino pANDA (3).

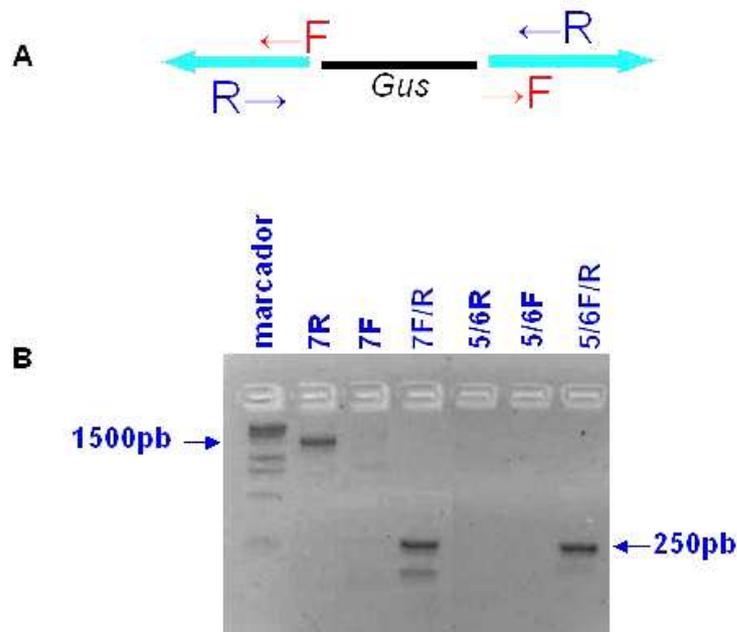


Figura 17. Representação esquemática das reações de PCR com os *primers* específicos para as construções OsRNAi. (A) Esquema representando a abrangência dos *primers forward* e *reverse* para as construções RNAi. **(B)** Análise de eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR. Reação de PCR com os *primers forward* e *reverse* separados e, ainda com *primers forward/reverse* juntos para as construções RNAiOsAPx7 e RNAiOsAPx5/OsAPx6. **Canaleta 1** marcador 1 kb Ladder (Promega); **Canaleta 2** Reação PCR realizada com o *primer reverse* RNAiOsAPx7; **Canaleta 3** Reação PCR realizada com o *primer forward* RNAiOsAPx7; **Canaleta 4** Reação PCR realizada com os *primers forward/reverse* RNAiOsAPx7; **Canaleta 5** Reação PCR realizada com o *primer reverse* RNAiOsAPx5/OsAPx6; **Canaleta 6** Reação PCR realizada com o *primer forward* RNAiOsAPx5/OsAPx6; **Canaleta 7** Reação PCR realizada com o *primer forward/reverse* RNAiOsAPx5/OsAPx6.

Tabela 5. Construções RNAi para o silenciamento específico dos genes *OsAPx*. A diferença de nucleotídeos contínuos e idênticos entre os oito genes APx e a porcentagem de similaridade destes referente a cada construção RNAi específica estão indicadas. Os quadros sombreados indicam os genes de APx individualmente silenciados.

Construção	APx1	APx2	APx3	APx4	APx5	APx6	APx7	APx8
RNAiOsAPx5	11 nt 47%	9 nt 45%	12 nt 44%	12 nt 47%	100%	39 nt 85%	14 nt 71%	14 nt 73%
RNAiOsAPx6	11 nt 48%	7 nt 46%	11 nt 40%	11 nt 39%	40 nt 85%	100%	14 nt 70%	14 nt 72%
RNAiOsAPx7	6 nt 13%	5 nt 5%	5 nt 8%	5 nt 9%	9 nt 13%	9 nt 16%	100%	11 nt 26%
RNAiOsAPx8	10 nt 24%	9 nt 7%	6 nt 8%	8 nt 11%	7 nt 9%	5 nt 15%	4 nt 8%	100%

Tabela 6. Construções RNAi para o silenciamento simultâneo dos genes *OsAPx*. A diferença de nucleotídeos contínuos e idênticos entre os oito genes APx e a porcentagem de similaridade destes referente a cada construção RNAi simultaneamente estão indicadas. Os quadros sombreados indicam os genes de APx simultaneamente silenciados.

Construção	APx1	APx2	APx3	APx4	APx5	APx6	APx7	APx8
RNAiOsAPx5/6 (204 nt)	51% (9nt)	53% (9 nt)	50% (7 nt)	52% (6 nt)	100% (204 nt)	82% (61 nt)	69% (11 nt)	65% (11 nt)
RNAiOsAPx7/8 (238 nt)	55% (8 nt)	58% (9 nt)	55% (11 nt)	59% (9 nt)	70% (13 nt)	71% (11 nt)	100% (238 nt)	81% (34 nt)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, K & HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biotechnology*, 55: 373-399, 2004.

AROCA, R.; IRIGOYEN, J. J. & DÍAZ, M. S. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 117: 540-549, 2003.

ASAI, N.; MATSUYAMA, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KUBO, A.; AONO, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HAYASHI, H.; MULLINEAUX M. P. & 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.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E. & FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194, 2003.

BOLWELL, G.P. & WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 347-366, 1997.

EMBRAPA – Arroz. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br> Acesso em: 20 de outubro de 2007.

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. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1998. v. 121, p. 1-34.

GALE, M. D. & DEVOS, K. M. Plant comparative genetics after 10 years. *Science*, 282 (5389): 656-659, 1998.

HALLIWEL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press, 1999. 936 p.

ISHIKAWA, T.; SAKAI, K.; YOSHIMURA, K.; TAKEDA, T. & SHIGEOKA, S. cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'- coding regions. *FEBS Letters*, 382: 289-293, 1996.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAM, P.; SANHAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R. & PANNEERDELVAM, R. Induction the drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.06.010.

JEPERSEN, H. M.; KJAERGARD, I. V.; OSTERGAARD, L. & WELINDER, K. G. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochemistry Journal, 326: 305-310, 1997.

JIMÉNEZ, A.; HERNANDEZ, J. A.; DEL RIO, L. A. & SEVILHA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. Plant Physiology, 114: 275-284, 1997.

KANG, M. H. & SALTVEIT, E. M. Effect of chilling on antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity of high – and low-vigour cucumber seedling radicles. Plant Cell and Environment, 25: 1233-1238, 2002.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25: 402-408, 2001.

MA, B.; WAN, J. & SHEN, Z. H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum. Plant Growth Regulation, 52: 91-100, 2007.

MADHUSUDHAN, R.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA, S. & SHIBATA, H. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. Physiologia Plantarum, 117: 550-557, 2003.

MAHAJAN, S. & TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444: 139-158, 2005.

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.

MENDONÇA, R. J.; CAMBRAIA, J. OLIVEIRA, J. A. & OLIVA, M. A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 843-848, 2003.

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

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 Stresses. *Plant Physiology*, 144: 1777-1785, 2007.

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

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. & BREUSEGEM, V. 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.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 561-591, 2001.

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

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

RABBANI, M.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KATSURA, K.; ITO, Y.; TOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, H. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stress and

abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755-1767, 2003.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 123-130, 2003.

ROUT, R. G.; SAMANTARAY, S. & DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie*, 21: 3-21, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2344 p.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 995-1014, 2005.

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 9: 483-486, 2002.

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, S. R. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Report*, 26 (11): 2027-2038, 2007.

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.

SHIMAMOTO, K. & KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 399-419, 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.

TARANTINO, D.; VANNINI, C.; BRACELE, 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. Identificação e caracterização dos genes que codificam as isoformas de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.). Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

TEIXEIRA, F. K.; BENAVENTE, M. L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS, R. & PINHEIRO, M. M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224: 300-314, 2006.

TEIXEIRA, F. K.; BENAVENTE, M. L.; MARGIS, R. & PINHEIRO, M. 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.

TSAI, Y. C. & KAO, H. C. The involvement of hydrogen peroxide in abscisic acid-induced activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in rice roots. *Plant Growth Regulation*, 43: 207-212, 2004.

UPADHYAYA, N. M.; ZHOU, X. R.; ZHU, Q. H.; EAMENS, A.; WANG, M. B.; WATERHOUSE, P. M. & DENNIS, E. S. Transgenic Rice. In: O'BRIEN, L.; HENRY, R. J. *Transgenic Cereals*. AACC, 2000. p. 28-87.

WANG, W.; VINOCUR, B. & ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14, 2003.

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.

YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W.; QIAN, C. & PENG, X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, 7: 737-749, 2007.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T. & SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, 123: 223-233, 2000.

ANEXO I- Insertos RNAi específico

OsAPx5 (254 nt) pcDNA-OsAPx5

AAAAAGCAGGCTCCAGGGCAATCTTGGACATCTGAGTGGCTCAAGTTTGACA
ACAGCTACTTCAAGGAAATCAAAGAACGCCGAGATGAGGATCTTCTAGTTCTC
CCTACTGATGCTGTGCTCTTTGAGGACTCATCATTCAAGATCCATGCTGAAAA
GTATGCTGAGGATCAGGATGCATTTTTTCGAAGACTATGCTGAAGCTCATGCCA
AACTGAGCAATCTTGGGGCAAAGTTTGATCGACCCAGCTTTCT

OsAPx6 (254 nt) pEST-OsAPx6

AAAAAGCAGGCTCCAGGGCAATCTTGGACATCACAGTGGCTGAAGTTTGATA
ATAGCTACTTCAAGGACATCAAAGAACGCCGAGATGAGGACCTTCTAGTTCT
GCCTACTGATGCTGTGCTCTTTGAGGACTCATCATTCAAGATCTATGCTGAAA
AGTACGCCGCAGATCAGGATGCATTTTTTTGAAGACTATGCTGAAGCTCATGC
CAA ACTGAGCAATCTCGGAGCAAAGTTTGATCGACCCAGCTTTCT

OsAPx7 (220 nt) pEST-OsAPx7

AAAAAgCAggCTCCGAGCAATCTGGGTGCAAATTCAATCCTCCTGAGGGATT
CACGTTGGACGGTTAATGCGATGCGCATGAGCCAGATCGCTGAAGTGGCCA
ACCACTTTTACAGAAAGGATCAAGAGAGAAACACTACACAATCCAATTTCTG
CTCCAACGTTGTGCATCATTCCAGATGAAGCTTTTCTGACCACGAGTCGAC
CCAGCTTTCT

OsAPx8 (227 nt) pOs-APx8F3

AAAAAgCAggCTCCGCTGCGAAATACTCCTACGGAAAGAAGGAGCTGTGCGA
CTCGATGAAGCAGAAGATCAGGGCGGAGTACGAGGGATTCCGAGGCAGCCC
GGACAAGCCTCTGCAGTCCA ACTACTTCTCAACATCATGCTCTTGATCGGA
GGGCTGGCCTTCTTGACGTCTCTGCTCGGGAGCTGAGAGCGATGGTCTGAT
GACCTCCTGACCCAGCTTTCT

ANEXO II- Insetos RNAi simultâneo

RNAiOsAPx5/6 (204 pb)

GGAGTTGAGTTAGTACATGCAGCTAACAAAGGTCTTCTGAAGGCGTTATTCTT
GGTCATTCCCATCAAGAGCAAGTATGCAGGTGTCACTTATGCAGATATATTC
AACTTGCCAGTGCTACAGCCATTGAGGAAGCCGGTGGCCCCAAGATCCCCAT
GATCTATGGAAGGGCTGATGTTGCTGATGGTGAAGAATGCCACCT

RNAiOsAPx7/8 (238 pb)

CTCTAAAGCTTGTCCAACCTATCAAGGACAAATACCCAAATATCTCATATGCG
GATTTATTCCAGCTGGCAAGTGCTACAGCAATTGAGGAAGCTGGTGGTCCAA
AGATTCCAATGACATATGGACGGATTGATGTCCACAGGTCCTGAGCAGTGTCC
ACCTGAGGGGAAGCTTCCCGATGCTGGCCCAAGTGCACCTGCGGATCACTT
GAGGAAGGTATTTTACAGGATGGGTCTTGA