

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JULIO DE ANDRADE GARIGHAN

Análise da região promotora do gene *OsAPx3* que codifica uma ascorbato peroxidase peroxissomal em arroz

Porto Alegre

2014

Julio de Andrade Garighan

Análise da região promotora do gene *OsAPx3* que codifica uma ascorbato peroxidase peroxissomal em arroz

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia

Porto Alegre

2014

Julio de Andrade Garighan

Análise da região promotora do gene *OsAPx3* que codifica uma ascorbato peroxidase peroxissomal em arroz

Orientadora

Prof. Dra. Márcia Pinheiro Margis

Coorientadora

Dra. Gisele Passaia

Porto Alegre

2014

Julio de Andrade Garighan

Análise da região promotora do gene *OsAPx3* que codifica uma ascorbato peroxidase peroxissomal em arroz

Aceite da banca em ____ / ____ / _____

Porto Alegre

2014

Sumário

Agradecimentos	6
Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Objetivos	27
Material e Métodos	28
Resultados e discussões	34
Conclusões e perspectivas	43
Anexos	44
Referências	46

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que foram fundamentais na minha vida e neste trabalho durante sua realização.

Aos meus pais, Beatriz Maria e Carlos Jones, por todo apoio, por terem me sustentado todo esse tempo e por estarem ao meu lado sempre.

Aos meus amigos Bianca, Gabriela, Tais, Jackson, Rafael, Mariana, Thais e todos os Píks pelo apoio e por tornar todas as dificuldades e desafios em momentos de descontração.

A Tirzah, por ser minha companheira e estar do meu lado este tempo todo, me ajudar a escrever e me fazer feliz sempre.

A Carolina Ribeiro, por ser minha coorientadora, me ensinar na prática o que é ciência, pelo companheirismo e pelas conversas.

A Gisele Passaia, pelo suporte e toda a atenção neste último ano.

Ao Dr Louis, pelas conversas, apoio e palavras sábias, obrigado por estar junto neste projeto!

Aos meus colegas, por tudo que passamos juntos, e pela ajuda no laboratório.

A prof^a Márcia Márgis, por me orientar durante esse período, pelo apoio, pelas palavras de ensinamento e por me fazer sempre pensar de forma diferente.

Resumo

Ascorbato peroxidase (APx) é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons. O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que é produzida constantemente pelo metabolismo aeróbico, e em situações de estresse biótico ou abiótico tem sua produção aumentada, sendo que em grandes quantidades pode causar diversos danos celulares. Em arroz, APx é codificada por oito genes, cujos produtos são classificados por sua localização subcelular: citosólica, peroxissomal, mitocondrial ou cloroplastidial. A caracterização dos genes codificadores de APxs vem sendo feita e o estudo de promotores é uma ferramenta de grande importância que possibilita analisar o padrão de expressão global de genes em plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar o padrão de expressão conferido pela sequência promotora do gene *OsAPx3* de ascorbato peroxidase (peroxissomal). Para estas análises foi isolada uma sequência nucleotídica de aproximadamente 2 kb anterior ao sítio de iniciação da tradução do gene, a qual foi clonada no vetor de entrada pENTR e em seguida no vetor de destino, pHGWFS7, específico para o estudo de promotores. O vetor contendo a sequência promotora, denominado PromAPx3, foi utilizado para a transformação de calos embriogênicos de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. Os calos transformados foram regenerados e cultivados em meio de seleção. Foram obtidas oito linhagens de plantas expressando *Gus* sob controle do promotor do gene *OsAPx3* e a confirmação da transgenia foi verificada por PCR. Segmentos das plantas transformadas com o vetor PromAPx3 foram coletados e analisados por ensaios histoquímicos com X-Gluc. Em condição padrão, a expressão do gene *Gus* foi verificada em folhas, anteras, sendo a marcação nas anteras mais forte na fase R4, quando ocorre a antese. Em teste de seca houve repressão da expressão nas folhas-bandeira, e indução de expressão nas anteras. Análises *in silico* revelaram *cis*-elementos envolvidos na resposta a luz, anaerobiose, giberelina, ABA e falta de açúcar. Outros ensaios serão feitos e como perspectivas estão análises histoquímicas e quantificação fluorimétrica de GUS em outros tecidos vegetais, tanto em condições controle quanto em condições de estresse. Além disso, serão realizados testes experimentais para confirmar a predição dos *cis*-elementos da região promotora.

Palavras chave: promotor, expressão gênica, ascorbato peroxidase, arroz

Abstract

Ascorbate peroxidase (APx) is a key enzyme of the antioxidant metabolism, catalyzing the decomposition of hydrogen peroxide in water using ascorbate as electron donor. Hydrogen peroxide is a reactive oxygen species (ROS), which is constantly produced by aerobic metabolism, and under biotic and abiotic stress production is increased, and in large quantities can cause several cellular damage. In rice, the APx is encoded by eight genes, whose products are classified by their subcellular localization: cytosolic, peroxisomal, mitochondrial or chloroplastic. The characterization of genes encoding APXs has been taken and the study of promoters is a very important tool, which allows to analyze the global pattern of gene expression in plants. The aim of this work was to study the expression pattern of the promoter sequence of the gene *OsAPx3* of ascorbate peroxidase (peroxisomal). For these analyzes, a 2 kb nucleotide sequence up stream to the translation start site of the gene was isolated and cloned into pENTR vector and then into the destiny vector pHGWFS7, specific for promoter analyses. The vector containing the promoter sequence called PromAPx3 was used for transformation of rice calli via *Agrobacterium tumefaciens*. The transformed calli were regenerated into plants and grown in selective media. Eight lines expressing the *Gus* gene under the control of the *OsAPX3* promoter were obtained. The confirmation of the transgene integration was carried out by PCR. Segments of the plants transformed with the vector PromAPx3 were collected and analyzed by histochemical assays with X-Gluc. In the control condition, the expression of *Gus* gene was detected in leaves and anthers, with the strongest staining in the anthers at R4 stage, when anthesis occurs. In drought test there was expression repressing in flag leaves, and induction of expression in anther. *In silico* analysis revealed the presence of *cis* elements of response to light, anaerobiosis, gibberellin, ABA and sugar shortage. Other tests will be done such as histochemical analysis and GUS fluorimetric quantification in other plant tissues, both in control conditions and under stress. Moreover, experimental tests to confirm the prediction of *cis* elements present in the promoter region will be carried out.

Keywords: Promoter, gene expression, ascorbate peroxidase, rice

1. Introdução

1.1 Estresse oxidativo

Do ponto de vista fisiológico, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio (Nilsen e Orcutt, 1996). “O estresse começa com uma limitação biótica ou abiótica, que causa flutuações altamente imprevisíveis impostas ao padrão metabólico regular, gerando tensão no organismo, doença ou uma fisiologia aberrante” (Gaspar et al., 2002).

As espécies cultivadas, assim como todas as plantas, sofrem diversos estresses durante seu ciclo de vida, podendo ser um estresse natural ou antropogênico. Dentre os estresses naturais, há os abióticos (alterações climáticas, excesso ou falta de água, radiação, calor, frio) e os bióticos (ataques de pragas e doenças) (Lichtenthaler, 2004). O estresse antropogênico é aquele causado pela interação humana, como poluição do ar e do solo e uso indiscriminado de herbicidas (Schutzendubel e Polle, 2002). Situações ambientais adversas encontradas pela planta durante o seu ciclo de vida impõem limitações severas ao crescimento e reprodução vegetal, interferem na homeostase fisiológica, limitando o potencial genético e, em última análise, refletindo-se na produtividade das culturas agrícolas (Dhaliwhal e Arora, 1999).

Mudanças drásticas na homeostase celular ocasionam danos moleculares, diminuição do crescimento e desenvolvimento e até mesmo a morte da planta. O baixo crescimento é uma característica adaptativa da planta que cresce em condições de estresse, pois isso a possibilita alocar seus recursos de maneira a não prejudicar seu total desenvolvimento. Porém, o efeito mais negativo que o estresse pode causar à planta é a inibição da divisão celular (Zhu, 2001).

A maioria dos agentes estressantes gera o que se conhece por estresse oxidativo (Gille e Sigler, 1995; Bartosz, 1997). De maneira geral, o estresse oxidativo pode ser definido como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), gerando um descontrole do potencial de oxidação. Este desequilíbrio na

relação entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes é devido às taxas de produção de ERO superiores à taxa do metabolismo, causando danos oxidativos aos componentes metabólicos. Durante o quadro de estresse oxidativo, a taxa de reparo do dano é menor que a oxidação, causando acúmulo de componentes de danos celulares que levam à perda de função de organelas e eventual morte (Foyer e Noctor, 2011).

Um dos fatores ambientais que mais limitam maior produtividade e distribuição das culturas de cereais, principalmente em culturas irrigadas, é o estresse causado por fatores abióticos, que podem ser divididos em atributos físicos, tais como iluminação excessiva, radiação ultravioleta UV-A e UV-B, seca, calor, frio e injúrias, além dos atributos químicos (deficiências minerais, excesso de sais) (Lichtenthaler, 2004).

Geralmente, metais pesados induzem uma variedade de efeitos bioquímicos e distúrbios metabólicos, como diminuição de crescimento e possíveis anomalias de desenvolvimento (Mazen, 2004), redução de biomassa e sintomas cloróticos (Yruela, 2005) e influenciam na absorção de outros metais (Fernandes, 2006).

A deficiência hídrica resulta em diminuição do volume celular, aumento na concentração de soluto e progressiva desidratação do protoplasto (Larcher, 2004), influencia o transporte de solutos (absorção de íons e nutrientes) em grandes extensões, afetando as reações fotossintéticas nos cloroplastos de várias maneiras (Shao et al. 2007), além de causar distúrbios na respiração (Larcher, 2004).

A alta concentração de sal nos solos influencia negativamente o crescimento das plantas devido ao aumento do potencial osmótico, aumento da concentração de íons ou outras toxinas presentes no solo, bem como o aumento de íons nos tecidos das plantas (Lee et al., 2001). O estresse salino causa desbalanço iônico e estresse hiperosmótico em plantas e, como consequências destes efeitos primários, ocorrem danos devido ao estresse oxidativo (Zhu, 2001). O estresse causado pelo aumento da salinidade (geralmente pelo excesso de NaCl) quebra a homeostase no potencial osmótico e na distribuição de íons, tanto no nível celular quanto na planta inteira.

Interações entre estresse salino e estresse oxidativo foram relatadas em várias espécies vegetais. Estes relatos demonstraram diversas alterações no metabolismo antioxidante quando plantas ou culturas de células foram expostas ao sal. Todos os organismos têm respostas adaptativas para o estresse oxidativo induzidos por mudanças nos níveis de ERO, levando à ativação ou silenciamento de genes que codificam enzimas de defesa, fatores de transcrição ou proteínas estruturais (Dalton et al, 1999). A maioria dos estudos que descrevem as alterações decorrentes do estresse oxidativo é baseada na dosagem da atividade de enzimas antioxidantes e dos danos oxidativos aos componentes celulares. Alguns trabalhos realizados com plantas de arroz submetidas a diversos estresses abióticos têm sido publicados. (Lin e Kao, 2000; Lee et al., 2001; Dionísio-Sesee Tobita, 1998; Menezes-Benavante et al., 2004; Tan Jet al., 2014; Wei, S. et al., 2014), demonstrando a alta relevância desta área de estudo.

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

Quando plantas sofrem estresse oxidativo, diferentes vias são afetadas e os elétrons com altos níveis de energia são transferidos para o oxigênio molecular formando ERO, tais como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.

Diversas reações químicas acontecem para gerar as ERO, iniciando com a redução de um elétron do oxigênio para gerar o superóxido. Em pH baixo, ocorre a dismutação do superóxido que, junto com a adição de prótons, forma o peróxido de hidrogênio. Além disso, na presença de metais, como o ferro e o cobre, outras reações ocorrem (Reação de Fenton e Haber-Weiss), formando o radical hidroxila, que é a ERO mais reativa dos sistemas biológicos (Gill e Tuteja., 2010). Elas causam nas plantas baixa produtividade, danos e até mesmo a morte celular (Grene, 2002). A Figura 1 resume as reações que ocorrem para a produção de ERO.

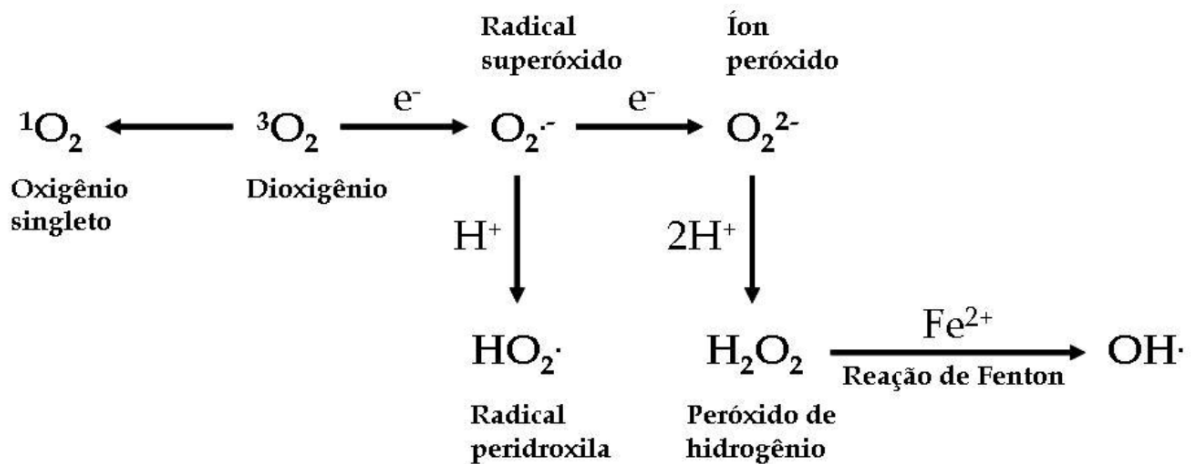


Figura 1. Geração de ERO por transferência de energia (modificado de Gill e Tuteja, 2010).

Desde a introdução do oxigênio molecular no nosso ambiente, através do aparecimento de organismos fotossintetizantes, as ERO tornaram-se companhia obrigatória da vida aeróbica (Halliwell, 2006). Estas moléculas são produzidas continuamente em baixos níveis pelo metabolismo natural das células, entretanto, na presença de algum estresse, ocorre um aumento na sua produção (Miller et al., 2010). As ERO estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, citosol, apoplasto e também são produzidas continuamente como subprodutos de várias vias metabólicas (Del Rio et al., 2006; Navrot et al., 2007; Gill e Tuteja, 2010). As principais fontes produtoras de ERO nas células vegetais são a fotossíntese, a respiração e a fotorespiração, além de NADPH oxidases, amina oxidases e peroxidases de parede celular, ativadas durante a morte celular programada e defesa contra patógenos (Mittler, 2002). A Figura 2 apresenta um esquema das vias relacionadas com o metabolismo das ERO.

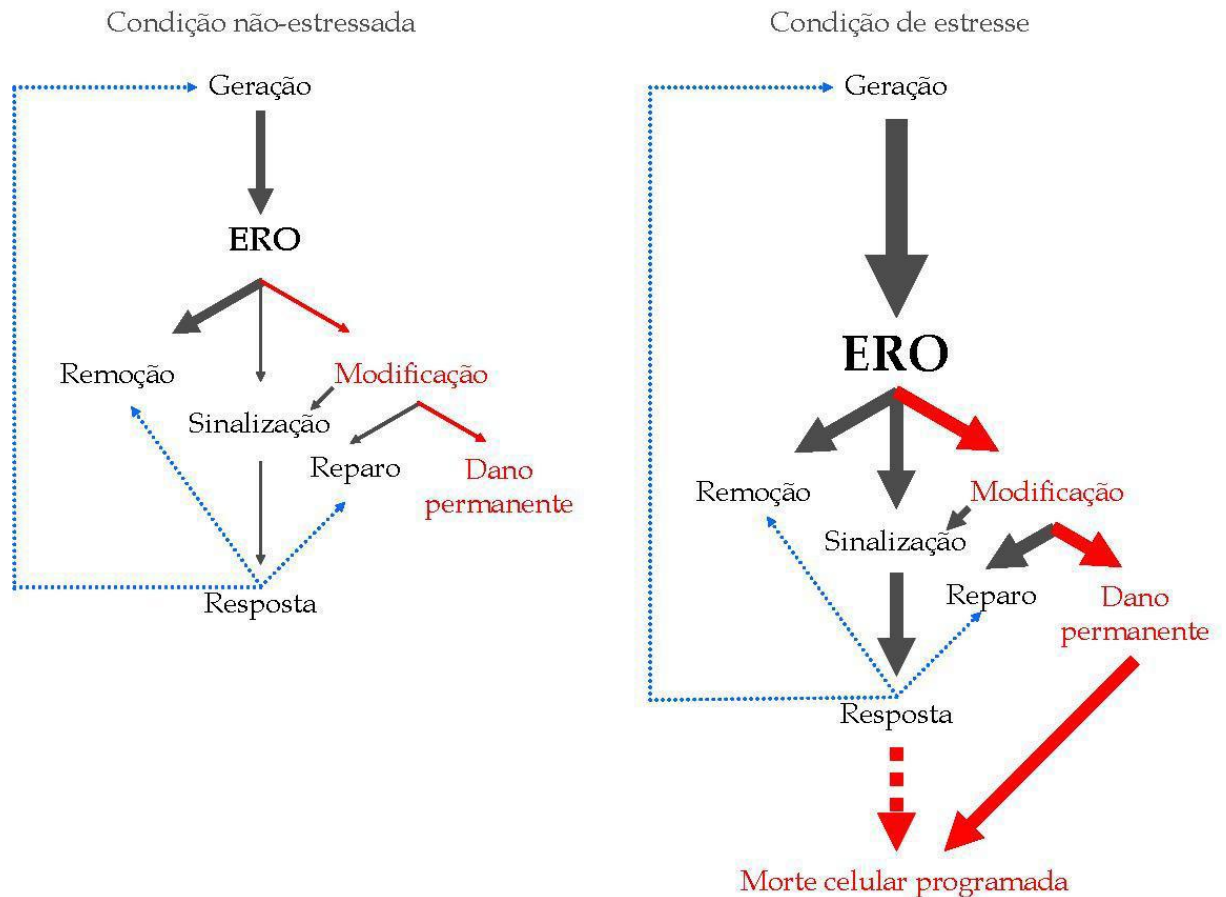


Figura 2. Relação entre produção de ERO, remoção, modificação, sinalização, e danos nas células vegetais em (a) condição não estressada e (b) condições de estresse (modificado de Moller et al. 2007).

Existem diferentes tipos de ERO produzidas na célula vegetal e cada molécula de ERO está relacionada com a ativação de vias de sinalização diferentes (Foyer e Noctor, 2011; Gadjev et al., 2006). A alta produção de ERO durante estresse salino é ocasionada pela deficiência do sistema de transporte de elétrons em cloroplastos e mitocôndrias e pela indução de vias metabólicas, como a fotorespiração (Sivakumar ET al., 2000). Para tentar minimizar a superprodução de ERO, as plantas utilizam alguns mecanismos para reduzir seus efeitos, como: adaptações anatômicas nas folhas alterando o movimento foliar, adaptações fisiológicas como o metabolismo das plantas C4 e CAM, mecanismos moleculares para reprogramação da fotossíntese alterando fotossistemas e induzindo oxidases alternativas (Mittler, 2002). A resposta da planta ao aumento dos níveis de ERO dependerá da concentração e sítio de produção de ERO, bem como da interação destas com outras moléculas de resposta a estresse (Moller et al., 2007).

Quando as ERO estão presentes em grandes quantidades dentro da célula tornam-se altamente citotóxicas e podem reagir com diversos metabólitos causando danos oxidativos a enzimas, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Moléculas de ERO são causadoras de diversos processos degenerativos, incluindo peroxidação de lipídios de membrana e morte celular programada. Os danos oxidativos podem também expressar-se em hipo ou hipermetilação do DNA, deleção e substituição de bases do DNA, alterações cromossômicas (aneuploidia e poliploidia) e rearranjo cromossômico, que podem resultar em variação somaclonal (Swanson e Gilroy, 2010).

Por outro lado, as ERO também atuam como moléculas sinalizadoras no metabolismo, não sendo somente subprodutos tóxicos. Como moléculas sinalizadoras, as ERO controlam diversos processos metabólicos tais como ciclo celular, crescimento, morte programada da célula, senescência, sinalização hormonal, resposta a estresses abióticos, defesa contra patógenos, respostas sistêmicas e desenvolvimento (Mittler et al., 1998; Mittler, 2002; Vranová et al., 2002; Vandenameele et al., 2003; Vacca et al. 2004; de Pinto et al., 2006; Kwak et al., 2006; Torres et al., 2006; Queval et al., 2007; Slesak et al., 2007; Zavaleta-Mancera et al., 2007).

A atuação das espécies reativas de oxigênio como metabólitos tóxicos, fatores de proteção ou sinalização depende do delicado equilíbrio entre a produção e remoção dessas moléculas na célula em tempo adequado (Gratao et al., 2005).

1.3 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é gerado a partir da dismutação do superóxido. Essa molécula tem uma reatividade moderada, alta permeabilidade através das membranas e maior meia-vida, de 1 ms (Gill e Tuteja, 2010). Por esses motivos é a ERO mais abundante nos sistemas biológicos aeróbicos (Wan e Liu, 2008). O peróxido de hidrogênio é constantemente produzido pelo metabolismo normal da célula, mas tem sua produção aumentada em resposta a estresses abióticos, como radiação ultravioleta, estresse salino, seca, excesso de luz, alta e baixa temperatura,

induzindo resistência a estes estresses e protegendo a célula (Gill e Tuteja., 2010). Quando altos níveis acumulam na célula, o peróxido de hidrogênio pode direta ou indiretamente oxidar o *pool* de ascorbato e glutathione e alterar o estado redox da célula (Wan e Liu., 2008).

A função do peróxido de hidrogênio não é somente atuar como molécula sinalizadora de estresse nas plantas. Apesar de ter sua concentração aumentada quando a planta sofre alguma injúria, o peróxido de hidrogênio também está presente em vários processos metabólicos que ocorrem na célula vegetal. Ele participa de muitos mecanismos de resistência a estresses, incluindo o reforço da parede celular e produção de fitoalexinas (Dempsey e Klessig., 1995). Além da atuação direta do peróxido de hidrogênio, esta molécula também atua indiretamente induzindo a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo, transporte e degradação proteica, organização celular e biogênese, defesa e fatores de transcrição (Desikan et al., 2001).

O peróxido de hidrogênio também é importante nas interações planta-patógeno, pois sua indução pode eliminar o patógeno ou induzir genes de defesa que irão limitar a infecção (Bozso et al., 2005). Estudos recentes têm demonstrado que o peróxido de hidrogênio é um dos componentes centrais da cascata de transdução de sinal envolvida na adaptação da planta em resposta a mudanças ambientais (Neill et al., 2002a).

Em resumo, o peróxido de hidrogênio atua como um metabólito celular tóxico, porém também funciona como uma molécula sinalizadora envolvida nas respostas a vários estímulos tanto em células vegetais como animais. Em plantas, o peróxido de hidrogênio desempenha um duplo papel, quando em baixas concentrações na célula atua como uma molécula de sinalização envolvida na aclimatação para tolerância a diversos estresses bióticos e abióticos e, em altas concentrações, leva à morte celular programada (Quan et al., 2008; Neill et al., 2002). O peróxido de hidrogênio está envolvido em uma ampla gama de processos fisiológicos, como um regulador chave para a senescência, fotorrespiração, fotossíntese, movimento dos estômatos,

ciclo celular, crescimento e desenvolvimento da planta (Peng et al., 2005; Noctor e Foyer., 1998; Bright et al., 2006; Mittler et al., 2004; Foreman et al., 2003).

1.4 Mecanismos de defesa antioxidante

Qualquer circunstância em que a homeostase redox da célula é desfeita pode levar ao estresse oxidativo ou a geração de ERO. As ERO são produzidas em todos os organismos aeróbios dentro das células e estão normalmente em equilíbrio com moléculas antioxidantes (Scandalios, 2002).

As células das plantas mantêm os componentes de defesa antioxidante em níveis bastante altos, dependendo do requerimento das condições ambientais, e removem as ERO das células como resposta defensiva ao estresse oxidativo. Porém, como citado anteriormente, as ERO não são unicamente moléculas que causam danos às células, sendo também indicadores de estresse oxidativo. Essas moléculas detectam o estresse e ativam mecanismos de resistência antioxidantes. Esses mecanismos de defesa são extremamente importantes para as células, pois as protegem de processos enzimáticos redox, preservam a integridade da membrana e protegem o DNA e as proteínas (Greene., 2002). Portanto, como o acúmulo de ERO pode resultar em prejuízos consideráveis, a célula dispõe de vários mecanismos para detoxificar eficientemente essas moléculas.

Moléculas antioxidantes, enzimas simples, e um sistema mais complexo de detoxificação podem estar envolvidos na proteção celular contra ERO acumuladas.

O sistema de defesa antioxidante das células vegetais é formado por componentes não-enzimáticos e enzimáticos. Os componentes não-enzimáticos são moléculas de baixo peso molecular, como o ascorbato (AsA), a glutathione, o tocoferol e os carotenóides (Chun et al., 2005; Soares., 2002). O ascorbato e a glutathione são moléculas essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (Foyer e Noctor., 2011).

Estes dois antioxidantes são mantidos em seus estados reduzidos dentro da célula por um grupo de enzimas capazes de usar o NAD(P)H para regenerar ascorbato e glutatona oxidados, sendo elas: monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e glutatona redutase (GR) (Mittler et al., 2004). Também são utilizados como co-fatores pelas enzimas ascorbato peroxidase e glutatona peroxidase nas reações de redução do peróxido de hidrogênio em água (Slesak et al., 2007).

Moléculas transportadoras de ascorbato e glutatona têm papel de destaque na determinação das concentrações específicas destes componentes e do potencial redox em cada compartimento subcelular (Noctor e Foyer, 1998; Pignocchi e Foyer, 2003).

Os componentes enzimáticos são enzimas reguladoras que impedem a ação tóxica das ERO à célula vegetal. São elas: superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APx), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e peroxiredoxina (PrxR) (Scandalios, 2002; Mittler et al., 2004). A enzima SOD é a responsável por detoxificar o superóxido, produzindo o peróxido de hidrogênio, este pode ser eliminado pelas demais enzimas antioxidantes. Sendo assim, o balanço entre a concentração de SOD e a concentração das enzimas detoxificadoras de peróxido de hidrogênio é crucial para manter o equilíbrio entre os níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio na célula (Mittler et al., 2004).

Uma via antioxidante muito importante para a detoxificação de ERO é o Ciclo do Ascorbato-Glutatona (Figura 3). Este compreende grande parte das enzimas detoxificantes e pode ser encontrado em diversos compartimentos subcelulares. O ciclo do ascorbato-glutatona envolve a redução do peróxido de hidrogênio a água pela enzima APx, que utiliza o ascorbato (AsA) como doador de elétrons. O AsA oxidado gera o monodeidroascorbato (MDHA) e este pode ser espontaneamente reduzido à deidroascorbato (DHA). O AsA reduzido é recuperado pela ação da MDHAR, que utiliza NADPH nesta reação. O DHA também é recuperado para formar AsA reduzido através da ação da DHAR, usando a glutatona (GSH) como doador de

elétrons. A forma reduzida de GSH é regenerada pela enzima GR, também dependente de NADPH (Asada, 1999; Shigeoka et al., 2002).

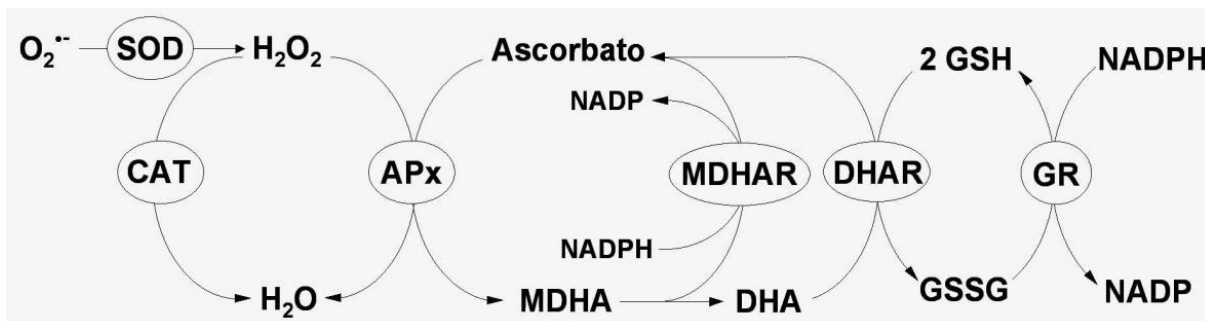


Figura 3. Ciclo do Ascorbato-Glutationa (Teixeira et al., 2005)

As diferentes enzimas antioxidantes são encontradas em quase todos os compartimentos subcelulares, e geralmente mais de um tipo de enzima ocorre em cada compartimento, inclusive enzimas com funções semelhantes (Mittler et al., 2004). A afinidade com o substrato, a taxa de reação e a concentração enzimática são parâmetros importantes que vão definir a relativa contribuição de cada enzima no sistema antioxidante (Mittler, 2002).

1.5 Ascorbato Peroxidase

Ascorbato peroxidases (APx, EC 1.11.1.11) são heme-peroxidases de classe I. Parecem ser as primeiras enzimas envolvidas na remoção do peróxido de hidrogênio das células das plantas (Allen et al., 1997), protegendo-as dos efeitos tóxicos desta ERO. Estas enzimas utilizam o ascorbato como doador de elétrons para a redução do peróxido de hidrogênio a água (Li et al., 2007).

Diversos trabalhos já descreveram o mecanismo catalítico das APxs, assim como a estrutura 3D baseada em estudos cristalográficos e o sítio de ligação ao ascorbato (Patterson e Poulos, 1995; Mandelman et al., 1998; Wada et al., 2002; Raven, 2003; Sharp et al., 2003). Estes estudos demonstraram a existência de um núcleo catalítico comum nas APxs, contendo dois domínios típicos de heme-peroxidases. O sítio ativo possui uma histidina distal, que atua como catalisador na

reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima, e uma histidina proximal, presente no sítio de ligação ao grupo heme (Henrissat et al. 1990).

Várias isoformas de APx têm sido descritas em diversas espécies de plantas, como algodão, arroz, *Arabidopsis*, abóbora, ervilha, soja (Teixeira et al, 2004; Koussevitzky et al., 2008; Nito et al., 2001; Mittler e Zilinskas, 1991; Shi et al., 2008; Li et al., 2007), e também em algas, euglenas e outros organismos (revisado por Gill e Tuteja, 2010).

As APx podem ser encontradas em variados compartimentos celulares, incluindo citosol, peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos (Teixeira et al., 2004, Teixeira et al., 2006; Li et al., 2007). As isoformas de APxs são classificadas de acordo com a localização subcelular de cada enzima. No citosol e no estroma do cloroplasto são encontradas as isoformas solúveis, enquanto que as isoformas ligadas às membranas são encontradas nos peroxissomos e tilacóides do cloroplasto. A localização de cada isoforma dentro da célula é determinada pela presença de peptídios sinal organela específicos e domínios transmembrana nas regiões N-terminal e C-terminal de cada enzima (Teixeira et al., 2004).

Estudos sobre APxs demonstraram a modulação da expressão destas enzimas em resposta a estresses, como seca, salinidade, alta e baixa temperatura, intensidade luminosa, ataque de patógenos, tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido abscísico (Zhang et al., 1997; Mittler et al., 1998; Yoshimura et al., 2000; Sato et al. 2001; Shigeoka et al., 2002; Agrawal et al., 2003; Fryer et al., 2003; Menezes-Benavente et al., 2004; Teixeira et al., 2006). A expressão dos genes APx é também dependente do tecido e da fase do desenvolvimento (Agrawal et al., 2003; Teixeira et al., 2006). Na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, diversos trabalhos caracterizando as isoformas de APx foram feitos. A expressão dos genes AtAPxs foi induzida em resposta a estresses de frio, luz UV, peróxido de hidrogênio e paraquat (Zhang et al., 1997), calor (Panchuk et al., 2002), ácido abscísico e alta intensidade luminosa (Fryer et al., 2003; Rossel et al., 2006). Plantas nocautes para os genes que codificam APx podem ou não apresentar diferenças fenotípicas. O nocaute do gene *AtAPx1* citosólico resultou em plantas com supressão no crescimento e

desenvolvimento e alteração na resposta dos estômatos (Pnueli et al., 2003). Também causou o colapso do sistema cloroplastídico de decomposição de peróxido de hidrogênio, o aumento de peróxido de hidrogênio, a redução fotossintética e a oxidação de proteínas (Davletova et al., 2005). Entretanto, quando plantas de *Arabidopsis* nocautes para os genes que codificam as APxs cloroplastídicas foram obtidas, estas não apresentaram diferenças significativas em relação às plantas não-transformadas (Davletova et al., 2005; Tarantino et al., 2005). A superexpressão de APx gera plantas mais resistentes aos estresses (Rossel et al., 2006; Lu et al., 2007), como foi relatado em outras espécies submetidas a estresses, como arroz, batata, espinafre, *Festuca arundinacea*, tabaco e trigo (Teixeira et al., 2006, Tang et al., 2006; Yoshimura et al., 2000; Ishikawa et al., 2005; Zavaleta-Mancera et al., 2007).

Em arroz, foi identificada uma família multigênica com oito genes que codificam isoformas de ascorbato peroxidases. Cada isoforma de APx tem uma resposta diferente a estresses ambientais, indicando uma especialização funcional de cada isoforma na remoção do peróxido de hidrogênio das células (Sharma e Dubey, 2005; Teixeira et al., 2006).

As APx de arroz estão localizadas em quatro diferentes compartimentos subcelulares, sendo 2 isoformas citosólicas (APx1 e APx2), 2 isoformas peroxissomais (APx3 e APx4), 1 isoforma mitocondrial (APx6), 2 isoformas cloroplásticas (APx7 e APx8) e 1 isoforma encontrada na mitocôndria e no cloroplasto (APx5) (Teixeira et al., 2004; Teixeira et al., 2006, Caverzan., 2014).

Plantas RNAi APx foram produzidas e estudadas por nosso grupo, apresentando resultados muito interessantes, como o caso do silenciamento individual de cada APx citosólica (cAPx) apresentar plantas com menor crescimento e estéreis, no entanto o silenciamento duplo de cAPx não produziu diferenças fenotípicas com a planta não transgênica, inclusive levou a maior tolerância a alumínio em baixas concentrações. (Rosa., 2010).

A identificação e caracterização de genes que codificam enzimas pertencentes ao metabolismo antioxidante é muito importante para entender o funcionamento deste sistema na detoxificação de ERO derivadas do metabolismo normal da célula ou geradas em resposta a estresses ambientais. Há estudos que mostram que plantas transgênicas superexpressando enzimas envolvidas na proteção oxidativa, como superóxido dismutases e ascorbato peroxidases, têm uma maior resistência quando crescidas em condições de estresse (Zhu, 2001). A superexpressão de uma APx em tabaco (*N. tabacum*) aumentou a proteção das plantas ao estresse oxidativo (Allen et al., 1997).

A superexpressão de uma SOD e APx em plantas de batata transgênicas aumentou a tolerância contra estresse oxidativo e altas temperaturas (Tang et al., 2006). Esses estudos indicam que as enzimas antioxidantes possuem grande importância fisiológica no combate ao estresse oxidativo sofrido pelas plantas, mostrando que plantas modificadas, superexpressando essas proteínas, apresentam uma resposta antioxidante mais eficiente às perturbações do meio ambiente.

Sendo assim, o estudo de enzimas do metabolismo antioxidante é de extremo interesse. Nosso grupo desenvolve uma linha de pesquisa que explora o genoma do arroz, visando uma análise evolutiva e funcional dos genes que codificam enzimas do metabolismo antioxidante em plantas, especialmente a ascorbato peroxidase. Foram identificados oito genes que codificam diferentes isoformas de APx em arroz e foi realizada uma caracterização prévia da família (Teixeira et al., 2004; Teixeira et al., 2006). Posteriormente, foram geradas plantas de arroz silenciadas para as isoformas citosólicas de APx (*OsAPx1* e *OsAPx2*) e constatou-se que o silenciamento combinado das duas isoformas citosólicas produziu plantas com fenótipo semelhante à planta não-transformada.

Entretanto, o silenciamento de uma única isoforma citosólica produziu plantas anãs e estéreis. Análises bioquímicas revelaram um maior acúmulo de peróxido de hidrogênio nas plantas transformadas e a modulação de outras enzimas do sistema antioxidante, como CAT e SOD (Rosa et al., 2010). As plantas APx1/2s também

apresentaram uma maior resistência quando submetidas a estresse de baixas concentrações de alumínio (Rosa et al., 2010).

O efeito do silenciamento do gene *OsAPx4* em plantas de arroz sobre a atividade de outras enzimas do sistema antioxidante foi analisado. Plantas APx4s, além de apresentarem redução da atividade de APx, também possuem menor atividade das enzimas CAT, SOD e menor acúmulo de peróxido de hidrogênio. Apresentam também uma senescência muito maior que as não transformadas, com baixa produção de sementes. Plantas APx3s apresentam grande dificuldade na sua obtenção, com baixa taxa de regeneração, morte muito adiantada e esterilidade, em um quadro mais grave que o das plantas APx4s (Ribeiro., 2012).

1.6 Modelo vegetal: arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à família Poaceae. É uma planta anual, com caule de 40 a 150 cm e panícula de tamanhos que variam de 9 a 30 cm, espiguetas oblongas, com ou sem aristas. Possui seis anteras, amarelas. É uma espécie comum, amplamente cultivada. Existem diversas variedades de arroz cultivadas que diferem principalmente por suas características agronômicas. Uma característica importante do arroz é que os grãos ficam retidos na espiguetas após a maturação, permitindo o uso de tecnologia na colheita (Davidse et al., 1994).

Para facilitar a classificação das fases de desenvolvimento do arroz, um sistema empregando critérios morfológicos foi desenvolvido por Counce et al. (2000). Neste sistema, o desenvolvimento ontogenético do arroz é dividido em três fases: plântula, fase vegetativa e fase reprodutiva. A fase de plântula é dividida em 4 estágios (S0 a S3), que se inicia na germinação e termina na emergência do coleótilo. Cada fase vegetativa é determinada pela formação do colar foliar para cada folha emitida. Esses estágios classificam-se em V0 até Vn, onde n é o número final de folhas com colares no caule principal.

A fase reprodutiva é constituída por dez estágios baseados em critérios morfológicos, sendo eles: iniciação da panícula (R0), diferenciação da panícula (R1), formação do colar da folha bandeira (R2), emissão da panícula (R3), antese (R4), expansão do grão em comprimento e largura (R5), profunda expansão dos grãos (R6), secagem do grão (R7), presença de um grão maduro (R8) e maturidade completa da panícula (R9). Os estágios de R0 a R3 referem-se ao desenvolvimento da panícula, enquanto os estágios de crescimento de R4 a R8 referem-se ao desenvolvimento individual de flores ou grãos em uma panícula. A Figura 4 apresenta os estágios do desenvolvimento reprodutivo do arroz de acordo com a classificação de Counce et al. (2000).

A flor do arroz desperta um grande interesse nas pesquisas, pois possui um fascinante modelo de desenvolvimento floral, que diverge dos modelos mais conhecidos de dicotiledôneas. A estrutura floral do arroz, a panícula, é uma inflorescência composta de unidades estruturais específicas de gramíneas, as espiguetas (Yoshida e Nagato, 2011). A espiguetas é a unidade primária da inflorescência, formada pelas glumas e a flor (em inglês “*floret*”). A flor é composta pelo lema e pálea (órgãos específicos de gramíneas), lodículos, estames e carpelos. Entre as gramíneas, o número de flores em cada espiguetas varia entre as espécies. Entretanto, no arroz, cada espiguetas possui uma única flor fértil, com um par de lemas estéreis e glumas rudimentares (Yoshida e Nagato, 2011). O desenvolvimento floral é comandado pelos meristemas, sendo que em arroz o meristema inicial é o meristema da inflorescência, seguindo com o desenvolvimento do meristema de ramos, meristema de espiguetas e, por fim, o meristema floral. A Figura 5 apresenta a estrutura da espiguetas do arroz.

A partir do meristema da inflorescência, uma série de modificações ocorrem espaço-temporalmente coordenadas, levando à transição entre os diferentes meristemas e determinando assim a forma da panícula do arroz (Yoshida e Nagato, 2011).

Além de sua enorme importância econômica, o arroz também se destaca no campo das pesquisas de genética e genômica funcional. É considerada a planta

modelo para estudos em monocotiledôneas, pois possui o menor genoma entre as monocotiledôneas cultivadas, de aproximadamente 390 mega bases (Mb). Em 2002, foi publicado o sequenciamento completo do genoma do arroz (Yu et al., 2002; Goff et al. 2002), o que gerou uma grande quantidade de informações genômicas disponíveis para a comunidade científica e permitiu avanços nos estudos de genômica, transcriptoma, proteômica, metabolômica e melhoramento de cereais.

Além de ser uma espécie com genoma sequenciado e anotado, o arroz possui um protocolo de transformação genética eficiente e uma alta sintenia entre as gramíneas, fazendo desta planta um modelo para estudos em monocotiledôneas (Hiei et al., 1994; Moore et al., 1995).

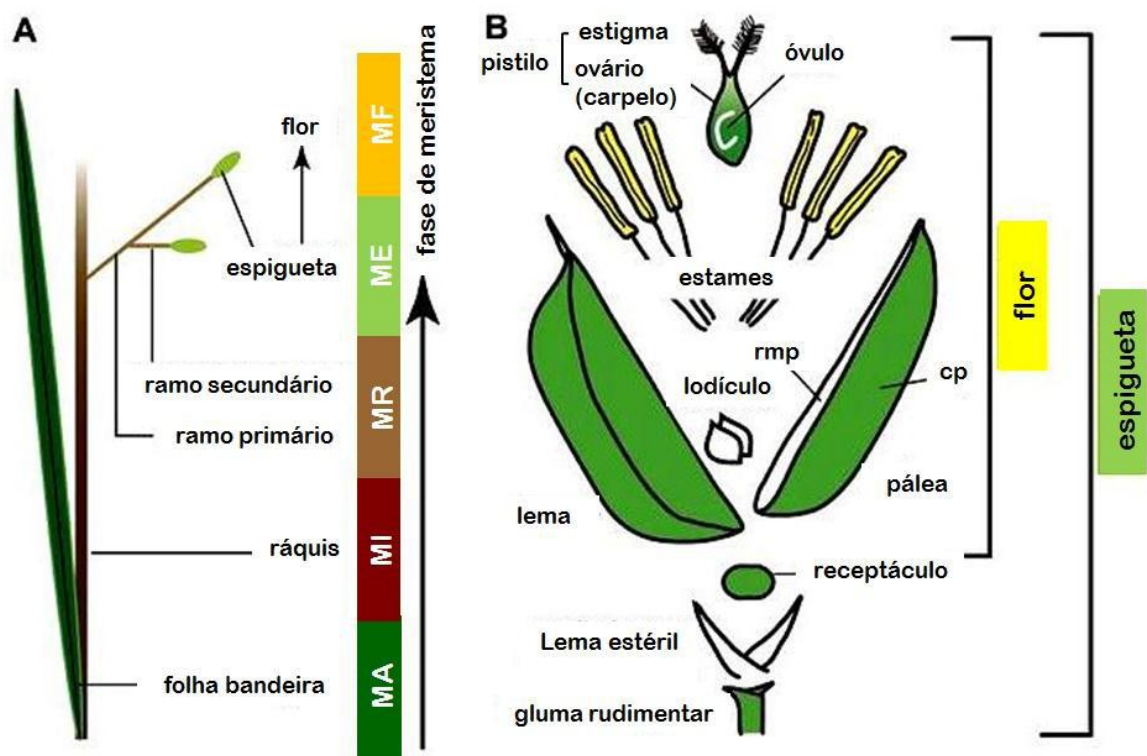


Figura 4. Representações esquemáticas da estrutura da inflorescência do arroz (A) e espigeta (B). MA, meristema apical; MI, meristema de inflorescência; MR, meristema de ramos; ME, meristema de espigeta; MF, meristema floral; rmp, região marginal da pálea; cp, corpo da pálea (modificado de Yoshida e Nagato, 2011)

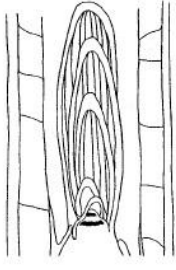

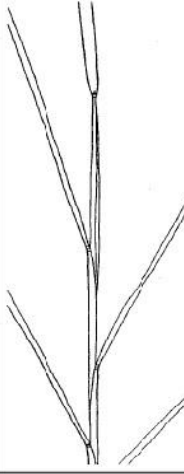

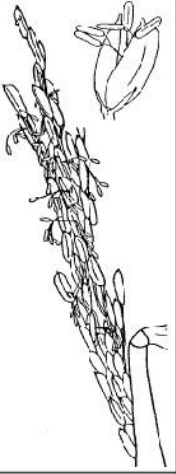


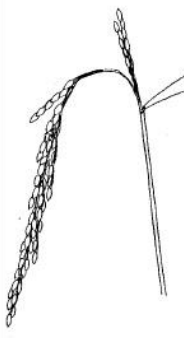
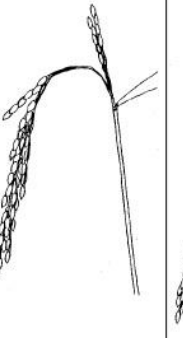
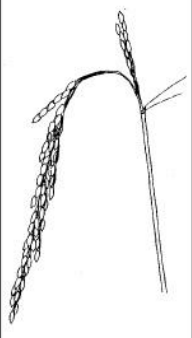
Estágio de crescimento	R0	R1	R2	R3	R4
Marcador morfológico	Início do desenvolvimento da panícula	Formação dos ramos da panícula	Formação do colar da folha bandeira	Emissão da panícula, ponta da panícula está acima da folha bandeira	Uma ou mais flores iniciam a antese
Ilustração					
Estágio de crescimento	R5	R6	R7	R8	R9
Marcador morfológico	No mínimo uma cariópsis da panícula está alongando para o final da casca	No mínimo uma cariópsis da panícula está alongada para o final da casca	No mínimo um grão da panícula tem a casca amarela	No mínimo um grão da panícula tem a casca marrom	Todos os grãos da fase R6 têm a casca marrom
Ilustração					

Figura 5. Estágios do crescimento reprodutivo do arroz baseados em marcadores morfológicos (modificado de Counce et al., 2000).

De acordo com o “Rice Genome Annotation Project” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), cerca de 49 mil genes foram identificados e depositados nos bancos de dados de arroz. Atualmente, têm-se uma grande quantidade de dados sobre transcritos de arroz, em relação a diferentes fases do desenvolvimento, tecidos da planta, respostas a estresses bióticos e abióticos, vias de co-expressão, entre outras. A identificação e caracterização de transcritos possibilitaram a descoberta de novos genes, alguns de importância agrônômica.

1.7 Estudo de promotores

O estudo de promotores é uma ferramenta de grande importância que nos possibilita analisar o padrão de expressão de genes em plantas, e assim melhor compreender sua regulação em um nível tecidual, em uma análise mais fina. Resultados anteriores permitiram uma caracterização da expressão destes genes em plantas de arroz, de maneira temporal e tecidual. Essa caracterização foi muito importante para identificar o padrão de expressão dos genes das enzimas de defesa antioxidante. Plantas de arroz foram transformadas com a sequência promotora do gene *OsAPx3* fusionada ao gene repórter *Gus* (PROMAPx3::GUS). A partir da construção PROMAPx3::GUS gerou-se oito linhagens de plantas transformadas, adultas e que já produziram sementes.

Estudos de expressão de promotores já foram realizados para o gene que codifica a isoforma APx2 de arroz, onde a sequência promotora do gene *OsAPx2* mostrou regular a expressão da proteína repórter *Gfp* de maneira constitutiva, com altos níveis de expressão em tecidos vegetativos e reprodutivos, sendo considerado um promotor constitutivo potencial para a transformação de plantas de arroz (Park et al., 2010). A expressão da sequência promotora do gene *OsAPx4* também já foi caracterizada e apresentou expressão em tecidos de folhas, raízes e panículas.

O estudo da região regulatória do gene APX3 é uma ferramenta importante para elucidar em detalhes sua resposta a diferentes estímulos abióticos espaço e temporalmente. O presente estudo foi realizado durante meu estágio de trabalho de conclusão de curso no Núcleo de Genômica Funcional de plantas, coordenado pela Professora Márcia Pinheiro-Margis. Este projeto visa caracterizar o promotor do gene de arroz que codifica uma isoforma peroxissomal APx

2 Objetivos

Este projeto teve como objetivo analisar o padrão de expressão do gene *OsAPX3*, que codifica a enzima ascorbato peroxidase peroxissomal em plantas de arroz.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Identificar *cis*-elementos na região promotora do gene de *OsAPX3*;
- b) Regenerar plantas de arroz transformadas com a construção PROMAPx3::*GUS*, a qual permite a expressão do gene repórter *Gus* sob o controle do promotor do gene *OSAPX3*;
- c) Analisar o padrão de expressão dirigido pela região promotora deste gene através de ensaios histoquímicos de *GUS*;
- d) Quantificar a expressão do gene *Gus* através de ensaios fluorimétricos;

3. Material e Métodos

3.1 Construção do vetor para estudo do promotor de *OsAPx3*

Para verificar o padrão de expressão da região promotora do gene *OsAPx3* (LOC_Os04g14680) foi isolada uma sequência (em anexo) de aproximadamente 2 kb anterior ao sítio de iniciação da tradução (*primers*: PromAPx3F: 5' CACC TTGGATTTCTGCTGTTTTGC ; PromAPx3R: 5' CGATCCGAGGAGAGGTGATA). Esse fragmento foi clonado no vetor de entrada pENTR e posteriormente recombinada no vetor pHGWFS7 (figura 1, em anexo), especificamente usado para estudo de promotores (Karimi et al., 2005). Esse vetor possui dois genes repórteres, *gus* e *gfp* e o gene de seleção *hpt*, que confere resistência à higromicina (Figura 6). A clonagem dos insertos foi realizada utilizando células de *Escherichia coli* termocompetentes da cepa TOP10. Foram adicionados à bactéria 1,5 µL do produto da recombinação e o choque térmico ocorreu com 42 °C por 90 s em gelo. Após a transformação, 500 µl de meio LB (Invitrogen®) foram adicionados à bactéria e a suspensão foi incubada por 45 min a 37 °C. Posteriormente, essa suspensão bacteriana foi semeada em meio LB ágar (Invitrogen®) suplementado com 100 µg/mL de espectinomicina. A inserção correta das sequências promotoras nos vetores foi confirmada por sequenciamento.

3.2 Transformação de calos embriogênicos de arroz por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de calos de arroz foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* seguindo o protocolo de Upadhyaya et al. (2000). Calos embriogênicos de arroz foram selecionados e repicados em meio de cultura NB para proliferação. Células de *A. tumefaciens* contendo o vetor foram cultivadas em meio LB Agar (Invitrogen®) contendo canamicina (25 µg/mL) e rifampicina (100 µg/mL) e cultivadas por um período de dois dias a 28 °C. As agrobactérias cultivadas foram transferidas para meio NB líquido suplementado com 100 µM de acetoseringona e, posteriormente, os calos foram adicionados a este meio, sendo incubados durante 30 min a temperatura ambiente. Os calos foram transferidos para placas contendo meio NBA (suplementado com 100 µM acetoseringona) e mantidos por três dias a 28 °C no escuro. Após o co-cultivo, os calos passaram por cinco lavagens de 10 min com água destilada estéril contendo timentina (150 µM), sendo posteriormente

transferidos para meio de seleção HTC contendo higromicina (50 µg/mL), timentina (100 µg/mL) e cefotaxima (200 µg/mL) (para seleção dos calos transformados e eliminação das bactérias restantes) e mantidos no escuro por 30 dias a 28 °C. Os calos não-transformados não cresceram no meio de seleção e foram eliminados. Os calos transformados cresceram neste meio e foram repicados para novo meio HTC para proliferação.

Após a fase de seleção, os calos foram transferidos para o meio de pré-regeneração por 10 dias a 28 °C no escuro e depois transferidos para o meio de regeneração, onde foram mantidos a 28 °C com fotoperíodo de 16 h até a regeneração de parte aérea e raiz. Plântulas regeneradas foram transferidas para meio ½ MS (Murashige e Skoog, 1962), com metade da concentração de sais, acrescido de higromicina (50 µg/mL). As plantas transformadas foram transferidas para substrato vermiculita, inicialmente protegidas por saco plástico para aclimatação, sendo este removido aos poucos em duas semanas. Após a aclimatação as plantas foram transferidas para vasos com terra, submergidas em água, e colocadas em casa de vegetação a 28 °C com fotoperíodo de 12 h. O processo de transformação genética de plantas de arroz é mostrado na Figura 7.

Utilizando o mesmo procedimento metodológico de regeneração, foram obtidas plantas controles, não-transformadas, derivadas dos calos iniciais, e regeneradas via cultura de tecidos, porém sem terem sofrido transformação. A regeneração das plantas não-transformadas ocorreu simultaneamente com a regeneração das plantas transformadas.

3.3 Ensaio histoquímico de GUS

O vetor contendo a sequência promotora do gene *OsAPx3* foi utilizado para a transformação de plantas de arroz. O vetor foi denominado de PromAPx3, para o estudo da sequência promotora do gene *OsAPx3*. Após a regeneração das plantas transformadas, segmentos de folhas, raízes, caules e panículas foram coletados e analisados por ensaios histoquímicos com *X-Gluc* (Fermentas®), substrato da enzima β-glucuronidase codificada pelo gene *Gus*, de acordo com Jefferson et al.

(1987), com algumas modificações. Segmentos inteiros foram incubados em uma solução contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β -D-glucoronídeo (*X-gluc*) 1 mM e tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), na presença de 2 mM de ferricianeto de potássio e 0,5% de Triton X100. As amostras foram então incubadas por um período de 16 horas a 37 °C. Após o desenvolvimento da reação, os tecidos verdes foram incubados com etanol 70% para remoção da clorofila.

3.4 Extração de DNA das plantas de arroz

A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo PureGene desenvolvido por N.M. Upadhyaya (CSIRO Plant Industry). O DNA de plantas transformadas e não transformadas foram isolados através de maceração das folhas de arroz em nitrogênio líquido e posterior homogeneização do tecido. Ao material macerado foram adicionados 600 μ L de solução de lise de células (TE – Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8.0 – com 1% SDS). A mistura foi incubada por 1 h a 65 °C e centrifugada por 3 min a 13000 x g.

O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foi adicionado 200 μ L de solução de precipitação de proteínas (Acetato de amônio 6 M). A seguir, a mistura foi agitada no vortex por 20 segundos. Após centrifugação por 5 min a 13000 x g, 600 μ L do sobrenadante foi transferido para novo tubo. A precipitação do DNA foi realizada adicionando 600 μ L de isopropanol, seguido de 50 inversões para homogeneização e incubação em freezer por 30 min. O sobrenadante resultante da centrifugação por 20 min a 13000 x g foi descartado e 350 μ L de etanol 70 % foram adicionados ao tubo de microcentrífuga para lavagem do DNA. Após centrifugação por 5 min a 13000 g e descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco a 37 °C. O DNA extraído foi ressuspenso em 40 μ L de água ultra pura estéril.

3.5 Seleção das plantas transformadas

As plantas regeneradas, cultivadas em vermiculita, foram analisadas por PCR para determinar se houve integração do transgene no genoma do arroz. A reação de amplificação foi realizada utilizando 20 ng do DNA isolado das folhas de plantas não-transformadas e transformadas como molde, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen®), tampão de PCR 1 X (20 mM Tris-HCl pH 8.4), 1,5 mM MgCl₂, 8 pmol de cada *primer* e 0,25 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen®) em uma reação de 25 µL. Foram utilizados *primers* para amplificação dos genes *Hpt* (*Hpt1*: 5'GAGCCTGACCTATTGCATCTCC; *Hpt2*: 5' GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG) e *Gus* (*Gus1*: 5' CATGAAGATGCGGACTTACG; *Gus2*: 5'ATCCACGCCGTATTCCGG). O programa utilizado no termociclador foi [1x] 94 °C 1 min, [30x] 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, e [1x] 72 °C 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1 % com brometo.

3.6 Identificação dos cis-elementos

Análise *in silico*: para a análise *in silico* de cis-elementos na região promotora de *OsAPx3* foram utilizadas as seguintes bases de dados disponíveis on-line:

- PlantPan (plantpan.mbc.nctu.edu.tw/)
- Plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

3.7 Quantificação da expressão de *Gus* por ensaio fluorimétrico

A extração de proteínas foi realizada em amostras das folhas na fase reprodutiva (folhas-bandeira), que foram maceradas em nitrogênio líquido e a seguir foi acrescido o tampão de extração protéico (10% tampão fosfato, 0,1% SLS e 10

mM β -mercaptoetanol), o macerado foi centrifugado (por 20 min a 17.500 x g a 4 °C) e o sobrenadante foi recolhido para a análise enzimática. Foi realizada a medição da atividade de *GUS* em fluorímetro pela leitura da produção de MU após reagir com o substrato MUG (presente no tampão de reação: tampão de extração com 1 mM de MUG). As reações ocorreram em um tubo contendo 150 μ L do tampão de reação e 50 μ L da solução protéica a 37 °C, sendo retiradas alíquotas de 10 μ L em triplicata técnica e adicionadas a 190 μ L do tampão de parada (0,2 M de Na_2CO_3), prosseguindo para a leitura. As amostras foram mensuradas em placa de fundo plano não opaca, com leitura da fluorescência em 460 nm e 590 nm. As leituras ocorreram nos tempos 0, 30 minutos, 1 hora e 2 horas de reação. Foram produzidas também as curvas padrão de proteínas com diluições seriadas segundo o método de quantificação de proteínas Bradford, a fim de quantificar a concentração protéica das amostras (absorbância em 595 nm) e outra curva padrão de MU, para correta mensuração das amostras.

Ao final foi feito o cálculo de nM de MU produzidos durante a reação para cada linhagem, padronizando-se a quantidade de proteínas, em função do tempo de reação.

3.8 Experimento de déficit hídrico

Plantas das linhagens testadas no experimento de quantificação da expressão de *Gus* por ensaio fluorimétrico tiveram seus vasos retirados das bacias de água em que estavam por 16 horas. Amostras de tecidos foram recolhidas após este período, e incubadas em *X-Gluc* segundo o protocolo anteriormente descrito.

4. Resultados e Discussões

As análises *in silico* foram realizadas buscando *cis*-elementos já descritos na literatura a partir da sequência do promotor (em anexo), utilizando os programas PlantPan e Plantcare, que realizaram o pareamento de bases na sequência do promotor para encontrar estes *cis*-elementos para plantas de arroz. Utilizando essa estratégia, foi possível identificar os *cis*-elementos que são relacionados com a ativação da expressão gênica quando a célula é exposta a luz, anaerobiose, ao hormônio giberelina ou na deficiência de açúcar na célula (Figura 8).

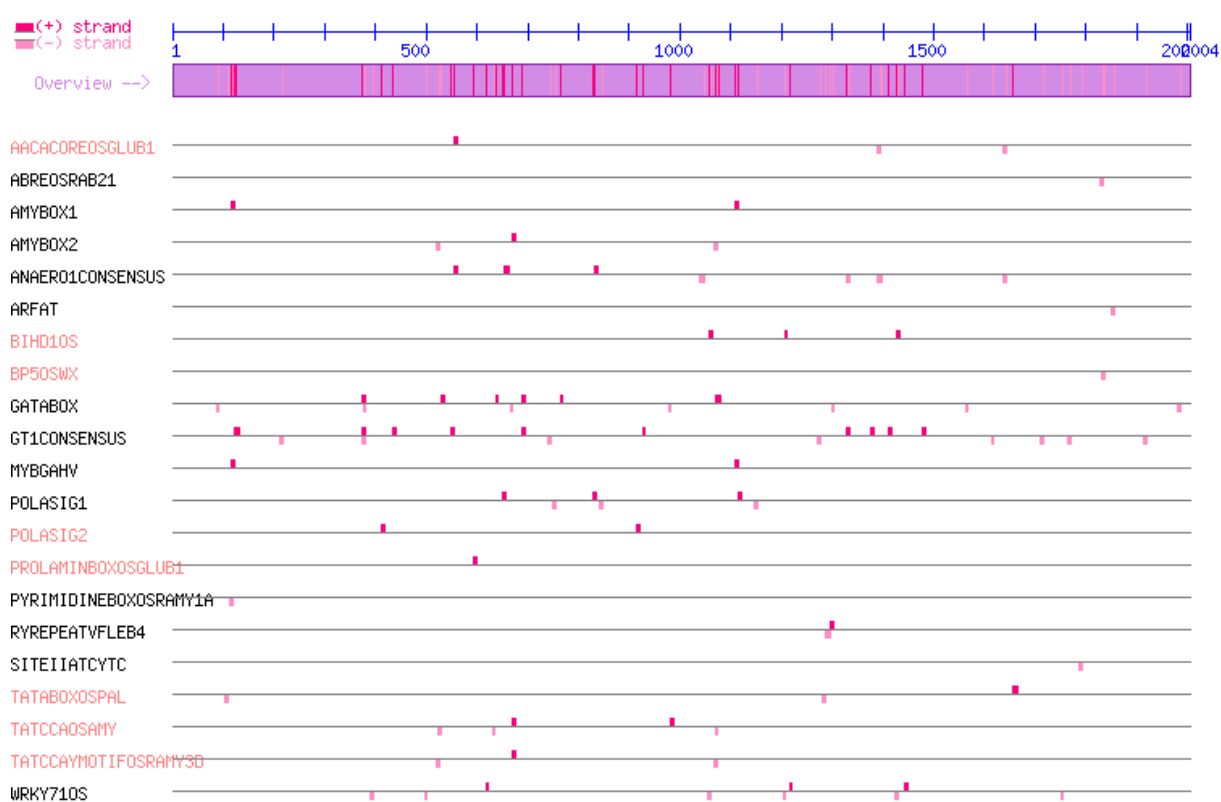


Figura 8 Cis-elementos preditos segundo PlantPan presentes na sequência do promotor de *OsAPx3*. AACACOREOSGLUB1 (indicador de ativação na semente e endosperma); ABREOSRAB21 (elemento de resposta a ABA); AMYBOX1, AMYBOX2 e PROLAMINBOXOSGLUB1 (indicador de ativação na semente); ANAERO1CONSENSUS (*cis*-elemento para anaerobiose); ARFAT (elemento de resposta a auxina); BIHD10S (resposta de resistência a doenças); BP5OSWX (âncora de proteínas MYC); GATABOX e GT1CONSENSUS (resposta a alta-luz, indica expressão nas folhas e meristema apical); MYBGHV (resposta a giberelina); PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A (ativador em situação de falta de açúcar, indica expressão em embrião e semente); RYREPEATVFLEB4 (resposta a ABA e giberelina, prováveis tecidos com expressão seriam embrião e semente); SITEIIATCYTC (indicador de gene envolvido na maquinaria de fosforilação oxidativa, possível expressão no meristema); TATCCAOSAMY, TATCCAYMOTIFOSRAMY3D e WRKY710S (resposta a giberelina e a falta de açúcar)

O programa PlantPan também identificou elementos que dirigem a expressão tecido específica, tais como: semente, folhas e meristema apical. Baseado neste resultado, é possível esperar a expressão do *Gus* dirigido pelo promotor de *OsAPx3* em tecidos que sofram a ação do fitohormônio giberelina, como sementes e meristema apical. A proteína APx3 tem destino final o peroxissomo, que participa da fotorespiração celular, e isso corrobora a luz e a anaerobiose como indutores de *cis*-elementos, e as folhas e meristema apical como tecidos com expressão ativada.

Os experimentos de transformação genética resultaram na obtenção de 8 linhagens transgênicas (figura 9). Após a etapa de aclimatação, seis linhagens atingiram a fase madura com produção normal de sementes. Não foram encontradas diferenças de fenótipo comparando-se as plantas não-transformadas e as plantas contendo o vetor de interesse, mostrando que a fusão PROMAPx3::GUS não alterou o desenvolvimento da planta.

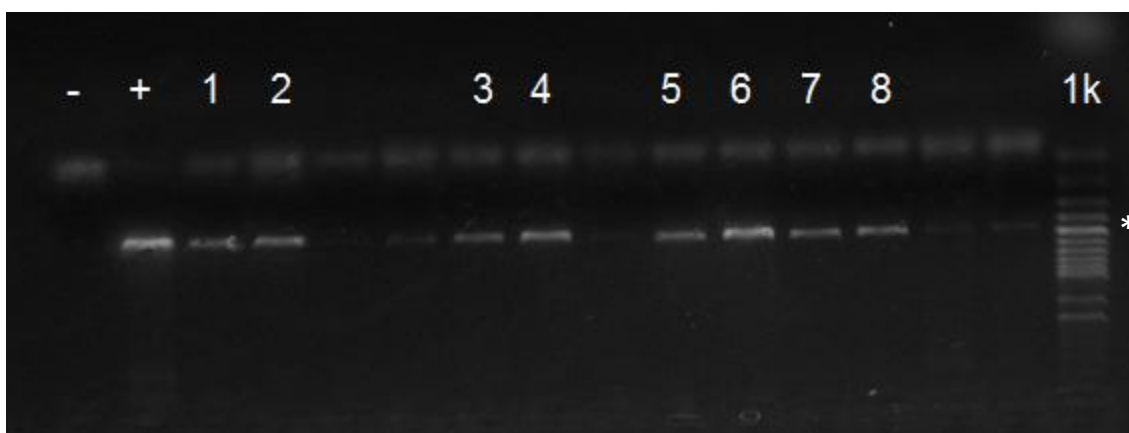


Figura 9: confirmação de transgenia das linhagens de arroz PromAPx3 por PCR. Gel de agarose 1% mostrando amplificação por PCR do gene Higromicina fosfotransferase (*Hpt*).

:* Banda 2kb (1kb DNA Ladder Biolabs)Os números correspondem as linhagens aprovadas, posteriormente renomeadas com letras.

+ Corresponde ao controle positivo, vetor pHGWFS7 vazio

- Corresponde ao controle negativo, planta não transformada

As análises histoquímicas de GUS mostraram que três entre as linhagens obtidas apresentaram um padrão reproduzível de expressão (linhagens PromAPx3A, PromAPx3I e PromAPx3T), as marcações nos ensaios histoquímicos de GUS apresentaram o seguinte padrão: folhas-bandeiras durante todas as fases

reprodutivas, com o ápice de intensidade nas fases R4 e R5, com marcação nas anteras de modo moderado nestas duas fases (figura 10), momento em que ocorre a antese (fase R4) e o começo do enchimento do grão (fase R5) (Counce et al., 2000). Não foram detectadas marcações nas raízes, ou outros tecidos, de maneira consistente. Apesar de apresentarem o mesmo padrão, foi verificada diferença na intensidade das marcações. A linhagem PromAPx3T apresentou a maior intensidade nas marcações, enquanto a linhagem PromAPx3A teve a menor intensidade. Essa diferença da intensidade de expressão pode ser explicada pelo efeito da posição da inserção do cassete do promotor fusionado a *Gus* e *Gfp* (fusão PROMAPx3::GUS) no genoma da planta. Além disso, o nível de expressão pode depender do número de cópias inseridas e que estejam plenamente funcionais. As diferenças de intensidade de marcação entre as linhagens não invalidam os resultados obtidos, indicando que o padrão percebido é o mais próximo do real. Além disso, o padrão de marcação nos órgãos observados também foi verificado em bancos de dados que agrupam dados de microarranjos (figuras 11 e 12)

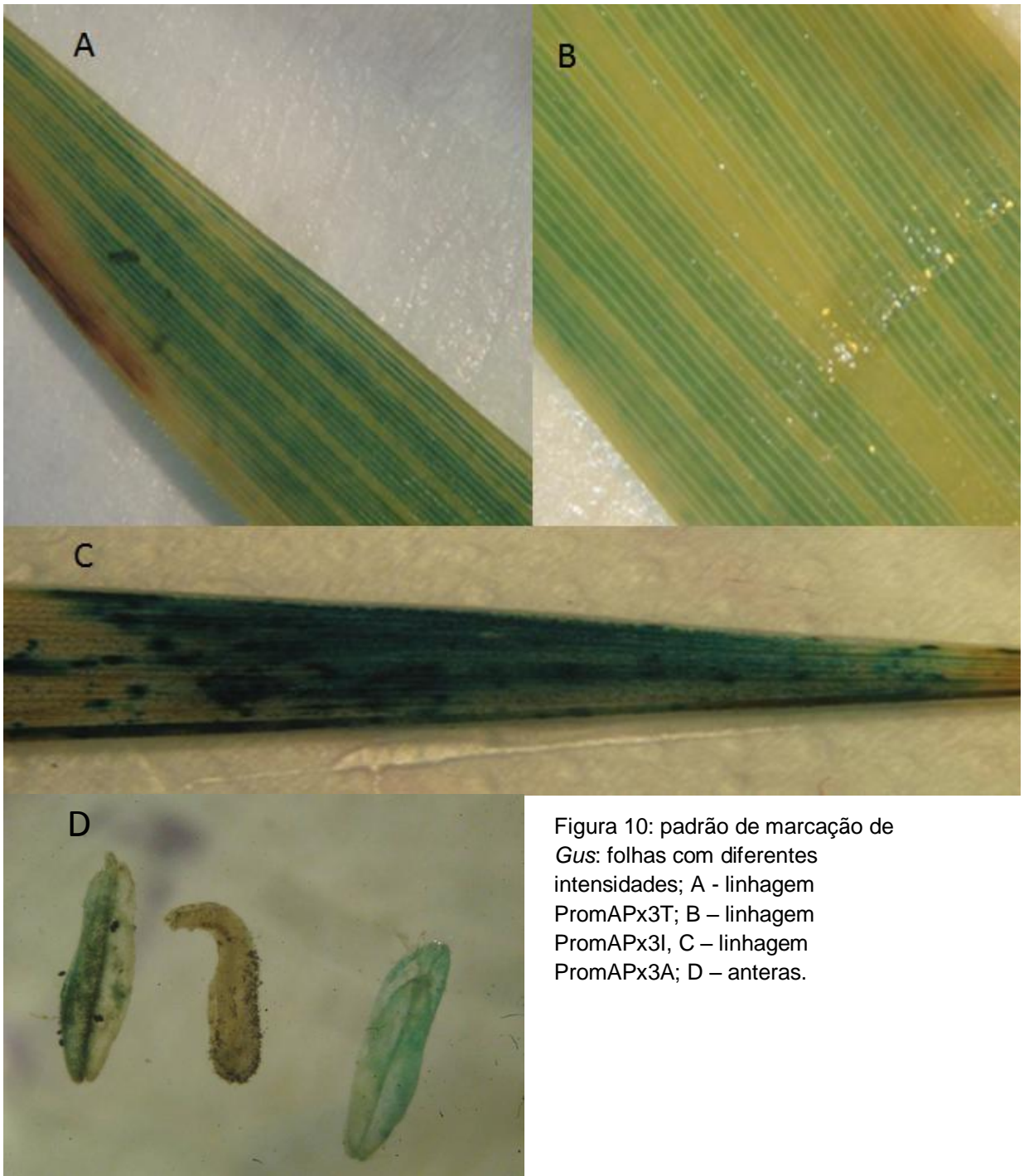
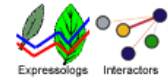
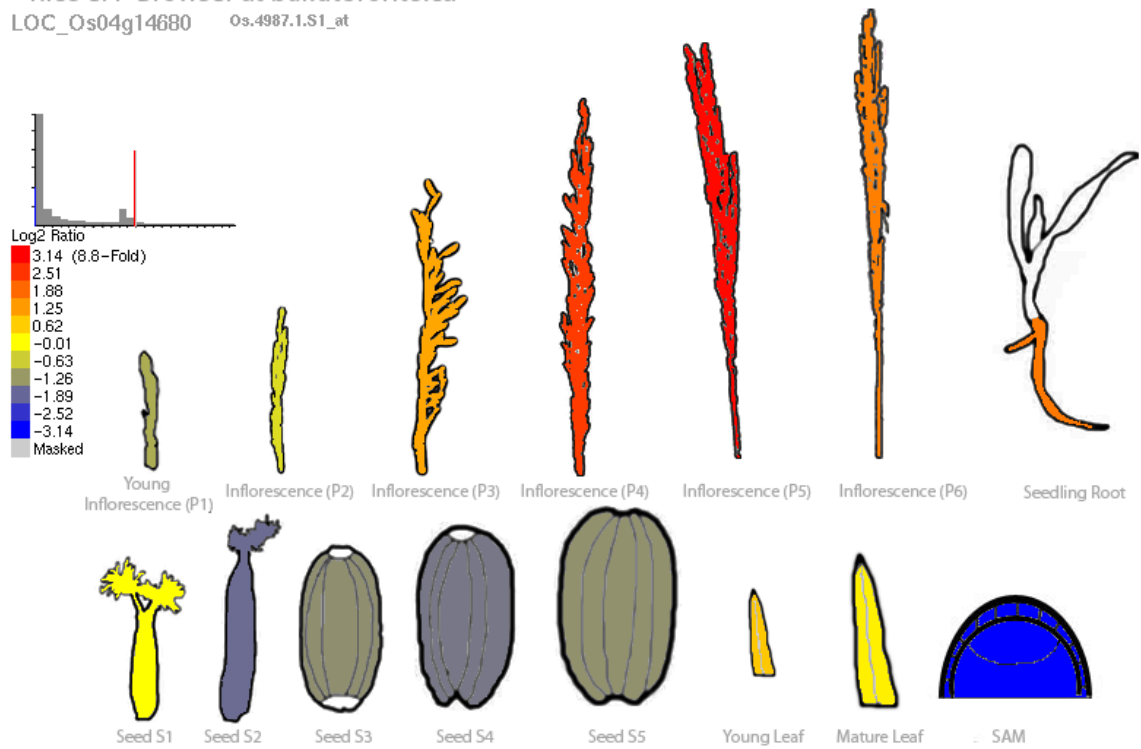


Figura 10: padrão de marcação de *Gus*: folhas com diferentes intensidades; A - linhagem PromAPx3T; B - linhagem PromAPx3I, C - linhagem PromAPx3A; D - anteras.



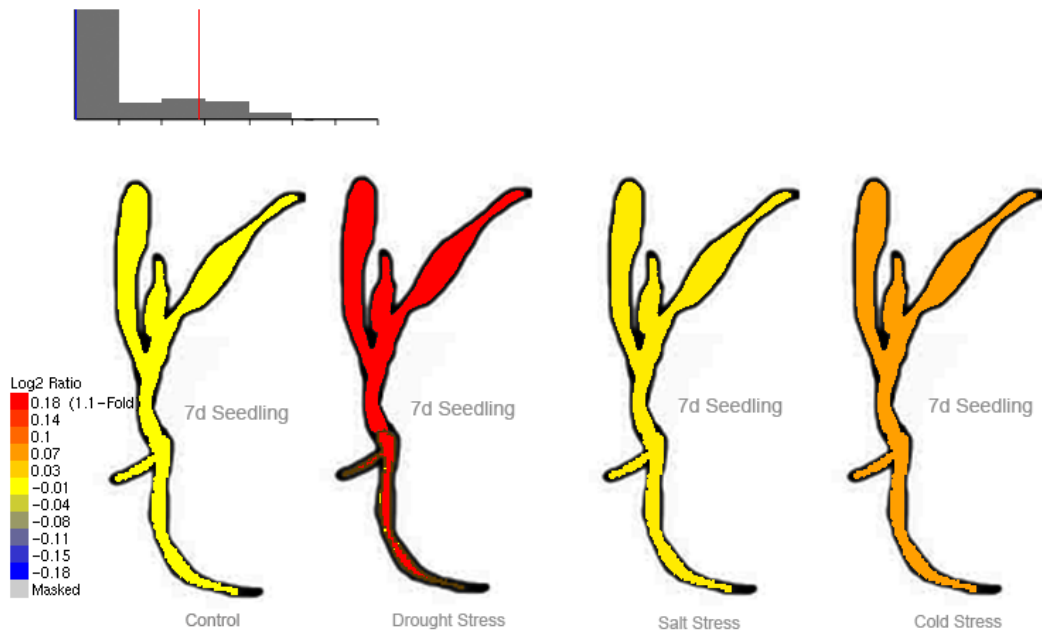
Rice eFP Browser at bar.utoronto.ca
LOC_Os04g14680 Os.4987.1.S1_at



eFP by R. Patel. Drawings by R. Patel adapted from images provided by Dr. D. Brar at IRRI as well as images contained within F-Box Proteins in Rice. Genome-wide Analysis, Classification, Temporal, and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress: Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P et al. Plant Physiol 2007 Apr;143(4):1467-83. Data is derived from the same paper, and normalized by MAS 5.0 and RMA methods. TGT value of 100 was used and all tissues were sampled in triplicate.

Figura 11: Padrão de expressão do gene *OsAPX3* segundo o Rice eFP browser. Resultado dos dados de microarranjo de arroz utilizando sonda única para o gene *OsAPx3*. O máximo da expressão ocorre na fase R4/R5, que nesta representação é demonstrado pela panícula na fase P5.

Rice eFP Browser at bar.utoronto.ca
LOC_Os04g14680 Os.4987.1.S1_at



eFP by R. Patel. Drawings by R. Patel adapted from images provided by Dr. D. Brar at IRRI as well as images contained within F-Box Proteins in Rice. Genome-wide Analysis, Classification, Temporal, and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress: Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P et al. Plant Physiol 2007 Apr;143(4):1467-83. Data is derived from the same paper, and normalized by MAS 5.0 and RMA methods. TGT value of 100 was used and all tissues were sampled in triplicate.

Figura 12: Padrão de expressão do gene *OsAPX3* segundo o Rice eFP browser. Resultado dos dados de microarranjo de arroz utilizando sonda única para o gene *OsAPx3*, demonstrando o aumento de expressão em resposta a seca, em plântulas de sete dias.

A análise do padrão de expressão de *Gus* nas folhas-bandeira medido pelo método fluorimétrico (figura 13) confirmou a atividade enzimática de *Gus* e demonstrou a mesma diferença entre as intensidades das marcações, mostrando a funcionalidade de nossa construção e confirmando os resultados encontrados anteriormente com os ensaios histoquímicos.

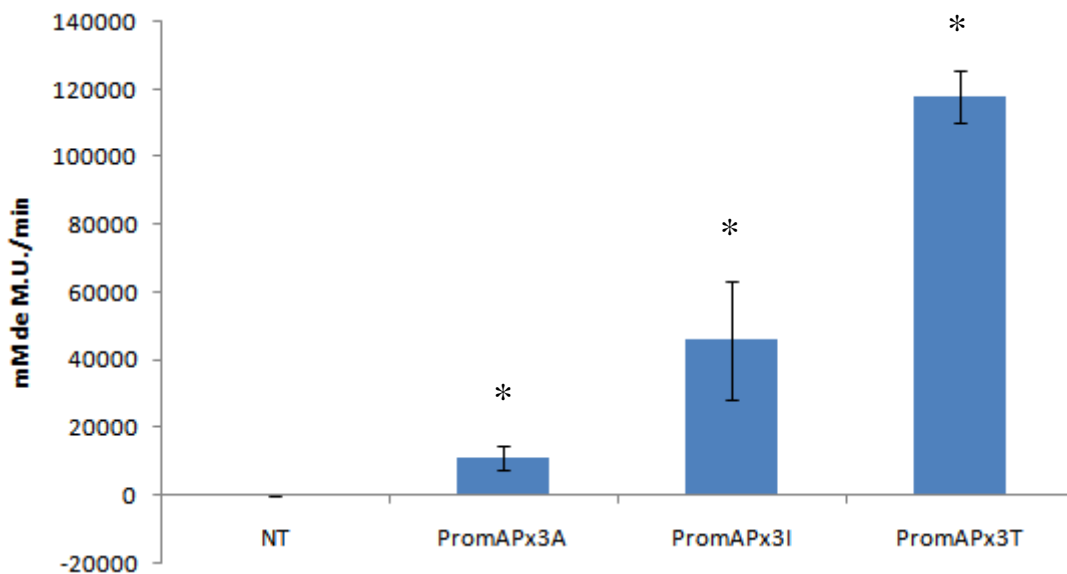


Figura 13: Ensaio fluorimétrico para medição da atividade de *Gus* nas folhas bandeira das linhagens PromAPx3A, PromAPx3I e PromAPx3T

Buscas que foram realizadas em banco de dados de microarranjos (Rice eFP Browser) forneceram informações que sustentam os resultados provenientes dos ensaios histoquímicos de GUS: a expressão de *OsAPx3* nos microarranjos de panículas com ápice na fase R4 confirma a marcação de GUS nas anteras (figura 11). Outro dado visualizado nesta busca mostra que o gene *OsAPx3* é expresso em condições de seca em plântulas de 7 dias (figura 12), e esta informação nos levou a estudar o padrão de expressão em plantas submetidas à seca. O experimento de seca por 16 horas induziu uma diminuição da marcação de GUS nas folhas-bandeira, o que demonstra uma diferença na regulação da expressão de *OsAPx3* na fase vegetativa e fase reprodutiva em resposta a seca. Entretanto, essa diferença de resultados pode sinalizar que há elementos que são capazes de interferir na expressão de *OsAPx3* que estão muito antes do códon inicial de tradução, acima dos 2 kb utilizados para este estudo. Por outro lado, este tratamento de seca por 16 horas resultou em um forte aumento da expressão nas anteras (fase R4/R5) (figura 14), indicando que a função da APx3 está altamente relacionada com a reprodução, assim como o gene APx4, que quando silenciado resultou em um fenótipo caracterizado pelo atraso no desenvolvimento da panícula (Ribeiro, 2012).

Apesar de várias isoformas de APx peroxissomais já terem sido descritas em diferentes plantas, pouco se sabe sobre as funções desses genes, e suas funções são preditas baseadas na função do peroxissomo (Yamaguchi et al., 1995; Bunkelman and Trelease, 1996; Ishikawa et al. 1998; del Rio et al., 2002). O peroxissomo é um dos maiores sítios de produção de peróxido de hidrogênio nas células vegetais devido à fotorespiração (Corpas et al. 2001; del Rio et al., 2002). A fotorespiração é um processo que envolve três organelas: peroxissomo, mitocôndria e cloroplasto e tem maior atividade em situações em que a planta esteja sofrendo algum tipo de estresse. Sendo as APxs peroxissomais induzidas em situações de estresse, sugere-se que quando ocorre um maior acúmulo de peróxido de hidrogênio, estas enzimas atuam em colaboração com as catalases para mais rapidamente detoxificar o peróxido de hidrogênio nessa organela (Narendra et al., 2006).

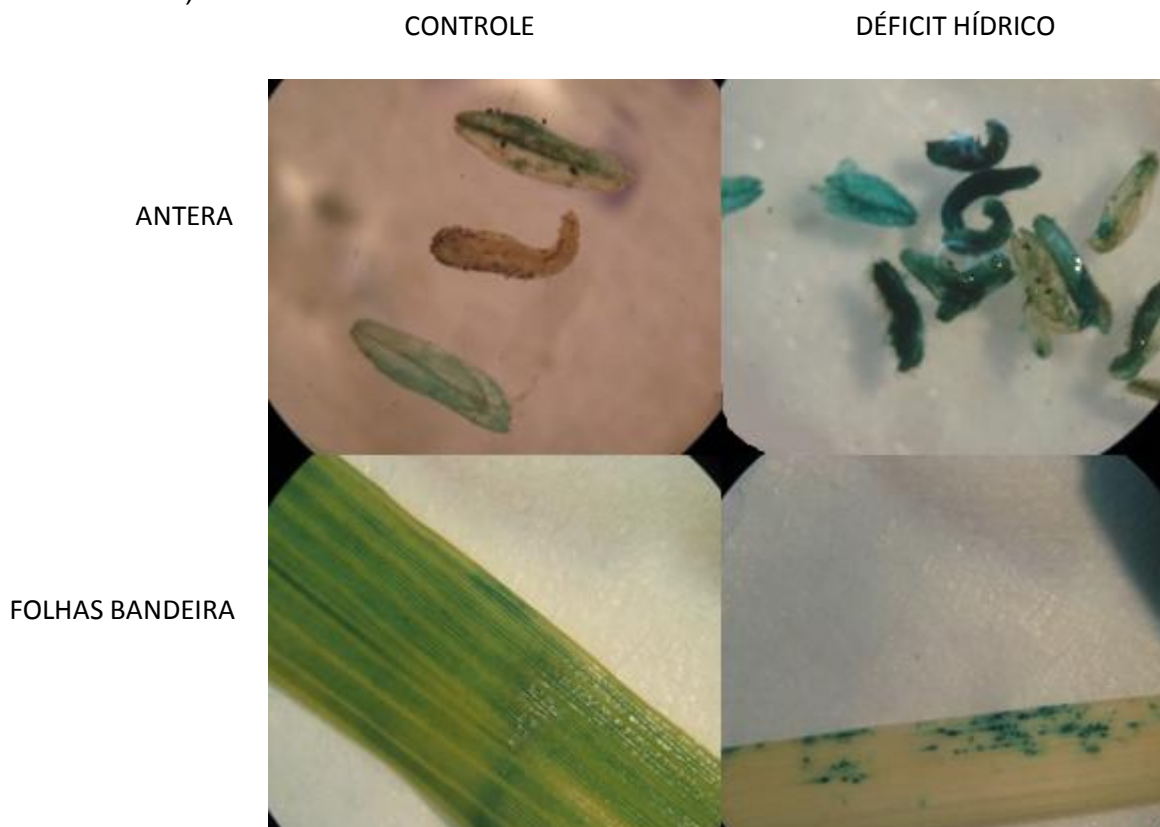


Figura 14: Comparação entre amostras em diferentes condições. Na coluna da esquerda temos amostras de antera e folha em condições padrão, e na coluna da direita temos amostras dos mesmos órgãos após passar por seca de 16 horas. Podemos verificar que há intensificação da marcação na antera após a seca, enquanto que nas folhas há redução da marcação

Os resultados apresentados levantaram algumas questões. A resposta da planta transgênica ao estresse produzido pela seca de 16 horas, reduzindo a expressão do gene, poderia sugerir que o silenciamento do gene favoreceria a tolerância a seca? Por outro lado, ainda que potencialmente benéfico do ponto de vista da resposta ao estresse, o silenciamento deste gene em arroz levou à senescência prematura e à redução da fertilidade da planta em condição controle (Ribeiro, 2012). Quando a isoforma peroxissomal APx3 de *Arabidopsis thaliana* foi silenciada, as plantas não apresentaram nenhuma deficiência no crescimento ou desenvolvimento (Narendra et al., 2006), mas a superexpressão desta isoforma resultou em uma maior produção de sementes sob estresse de seca e maior tolerância destas plantas a estresse por 3-AT (inibidor de catalase) (Yan et al., 2003). A superexpressão de APxs gerou plantas mais resistentes aos estresses (Rossel et al., 2006; Lu et al., 2007). Esses resultados mostram a complexidade do sistema antioxidante. Essa mudança no padrão de expressão observado no teste de seca demonstra que a APx3 está relacionada com a resposta de plantas de arroz ao déficit hídrico. Durante o estresse de seca há o aumento da produção de peróxido de hidrogênio (Gill e Tuteja, 2010), que nas células-guarda causam a liberação de cálcio no citosol, e com isso o fechamento do estômato, diminuindo a transpiração, e também a fixação de carbono (Jaleel et al., 2009a). Parte deste peróxido extra poderia ser proveniente da diminuição da detoxificação de peróxido no peroxissomo, pela repressão das APxs peroxissomais, enquanto que a super expressão de OsAPx3 nas anteras pode ser a via de principal de detoxificação neste tecido, uma vez que a OsAPx4 também tem alta expressão nas anteras e não há aumento da expressão das APxs citosólicas, ao contrário do que ocorre nas folhas em resposta a seca, em que as APxs citosólicas têm aumento da expressão. Assim, esses resultados aparentemente contraditórios, podem indicar que o padrão complexo de expressão desses genes reflete a dualidade da função desempenhada pelo peróxido de hidrogênio como uma molécula sinalizadora e ao mesmo tempo tóxica para a célula.

5. Conclusões e Perspectivas

Os resultados obtidos com as plantas PromAPx3, relacionados com o padrão de expressão do gene, foram compatíveis com os dados provenientes do banco de dados de microarranjos, com a presença de cis-elementos que indicam expressão nas folhas e com os dados de fenótipo das plantas RNAiAPx3, mostrando participação na resposta a estresse hídrico em fase reprodutiva de plantas de arroz.

Como perspectiva para a conclusão do trabalho pretende-se:

1) Quantificar, através de ensaios fluorimétricos a modificação da expressão gênica em resposta à seca, tanto nas folhas bandeiras quanto nas anteras.

2) Entender melhor essa fina relação e regulação de *OsAPx3* e *OsAPx4* nas fases reprodutivas das plantas de arroz, testando os cis-elementos preditos tanto nas plantas PromAPx3::GUS, quanto nas PromAPx4::GUS.

3) compreender melhor o papel da APx3 e a regulação de sua expressão em resposta ao déficit hídrico.

6. Anexos

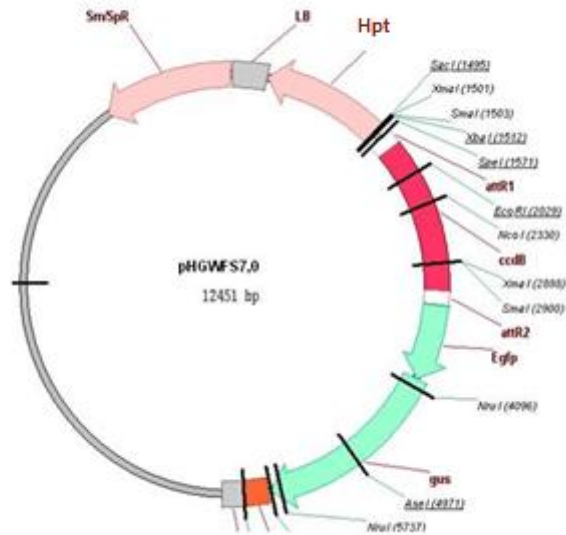


Figura 1: Vetor pHGWFS7 sistema Gateway® utilizado na transformação dos calos de arroz.

Sequência do promotor

TTTC TTGGATTCTGCTGTTTTGC ATAGTGCAAATTCAGTAAACCGTGTGAAGTGTAAGGTACAGTTG
 TGTAATATAAGGAGATGGATTTTAATCTATCTACGGGCATGTGCCTTAAATAACAAAAAGGAAAAAA
 ATCCAATAACCCCTATAAGTAAGTGGTCTTTTCAATCTCTCCAATAACTTAATTTTGTGCAACATA
 TGCTCCCTACAAGTCCATTTTCTTCTTCTAACTTCCCACCTCTGTCTAGTTTTCACTGATTTCTGGCC
 GCGCTTAGCAATTTCTCACATCTTTGTAGATCTCAGCATGGCTAGTGAAGTTGCTTTTGTCTTCTCTT
 GTTGGGCATAAGATTCAATACACATTTTATGAAATGAGATAATTATCATGTCTTACCGTCACATAGT
 TGGTGGAAATTAAGTGTGTAAGGTGAAAGGTAAAATAATGCTATGGTACACACACCTTTGGTGGAAA
 GGAGCAACTACCCTCACAGTGTGGAGGGTCATAGGGTGTGAGAAATAGCTAGAAATGGATAGAGGTG
 GGAAGATGGAAAAAAACAAACTTATTATGAGTGTTTTGTATGGAATTAAGTTGCAAAGGAAGTTTGA
 AAACACTAGTGACTTGTAGGAGGTATTTGGATATTTCAAAAAATAAAAACAAACACTCTGTATCCAT
 GCACAACATATAAGATAAAAATTATTAGTCCAATTCAGAGAGGTCTCACTTTTAGTAGTATGATTTAG
 TTTTCTGATTTATTGAGGGATATGTATTATGCTATATTTACATACCCAACATTTCTGAAACGTCTGT
 AAGTCCTTATTTGAAATAAAAACAAATTGTGTATTTTATTCCTAGTACTCTTCTTTCAAATTAACCTA
 TAAATTTGATGCATGTATTA AAAAGTAGGTGGAATTA AATTGGAGAAAATTGTGAATCATTTAGGAG
 GGGGAGTAGCCGAGTAGGGCTGAATAAGACCCCTATCCAGATCTAGAATGTAGTACTAGTTTTCTATA
 TTTAGGCCCGTTTAGTTGGCAAAAAATATTTGTTTTAAGGTGTCACATCAGATATATGGATACACA
 TTTAAAGTATTAAACGTTGTCTAATAACAAAATAAATTACAGTTTCCGCCTAGAACTGTGAGACGAA
 TTTATTAATCCTAAGTAATCCATCATTAGCAAATGTTTACTGTAGCACCACATTTGTCAAATCATGACC
 CAATTAGGCTCAGAAGATTCGTCTCGCAATTTACACGCAAACACTGTGTAATTGGTTTTTTTCCACATTA
 AATACTCCATGCATGTATCAAACATTCATGTGATGGGTGAAAAATTTTTGTTTTTGGGAACTAAACAGG
 GCCTAGGACAGAGCCAGCGAAAAACTTCCTCACCTGAGGGTTTGTTTAGTTACGAAAAAAAATTTT
 GGCTGTCACATCGGATGTTTGACCGGATGTCGGAAGGGTTTTTCGTACACTAATGAAAAATTAATTT

CATAACTCGTCTGAAAACCGTGAGACGAATCTTTTGAGCCTTATTAATCCGTAATTAGTACATGTGGG
TTACTGTATCACTTATGGTTAATCATGGACTAATTAGGCTCAAAGATTTCGTCTCGTGATTTTCTCCC
TAACTATGCAATTAGTTTGTTTAATCTATATTTAATGCTTCATGCATATGTCTAAAGATTTAATGTGT
CTAAAATTTTTTGGAAACATTTTCGAGTAACTAACCAGGCCTGAATCAGTAATCTCGTCAGAAATCA
AGAGATTTTCCACCGTGGCTGTGTGTAGGCCAGTGATGTGCATACCAGAGAAATCTCCACAGATTC
CTGGGCACGTTGCCTTCCCTCTGGAGACATCCCTTGCCTTCTCCACACCTCCACTCCATTCGATTCCTC
CCGCCCTTTCCTCCCCGCTTTTCCTACAAAAACCCCTGTGTGCTCCAAAACCTGAGCTCCTCTGTTC
TGTTCCTTCTCCACC **TATCACCTCTCCTCGGATCG** TCAGCAACAGCGGGCGCG **ATG** TCGGCGGGCC
GGTAGTGGACGCGGAGTACATGGCG

Legenda:

As sequências destacadas em cinza são as regiões de pareamento dos primers para amplificação dos 2 kb anteriores ao códon de transcrição inicial, marcado em amarelo.

Referências

- Agrawal GK, Jwa NS, Iwahashi H, Rakwal R: Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. *Gene* 2003, 322:93-103.
- Allen RD, Webb RP, Schake SA: Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 1997, 23(3):473-479.
- Asada K: THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999, 50:601-639.
- Bartosz G: Oxidative stress in plants. *Oxidative stress in plants* 1997, 19:47-64.
- Bozso Z, Ott PG, Szamari A, Zelleng A, Varga G, Besenyei E: Early detection of bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diaminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate. *J Phytopathol* 2005, 153:596-607.139
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ: ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* 2006, 45(1):113-122.
- Caverzan A, Bonifacio A, Carvalho FE, Andrade CM, Passaia G, Schünemann M, Maraschin Fdos S, Martins MO, Teixeira FK, Rauber R, Margis R, Silveira JA, Margis-Pinheiro M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. *Phytochemistry*. 2010 Apr;71(5-6):548-58. doi:10.1016/j.phytochem.2010.01.003. Epub 2010 Feb 1
- Chun SS, Vatem DA, Lin YT, Shetty K: Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem* 2005, 40:809-816.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Rio LA: Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001, 6(4):145-150.
- Counce PA, Keisling TC, Mitchell AJ: A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science* 2000, 40:436-443.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A: Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, 39:67-101.
- Davidse G, Sousa Sánchez M, Chater A: Alismataceae a Cyperaceae. In: *Flora Mesoamericana*. 1994: 1-543.

- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R: Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* 2005, 17(1):268-281
- de Pinto MC, Paradiso A, Leonetti P, De Gara L: Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J* 2006, 48(5):784-795.
- Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB: Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 2002, 53(372):1255-1272.140
- Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB: Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 2006, 141(2):330-335.
- Dempsey D, Klessig D: Signals in plant disease resistance. *Bull Inst Pasteur* 1995,93:167-186.
- Desikan R, S AH-M, Hancock JT, Neill SJ: Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 2001, 127(1):159-172.
- Dhaliwhal GS, Arora R: Environmental Stress in crop plants: Ajay Verma Commonwealth Publishers; 1999.
- Embrapa – www.embrapa.br.
- Fernandes ML: Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo; 2006.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD *et al*: Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003, 422(6930):442-446.
- Foyer CH, Noctor G: Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 2011, 155(1):2-18.
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR: Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *Plant J* 2003, 33(4):691-705.141
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Van Breusegem F: Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2006, 141(2):436-445.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968, 50(1):151-158.

- Gao X, Liang W, Yin C, Ji S, Wang H, Su X, Guo C, Kong H, Xue H, Zhang D: The SEPALLATA-like gene OsMADS34 is required for rice inflorescence and spikelet development. *Plant Physiol* 2010, 153(2):728-740.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J: Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *PGR* 2002, 37:263-285.
- Gill SS, Tuteja N: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 2010, 48(12):909-930.
- Gille G, Sigler K: Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol (Praha)* 1995, 40(2):131-152.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H *et al*: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 2002, 296(5565):92-100.
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA: Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 2005, 32:481 - 494.
- Greene R: Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants; *Arabidopsis Book* 2002.
- Henrissat B, Saloheimo M, Lavaitte S, Knowles JK: Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis. *Proteins* 1990, 8(3):251-257.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T: Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 1994, 6(2):271-282.
- Ishikawa T, Morimoto Y, Madhusudhan R, Sawa Y, Shibata H, Yabuta Y, Nishizawa A, Shigeoka S: Acclimation to diverse environmental stresses caused by a suppression of cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 2005, 46(8):1264-1271.
- Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S: Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiol* 1998, 39(1):23-34.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 1987, 6(13):3901-3907.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P: Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* 2005, 10(3):103-105.
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R: Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J Biol Chem* 2008, 283(49):34197-34203.

- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI: The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 2006, 141(2):323-329.
- Larcher W: *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos, SP: RiMa; 2004.
- Lee HD, Kim YS, Lee CB: The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* 2001a, 158:737-745.
- Li HB, Qin YM, Pang Y, Song WQ, Mei WQ, Zhu YX: A cotton ascorbate peroxidase is involved in hydrogen peroxide homeostasis during fibre cell development. *New Phytol* 2007, 175(3):462-471.
- Lichtenthaler HK: El estrés y la medida del estrés en plantas. In: *La Ecofisiología Vegetal – Una ciencia de síntesis*. Edited by Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A. Madrid: Thomson; 2004: p.1017-1054.
- Lu Z, Liu D, Liu S: Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 2007, 26(10):1909-1917.
- Mandelman D, Schwarz FP, Li H, Poulos TL: The role of quaternary interactions on the stability and activity of ascorbate peroxidase. *Protein Sci* 1998, 7(10):2089-2098.
- Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CL, Margis-Pinheiro M: Salt stress induces expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 2004, 166:323-331.
- 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 Physiol* 2007, 144(4):1777-1785.
- Mittler R, Feng X, Cohen M: Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 1998, 10(3):461-473.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F: Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004, 9(10):490-498.
- Mittler R, Zilinskas BA: Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* 1991, 97(3):962-968.
- Mittler R: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002, 7(9):405-410.
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD: Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 1995, 5(7):737-739.
- Murashige T, Skoog F: A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *PP*1962, 15:473-497.

- Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Korniyev D, Holaday AS, Zhang H: The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. *J Exp Bot* 2006, 57(12):3033-3042.
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jaquot JP: Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 2007, 129:185-195.
- Neill S, Desikan R, Hancock J: Hydrogen peroxide signaling *COPB* 2002, 5:388–395.
- Nilsen ET, Orcutt DM: *The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors*. New York: John Wiley and Sons; 1996.
- Nito K, Yamaguchi K, Kondo M, Hayashi M, Nishimura M: Pumpkin peroxisomal ascorbate peroxidase is localized on peroxisomal membranes and unknown membranous structures. *Plant Cell Physiol* 2001, 42(1):20-27.
- Noctor G, Foyer CH: Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998, 49:249-279.
- Panchuk, II, Volkov RA, Schoffl F: Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2002, 129(2):838-853.
- Park SH, Yi N, Kim YS, Jeong MH, Bang SW, Choi YD, Kim JK: Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot* 2010, 61(9):2459-2467.
- Pastori GM, Del Rio LA: Natural Senescence of Pea Leaves (An Activated Oxygen-Mediated Function for Peroxisomes). *Plant Physiol* 1997, 113(2):411-418.
- Patterson WR, Poulos TL: Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 1995, 34(13):4331-4341.
- Peng CL, Ou ZY, Liu N, Lin GZ: Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Sci* 2005, 12:179-186.
- Pignocchi C, Foyer CH: Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2003, 6(4):379-389.
- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R: Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *Plant J* 2003, 34(2):187-203.
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY: Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integr Plant Biol* 2008, 50(1):2-18.
- Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoeberichts FA, Vandorpe M, Gakiere B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G: Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox

state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant J* 2007, 52(4):640-657.

Raven EL: Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? *Nat Prod Rep* 2003, 20(4):367-381.

Rice eFP Browser :<http://bar.utoronto.ca/efprice/cgi-bin/efpWeb.cgi>

Rosa S: Caracterização funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (*Oryza sativa* L.). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JA, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis-Pinheiro M: Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry* 2010, 71(5- 6):548-558.

Rossel JB, Walter PB, Hendrickson L, Chow WS, Poole A, Mullineaux PM, Pogson BJ: A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant Cell Environ* 2006, 29(2):269-281.

Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M: Heat shock mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J Exp Bot* 2001, 52(354):145-151.

Scandalios JG: The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 2002, 27(9):483-486.

Schutzendubel A, Polle A: Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 2002, 53(372):1351-1365.

Shao HB, Guo QJ, Chu LY, Zhao XN, Su ZL, Hu YC, Cheng JF: Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007, 54(1):37-45.

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

Sharp KH, Mewies M, Moody PC, Raven EL: Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nat Struct Biol* 2003, 10(4):303-307.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 2002, 53(372):1305-1319.

Sivakumar P, Sharmila P, Pardha Saradhi P: Proline alleviates salt-stress-induced enhancement in ribulose-1, 5-bisphosphate oxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 279(2):512-515.

- Slesak 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 Biochim Pol* 2007, 54(1):39-50.
- Soares SE: Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Nutrition Reviews* 2002, 15 71-81.
- Swanson S, Gilroy S: ROS in plant development. *Physiol Plant* 2010, 138(4):384-392.
- Tan J, Tan Z, Wu F, Sheng P, Heng Y, Wang X, Ren Y, Wang J, Guo X, Zhang X, Cheng Z, Jiang L., Wang H, Wan JA Novel Chloroplast-Localized Pentatricopeptide Repeat Protein Involved in Splicing Affects Chloroplast Development and Abiotic Stress Response in Rice. *BMC Plant Biol.* 2014 May 17;14:133. doi: 10.1186/1471-2229-14-133.
- Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS: Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep* 2006, 25(12):1380-1386.
- Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Campa M, Soave C, Murgia I: Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in Arabidopsis enhances paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death. *Planta* 2005, 221(6):757-765.
- Teixeira F, Menezes-Benavente L, Galvão V, Margis-Pinheiro M: Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. *Genetics and Molecular Biology* 2005, 28:529-538.
- Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M: Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *J Mol Evol* 2004, 59(6):761-770.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL: Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 2006, 141(2):373-378.
- Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L: Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* 2004, 134(3):1100-1112.
- Van Rossum M, Alberda M, van der Plas L: Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science* 1997, 130:207-216.
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M *et al*: A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(26):16113-16118.

- Wada K, Tada T, Nakamura Y, Yabuta Y, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S, Nishimura K: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of chloroplastic ascorbate peroxidase of tobacco plants. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, 58(Pt 3):559-561.
- Wan XY, Liu JY: Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7(8):1469-1488.
- Wei S, Hu W, Deng X, Zhang Y, Liu X, Zhao X, Luo Q, Jin Z, Li Y, Zhou S, Sun T, Wang L, Yang G¹, He G. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. *BMC Genet.* 2014 May 27;15(1):63. doi: 10.1186/1471-2156-15-63.
- Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M: A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol* 1995, 36(6):1157-1162.
- Yan J, Wang J, Tissue D, Holaday S, Allen R, Zhang H: Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an Arabidopsis ascorbate peroxidase gene. *Crop Science* 2003, 43:1477-1483.
- Yoshida H, Nagato Y: Flower development in rice. *J Exp Bot* 2011, 62(14):4719-4730.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S: Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* 2000, 123(1):223-234.
- Yruela I: Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005, 17:145-156.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X *et al*: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 2002, 296(5565):79-92.
- Zavaleta-Mancera HA, Lopez-Delgado H, Loza-Tavera H, Mora-Herrera M, Trevilla-Garcia C, Vargas-Suarez M, Ougham H: Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J Plant Physiol* 2007, 164(12):1572-1582.
- Zhang A, Lu Q, Yin Y, Ding S, Wen X, Lu C: Comparative proteomic analysis provides new insights into the regulation of carbon metabolism during leaf senescence of rice grown under field conditions. *J Plant Physiol* 2010, 167(16):1380-1389.

Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM: Cloning and expression of an Arabidopsis gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Mol Biol* 1997, 34(6):967-971.

Zhu JK: Plant Salt Tolerance. *TPS* 2001, 6:66-71.